

Wellington Lunz

L-NAME Aumenta a Expressão de Proteínas de Estresse (Hsp72) Induzida pelo Exercício Físico e Altera a Dinâmica de Contração-Relaxamento de Cardiomiócitos Isolados do Ventrículo Esquerdo de Ratos

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de Doutor.

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória - 2010

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas

WELLINGTON LUNZ

**L-NAME Aumenta a Expressão de Proteínas de Estresse (Hsp72)
Induzida pelo Exercício Físico e Altera a Dinâmica de Contração-
Relaxamento de Cardiomiócitos Isolados do Ventrículo Esquerdo
de Ratos**

Orientador:

Prof. Dr. José Geraldo Mill

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio José Natali

Prof. Dr. Jose Hamilton Matheus Nascimento

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Profa. Dra. Ivanita Stefanon

Ficha catalográfica

**L-NAME Aumenta a Expressão de Proteínas de Estresse (Hsp72)
Induzida pelo Exercício Físico e Altera a Dinâmica de Contração-
Relaxamento de Cardiomiócitos Isolados do Ventrículo Esquerdo
de Ratos**

Wellington Lunz

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em: 16 / 12 / 2010

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Orientador, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Antônio José Natali - UFV

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, PPGCF-UFES

Prof^a. Dra. Ivanita Stefanon, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Jose Hamilton Matheus Nascimento, UFRJ

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 16 de dezembro de 2010

“dedico este trabalho aos meus pais que me deram vida, aos meus irmãos que me deram alma, aos meus amigos que me deram entusiasmo, aos meus bons professores que me deram caminhos, e a minha esposa que me deu significado”

Agradecimentos

Este espaço é muito especial, pois posso nele revelar todas as forças que permitiram a edificação dessa tese. Creio que neste espaço esteja a alma de um trabalho tão métrico. Ao mesmo tempo que é o momento mais prazeroso, é também bastante difícil. É o mais prazeroso porque me permite rememorar os momentos sensíveis e imensuráveis dessa etapa. Além disso, esse registro permite perpetuar tais memórias. É difícil porque não existem palavras que transfiram para aquele que avistar seu nome na sequência todo o sentimento de gratidão que transporto (e transportarei *ad eternum*).

Agradeço muito especialmente ao Prof. José Geraldo Mill, que ainda sem me conhecer aceitou me orientar, e foi um orientador sempre presente. Ofereceu-me todo o suporte intelectual e material demandado. Concedeu-me ainda as primeiras oportunidades de docência em nível superior, a que destaco profunda gratidão. Destaco ainda a enormidade de ensinamentos não formais, seja nas mais variadas conversas, em que é impossível não aprender algo novo, ou nos exemplos de conduta, de trabalhador, de servidor público e de empreendedor científico.

Ao amigo Marcelo P. Baldo, que participou desde a concepção até a coleta de dados. Orientou-me com importantes sugestões e me apresentou outros parceiros científicos. Destaco ainda as sempre agradáveis conversas de laboratório.

Ao Luiz H. S. de Lacerda, pelas contribuições nos protocolos de exercício e cuidado com os animais. Ao gentil amigo Leduc Mageski, sem o qual teria sido impossível conservar e armazenar nossas amostras biológicas. Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, pelos bons momentos compartilhados.

Aos Professores e funcionários da Pós Graduação em Ciências Fisiológicas - UFES, em particular a Prof^a Ivanita Stefanon, Prof Dalton V. Vassallo e Prof^a Nazaré S. Bissoli pela concessão de equipamentos laboratoriais. A Prof^a Nazaré foi também quem me indicou ao Prof. Mill, e, portanto, destaco minha gratidão.

Aos professores do Departamento de Desportos – UFES (onde estou lotado como docente), em particular na figura do atual chefe do Departamento Prof. Og G.

Negrão, pelas estratégias docentes criadas para não inviabilizar a conclusão desse trabalho ainda neste ano. Destaco especial agradecimento aos Profs Anselmo J. Perez e Fabian T. do Amaral que me substituíram nas atividades de docente enquanto estive em São Paulo para cumprimento de parte das análises do presente estudo.

Ao grande amigo Miguel A. Carneiro-Júnior, que na Universidade Federal de Viçosa me auxiliou integralmente nas análises de contratilidade dos cardiomiócitos isolados. Juntamente com os incansáveis amigos Matheus O. de Souza, Judson F. Quintão-Júnior e Luiz H. M. Bozi passamos algumas semanas com turnos contínuos de mais de 12 horas de trabalho diário, mas também não abdicamos de agradáveis confraternizações. Ao Prof. Thales N. Prímola Gomes que me indicou e me aproximou de parceiros científicos, os quais foram fundamentais para este estudo.

Ao “eterno orientador” Prof. Antônio José Natali, que abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar as análises de contratilidade dos cardiomiócitos isolados, oferecendo-me todas as condições técnicas. Permito-me ainda destacar que o Prof. Natali foi quem me orientou em duas iniciações científicas e, posteriormente, no mestrado. Agora tenho novamente a honra de tê-lo contribuindo intensamente em mais essa etapa da minha vida.

Ao belo e admirável casal de amigos Patrícia Fontes e Breno Vieira (pais da linda Sofia) que me hospedaram na cidade de Viçosa. Como é bom lembrar a convivência que tivemos! Tê-los como amigos é uma alegria indescritível.

Aos competentes cientistas e parceiros do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG Luciano S. A. Capettini, Josiane F. da Silva e Prof^a Virginia Soares Lemos, que muito me honraram ao aceitar participar desse projeto, e muito contribuíram para seu sucesso. A incondicional participação desses parceiros foi essencial na realização da maioria das análises protéicas do presente trabalho. Além disso, me ofereceram importantes sugestões e encaminhamentos na construção dos artigos já submetidos. Espero poder retribuir todo esse envolvimento e solidificar essa parceria.

As adoráveis Prof^{as} Ana Paula C. Davel (atualmente docente da UNICAMP) e Luciana Venturini Rossoni, do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, que enquanto estive em São Paulo me acolheram carinhosamente no laboratório e em suas vidas sociais. Ofereceram-me todo o suporte técnico e humano para realização das análises da Hsp72. Ofereceram-me ainda importantes sugestões e orientações. Agradeço ainda a todos do laboratório da Prof^a Luciana pelo acolhimento, em particular suas orientandas Gisele Kruger Couto e Camilla F. Wenceslau pelos auxílios técnicos e pela convivência. Foi muitíssimo agradável estar com vocês, e espero ter novas oportunidades.

A Prof^a Carolina D. Munhoz, também do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, que dedicou seu precioso tempo e conhecimento na realização das análises referentes à atividade das sintases de óxido nítrico.

A incrível amiga Carolina Biz, essa pessoa linda e rara, que me acolheu e hospedou em sua casa (São Paulo), e que por duas semanas me oportunizou desfrutar da privacidade de toda sua adorável família, a quem estendo minha gratidão. Espero um dia poder retribuir todo o carinho.

A CAPES, pela bolsa que me permitiu dedicar exclusivamente ao projeto.

Aos nossos familiares (meus e de minha esposa) que, embora distantes, acompanham nossa caminhada e torcem intensamente por nosso sucesso.

Muito especialmente a minha esposa Elaine C. Viana (metade de mim), que significa tudo que sou e que preenche de significado tudo que faço. A maior responsável por esse momento.

Por último, a todos os amigos e parentes que, embora não mencionados, me apoiaram, me fortaleceram e compreenderam minha ausência.

Meu carinhoso muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

Abreviaturas e símbolos	11
Resumo	14
Abstract	17
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Heat shock protein 72</i> : relação com o exercício físico e óxido nítrico.....	20
1.2 Contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados: relação com o óxido nítrico.....	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Animais de experimentação.....	35
3.2 Protocolos experimentais.....	35
3.2.1 Protocolo 1.....	35
3.2.1.1 <i>Grupos experimentais</i>	35
3.2.1.2 <i>Protocolo de Exercício</i>	36
3.2.1.3 <i>Administração de L-NAME</i>	36
3.2.1.4 <i>Medida direta da pressão arterial e contratilidade do ventrículo esquerdo</i>	37
3.2.1.5 <i>Eutanásia</i>	37
3.2.2 Protocolo 2.....	37
3.2.2.1 <i>Grupos experimentais</i>	37
3.2.2.2 <i>Administração de L-NAME</i>	38
3.2.2.3 <i>Eutanásia e isolamento de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo</i>	38
3.2.2.4 <i>Contração-relaxamento dos cardiomiócitos</i>	39

3.2.2.5 Procedimento de análises da contratilidade-relaxamento e número de células analisadas por animal.....	40
3.3 Extração e análises das proteínas por Western blotting.....	41
3.3.1 Determinação da expressão protéica das isoformas Hsp72 e Hsp73.....	41
3.3.2 Controle positivo para Hsp72.....	41
3.3.3 Determinação da expressão protéica da SERCA cardíaca (SERCA2a), RyR cardíaco (RyR2), trocador Na ⁺ /Ca ²⁺ sarcoplasmático (NCX) cardíaco, eNOS, iNOS e nNOS total e isoformas fosforiladas (p-NOS).....	42
3.4 Medida da atividade das NOS.....	43
3.5 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Protocolo 1.....	46
4.2 Protocolo 2.....	53
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

Abreviaturas e Símbolos

- AMPC = adenosina monofosfato cíclico
- BH₄ = tetrahidrobiopterina
- Ca²⁺ = cálcio
- C1 = grupo controle do protocolo 1
- C2 = grupo controle do protocolo 2
- DNA = ácido desoxirribonucléico
- dP/dT + = primeira derivada temporal da pressão intraventricular positiva
- dP/dT - = primeira derivada temporal da pressão intraventricular negativa
- E1 = grupo exercício do protocolo 1
- EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
- EL1 = grupo exercício + L-NAME do protocolo 1
- eNOS = sintase de óxido nítrico endotelial
- eNOS^{-/-} = modelo de camundongo cujo gene responsável pela expressão da eNOS foi eliminado (*knockouted*)
- FAD = flavina adenina dinucleotídeo
- FMN = flavina mononucleotídeo
- GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GMPc = monofosfato cíclico de guanosina
- HRP = peroxidase
- HSE = elemento de choque térmico (*heat shock element*)
- HSF1 = fator transcricional de choque térmico 1 (*heat shock factor 1*)
- HSP = proteína de estresse térmico (*heat shock protein*)
- Hsp72 = proteína de estresse 72 kDa (*heat shock protein 72*)
- Hsp73 = proteína de estresse constitutiva 73 kDa (*heat shock protein 73*)
- iNOS = sintase de óxido nítrico induzível
- iNOS^{-/-} = modelo de camundongo cujo gene responsável pela expressão da iNOS foi eliminado (*knockouted*)
- ISO = isoproterenol
- L1 = grupo tratado com L-NAME do protocolo 1
- L2 = grupo tratado com L-NAME do protocolo 2
- NADPH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato

NCX = proteína trocadora de sódio/cálcio sarcoplasmático
nNOS = sintase de óxido nítrico neuronal
nNOS^{-/-} = modelo de camundongo cujo gene responsável pela expressão da nNOS foi eliminado (*knockouted*)
NO = óxido nítrico
NOS = enzima sintase de óxido nítrico
L-NAME = N^ω-nitro-L-arginina metil éster
O₂⁻ = ânion superóxido
ONOO⁻ = peroxinitrito
PAD = pressão arterial diastólica
PAM = pressão arterial média
PAS = pressão arterial sistólica
p-eNOS^{Ser1177} = isoforma fosforilada no sítio Ser1177 da eNOS
p-eNOS^{Thr495} = isoforma fosforilada no sítio Thr495 da eNOS
PKA = proteína quinase A
PKC = proteína quinase C
PKG = proteína quinase G
p-nNOS^{Ser852} = isoforma fosforilada no sítio Ser852 da eNOS
PSVE = pressão sistólica desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
RyR2 = receptor de rianodina tipo 2 do tecido cardíaco
SDS = Dodecil (lauril) sulfato de sódio
SERCA2a = isoforma cardíaca da ATPase de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático do tecido cardíaco.

RESUMO

RESUMO

L-NAME Aumenta a Expressão de Proteínas de Estresse (Hsp72) Induzida pelo Exercício Físico e Altera a Dinâmica de Contração-Relaxamento de Cardiomiócitos Isolados do Ventrículo Esquerdo de Ratos.

Introdução. O exercício físico aumenta tanto a expressão da chaperona Hsp72 quanto a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) no miocárdio. Estudos sugerem que o NO modula a expressão de Hsp72, entretanto ainda não há conhecimento se o NO participa da hiperexpressão cardíaca de Hsp72 induzida pelo exercício. A administração de L-NAME, um inibidor não seletivo das enzimas sintase de NO (NOS), pode causar fibrose e necrose do miocárdio prejudicando a função cardíaca. Entretanto, não há conhecimento se o L-NAME altera a função contrátil de miócitos isolados do ventrículo esquerdo (VE). **Objetivos.** Os principais objetivos do presente estudo foram: (1) investigar se o L-NAME impediria o aumento de Hsp72 induzido por exercício no VE de ratos; (2) investigar se o L-NAME afetaria a função contrátil de miócitos isolados do VE de ratos. **Materiais e Métodos.** Ratos Wistar (70-100 dias) foram aleatoriamente distribuídos entre os dois protocolos experimentais desse estudo. No Protocolo 1, os ratos foram divididos em quatro grupos: Controle (C1; $n = 12$), L-NAME (L1; $n = 12$), exercício (E1; $n = 13$) ou exercício+L-NAME (EL1; $n = 20$). O L-NAME foi administrado na água de beber (700 mg/L) por sete dias. Os animais dos grupos E1 e EL1 foram submetidos a exercício físico em esteira (15-25 m/min, 40-60 min/sessão) também por sete dias. O Protocolo 1 foi usado para investigar o primeiro objetivo do estudo. No Protocolo 2, os ratos foram alocados em dois grupos: Controle (C2; $n = 8$) ou L-NAME (L2; $n = 8$). A administração de L-NAME foi igual à descrita para o Protocolo 1. O Protocolo 2 foi usado para investigar o segundo objetivo do estudo. A técnica de *Western blotting* foi utilizada para investigar as expressões protéicas de Hsp72, NOS endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), isoformas fosforiladas da NOS (p-eNOS e p-nNOS), isoforma cardíaca da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), isoforma cardíaca do receptor de rianodina 2 (RyR2) e o trocador de sódio/cálcio (NCX) do VE. A atividade das NOSs do VE também foi medida *in vitro* pela conversão de [3H]L-arginina para [3H]L-citrulina. Miócitos isolados do VE foram obtidos dos animais do Protocolo 2. A função contrátil desses miócitos foi medida na

condição basal para se avaliar os efeitos da administração de L-NAME *in vivo* por curto prazo. Em seguida, a função contrátil também foi medida após exposição *in vitro* dos miócitos ao L-NAME (0,2 mM) para se avaliar o efeito da inibição aguda das NOSs. **Resultados.** Como era esperado o exercício (grupo E1) aumentou a expressão de Hsp72 (223%; $p < 0,05$) comparado ao grupo C1. Entretanto, o exercício não alterou a expressão das isoformas NOS e p-NOS e não alterou a atividade das NOSs. Por outro lado, diferentemente da expectativa inicial, o L-NAME amplificou ($p < 0,05$) a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício no VE dos animais estudados (grupo EL1 vs. grupos C1, L1 e E1 = 1019%, 548% e 457%, respectivamente). A interação exercício+L-NAME (grupo EL1) também aumentou ($p < 0,05$) a expressão de p-eNOS^{Ser1177} (acima de 200%), que é uma isoforma estimulatória da eNOS, e diminuiu a expressão de p-nNOS^{Ser852} (em torno de 50%), que é uma isoforma inibitória da nNOS, em comparação aos grupos E1 e L1. Apesar disso, a atividade das enzimas NOS não foi diferente entre os grupos estudados. Na condição basal, cardiomiócitos do grupo L2 apresentaram maior ($p < 0,05$) percentual de encurtamento (23%) e velocidade máxima de contração (VMC, 20%) comparados aos cardiomiócitos do grupo C2. A expressão protéica de RyR2 e NCX foi aumentada no VE dos animais do grupo tratado com L-NAME *in vivo* (RyR2 = 76% e NCX = 83% em relação ao grupo não tratado com L-NAME; $p < 0,05$) sugerindo remodelamento funcional desses miócitos. A exposição ao L-NAME *in vitro* (0,2 mM) aumentou a VMC e a VM de relaxamento (MVR) dos miócitos tanto do grupo C2 quanto do grupo L2 (grupos C2 e L2; MVC = 32% e 20%; MVR = 55% e 31%, respectivamente). **Conclusão.** Os resultados permitem sugerir que a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico independe do NO. Por outro lado, a administração de L-NAME amplifica o aumento de Hsp72 induzido pelo exercício, aparentemente por mecanismos que independem diretamente do NO. A administração de L-NAME *in vivo* por curto prazo aumenta a função contrátil de cardiomiócitos aparentemente via aumento compensatório de proteínas reguladoras do Ca²⁺ intracelular. A função contrátil aumentada de miócitos isolados do VE após inibição das enzimas NOS *in vitro* sustenta que o NO regula o acoplamento excitação-contração celular.

Palavras-chave: proteína de estresse – óxido nítrico – cardiomiocitos isolados – contração celular – função contrátil de miócitos

ABSTRACT

ABSTRACT

L-NAME Enhances the Exercise-induced Stress Protein (Hsp72) and Affects the Contractile Function of Left Ventricle Single Myocytes from Rats.

Background. Exercise stimulates the overexpression of the chaperone Hsp72 and the production of nitric oxide (NO) in the myocardium. Studies suggest that NO exerts a key role for Hsp72 expression, however, at moment it is unknown if NO regulates the exercise-induced increase in cardiac Hsp72. The long-term treatment with L-NAME, a non-selective NO synthase (NOS) inhibitor, causes fibrosis and necrosis in the myocardium. However, the effects of short-term *in vivo* NOS inhibition by L-NAME on the contractile function of left ventricular (LV) single myocytes also are unknown. **Purpose.** This study had two aims. Firstly, to explore if the L-NAME abolishes the exercise-induced increase in cardiac Hsp72; and secondly, to investigate if short-term treatment with L-NAME affects the contractile function of LV single myocytes. **Methods.** Male *Wistar* rats (70-100 days) were randomly assigned to two Protocols. In the Protocol 1, rats were allocated in four groups: Control (C1; $n = 12$), L-NAME (L1; $n = 12$), exercise (E1; $n = 13$) or exercise plus L-NAME (EL1; $n = 20$). L-NAME was administered in drinking water (700 mg/L) and rats in the exercise groups were submitted to a treadmill running protocol (15-25 m/min, 40-60 min/set) for 7 days. This protocol was used to investigate the first aim mentioned above. In the Protocol 2, rats were allocated in two groups: Control (C2; $n = 8$) or L-NAME (L2; $n = 8$). L-NAME also was administered in drinking water (700 mg/L) for 7 days. This protocol was used to investigate the second aim mentioned above. Western blotting were performed to examine the expression of the Hsp72, endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS) and phosphorylated-NOS (p-eNOS and p-nNOS) isoforms and the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), ryanodine receptor 2 (RyR2) and the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) proteins from the LV. The NOS activity also was measured in LV homogenates by conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline. LV single myocytes were obtained of rats from Protocol 2 and their contractile function was measured at baseline to assess the effects of *in vivo* short-term treatment with L-NAME. Then, contractile function also was measured after L-NAME (0.2 mM) exposure *in vitro* to assess the direct effect of all NOS inhibition. **Results.** As expected the exercise (E1 group) increased Hsp72

expression (223%; $p < 0.05$) compared to C1 group, but the exercise alone did not alter NOS and p-NOS expression and NOS activity. Unlike our initial expectancy L-NAME enhanced ($p < 0.05$) the exercise-dependent cardiac Hsp72 expression (EL1 vs. C1, L1 and E1 group = 1019%, 548% and 457%, respectively). Despite the EL1 group increased ($p < 0.05$) stimulatory p-eNOS^{Ser1177} (over 200%) and decreased inhibitory p-nNOS^{Ser852} (around 50%) in the LV compared to both E1 and L1 groups, the NOS activity was similar to the four groups. Regarding Protocol 2, at baseline cardiomyocytes from the L2 group had increased ($p < 0.05$) fractional shortening (23%) and maximal velocity of contraction (MVC, 20%). In the LV from the L-NAME group the expression of the RyR2 and NCX proteins were increased (RyR2 = 76% and NCX = 83% in relation to untreated L-NAME group; $p < 0.05$) suggesting functional remodeling of ventricular myocytes. The *in vitro* exposure to L-NAME (0.2 mM) increased the MVC and MV of relaxation (MVR) of myocytes from both C2 and L2 groups (MVC = 32 and 20%, MVR = 55 and 31%, respectively). **Conclusions.** Our results suggest that the exercise-induced cardiac Hsp72 overexpression is not dependent of NO, while the *in vivo* L-NAME treatment enhances exercise-induced Hsp72 expression. Short-term *in vivo* NOS inhibition by L-NAME improves the LV myocytes contractile function due apparently a compensatory increase of Ca²⁺ regulatory proteins. The myocytes contractile function found improved after *in vitro* NOS inhibition confirm that NO is necessary to the cardiac excitation-contraction coupling regulation.

Keywords: heat shock protein - nitric oxide - isolated cardiomyocyte - cellular contraction - myocyte contractile function

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Heat shock protein 72*: relação com o exercício físico e óxido nítrico.

A participação das proteínas de choque térmico ou estresse térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP) na cardioproteção induzida pelo exercício, em particular a isoforma Hsp72, tem sido amplamente investigada nas últimas décadas. As HSPs foram assim denominadas porque acúmulo de proteínas com pesos moleculares de 70 kDa e 26 kDa foram encontradas depois que células de *Drosófilas* foram submetidas ao estresse térmico (42°C) (Ritossa, 1962).

Atualmente sabe-se da existência de dezenas de HSPs, as quais apresentam pesos moleculares que variam de aproximadamente 8 a 150 kDa e são, aparentemente, sintetizadas nas células de todos os seres vivos (Welch, 1992; Kiang e Tsokos, 1998; Benjamin e Mcmillan, 1998; Snoeckx, 2001).

A maioria dessas proteínas é expressa constitutivamente, ou seja, em situações fisiológicas normais. Entretanto, sua expressão também pode aumentar em resposta ao estresse. Os eventos de estresse podem decorrer de fatores fisiológicos (ex: divisão e diferenciação celular, desenvolvimento tecidual e estimulação hormonal), ambientais (ex: exposição a metais pesados, etanol, antibióticos) e patológicos (ex: infecção, inflamação, febre e isquemia) (Kiang e Tsokos, 1998). Uma vez que a expressão das HSPs ocorre em resposta a vários tipos de estresse, e não apenas após exposição ao estresse térmico, sugere-se que elas sejam denominadas de “proteínas de estresse” (Welch, 1992).

As HSPs são chaperonas. Portanto, facilitam o processo de organização conformacional de proteínas nascentes, previnem a desnaturação de proteínas sob condições de estresse e reparam proteínas que, por algum motivo, estejam funcionalmente comprometidas (Benjamin e Mcmillan, 1998). A expressão de HSPs é essencial para a manutenção da vida das células, face aos danos morfológicos, bioquímicos e funcionais causados pelos diversos eventos de estresse.

As HSPs mais abundantes em eucariotas e mais amplamente estudadas são as isoformas da família Hsp70. Essa família apresenta quatro isoformas: Hsp72, Hsp73, GRP75 e GRP78 (Kiang e Tsokos, 1998; Snoeckx, 2001). A sigla GRP é a abreviação de *Glucose Regulated Protein*, ou seja, Proteína Regulada por Glicose.

A Hsp73 é conhecida como Hsp70 constitutiva porque geralmente não é hiperexpressada após eventos de estresse. A GRP75 é encontrada em mitocôndrias e a GRP78, também conhecida como BiP (abreviação de *Binding Protein*), é encontrada no lúmen do retículo endoplasmático (Kiang e Tsokos, 1998; Snoeckx, 2001). A Hsp72, também conhecida como Hsp70 induzível ou simplesmente Hsp70i, é a única isoforma da família Hsp70 que é expressa exclusivamente após eventos de estresse significativos (Kiang e Tsokos, 1998).

A Hsp72 é altamente induzida pelo exercício físico nos músculos cardíaco (Locke et al., 1995 a e b; Skidmore et al., 1995; Powers et al., 1998; Noble et al., 1999; Demirel et al., 2001; Powers et al., 2001; Lunz et al., 2006) e esquelético (Skidmore et al., 1995; Smolka et al., 2000). A magnitude dessa expressão é similar àquela observada após o estresse térmico (Locke et al., 1995b; Skidmore et al., 1995).

Previamente a um evento de estresse, as Hsp72 estão ligadas ao fator transcricional de choque térmico 1 (*heat shock factor 1* - HSF1) no citosol. Esta condição mantém o HSF1 em um estado inativo. Porém, depois de um episódio de estresse, as Hsp72 se dissociam do HSF1. As Hsp72 ficam livres para agirem como chaperona, enquanto que o HSF1 é fosforilado (trimerizado) pela proteína quinase C (PKC). O HSF1 é então conduzido ao núcleo celular onde se liga ao elemento de choque térmico (*heat shock element* - HSE) situado na região promotora do DNA, o qual responde com a transcrição de RNAm-Hsp72 (Morimoto, 1993; Kiang e Tsokos, 1998). A Figura 1 ilustra o clássico mecanismo descrito na literatura para expressão das Hsp70.

Entretanto, existem sugestões de que, ao menos em relação à expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico, o mecanismo possa ser diferente. De fato, em uma sequência de estudos, Melling e colaboradores (2004, 2006, 2007 e 2009) investigaram os mecanismos de expressão da Hsp72 dependente do exercício físico. Os autores concluíram que a proteína quinase A (PKA), e não a PKC, estaria envolvida nesse processo. Além disso, outros estudos têm mostrado que a expressão da Hsp72 é modulada por eventos mais complexos que os até então sugeridos (Winegarden et al., 1996; Staib et al., 2009).

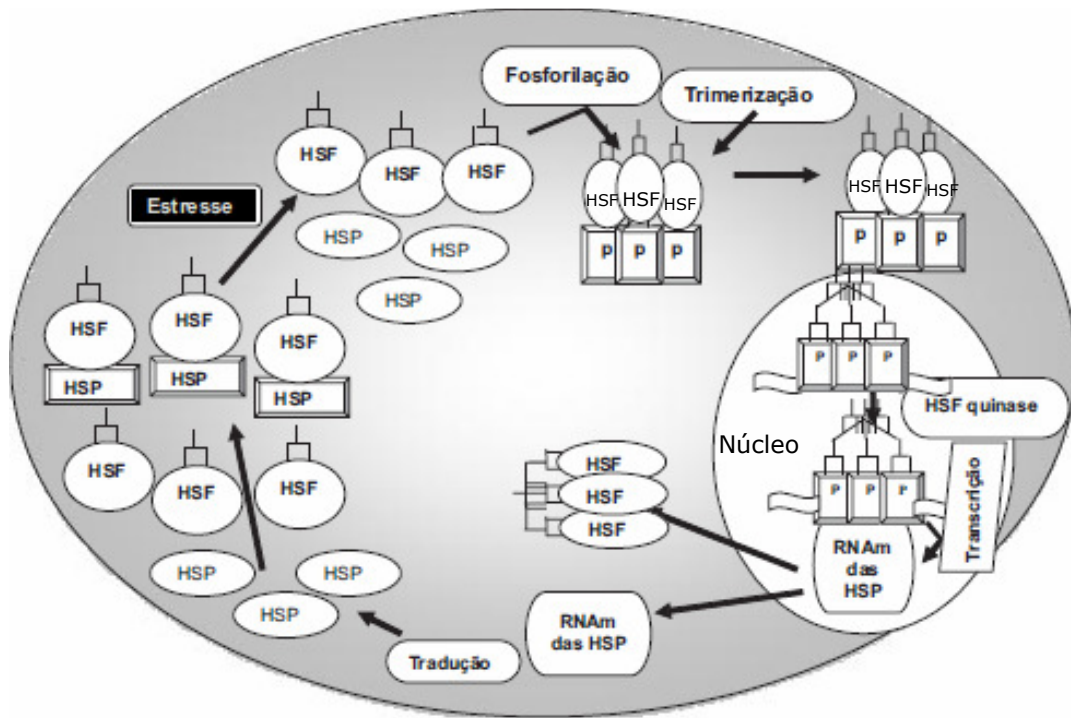


Figura 1. Mecanismo de indução de Hsp70 após eventos de estresse.

O HSF residente no citosol está inativo quando ligado a Hsp. Após estresse, o HSF se separa da Hsp, a qual fica livre para atuar como chaperona. Os HSFs, por sua vez, são fosforilados por proteínas quinases e formam "trimers" no citosol que, em seguida, entram no núcleo para se ligarem ao HSE localizado no DNA. O RNAm-HSP é transcrito e direciona-se do núcleo para o citosol, permitindo o aumento da síntese de Hsp. As novas HSPs contribuirão para a manutenção das funções celulares. Os HSFs também retornam para o citosol e ligam-se novamente às HSPs, voltando à sua forma inativa - *Este modelo foi adaptado de Kiang & Tsokos (1998).*

O aumento da expressão de Hsp72 no músculo cardíaco de ratos correlaciona-se positivamente com a prevenção e recuperações funcional e metabólica do miocárdio após eventos de hipóxia e isquemia-reperfusão, e correlaciona-se inversamente com o tamanho e frequência de lesões no miocárdio após infarto (Mcgrath et al., 1995; Plumier et al., 1995; Robinson et al. 1995; Hutter et al. 1996; Martin et al., 1997; Nakano et al., 1997; Amrani et al., 1998; Benjamin e Mcmillan, 1998; Noble et al., 1999; Powers et al., 2001). De maneira geral, a expressão de Hsp72 e as avaliações funcionais são obtidas 24 horas após os animais serem submetidos ao estresse térmico *in vivo* (42°C por 15 min).

Em um trabalho de revisão, Snoeckx et al. (2001) apresentaram vários outros estudos em que o pré-tratamento de ratos com estresse térmico aumentou a síntese

cardíaca de Hsp72 que, por sua vez, associou-se a uma melhor preservação da morfologia das mitocôndrias e dos níveis de ATP e fosfocreatina. Mais incisivos são os resultados obtidos de camundongos que hiperexpressam Hsp72, em que se evidencia redução do tamanho do infarto após isquemia-reperfusão (Hutter et al., 1996).

Acredita-se que o aumento da Hsp72 induzido pelo exercício físico ou estresse térmico seja o principal mecanismo responsável pela prevenção, redução do dano e recuperação das funções contrátil e metabólica do miocárdio após eventos de isquemia-reperfusão (Locke et al., 1995 a e b; Skidmore et al., 1995; Amrani et al., 1998; Powers et al., 1998; Noble et al., 1999; Demirel et al., 2001; Powers et al., 1998 e 2001).

Entretanto, até o presente momento os mecanismos moleculares responsáveis pela hiperexpressão de Hsp72 em resposta ao exercício físico ainda não foram esclarecidos. A compreensão desse fenômeno é importante para contribuir no mapeamento das vias moleculares de cardioproteção induzidas pelo exercício físico. Consequentemente auxiliará na elaboração de medicamentos que mimetizem os efeitos do exercício físico ao coração e, desta forma, beneficiará pessoas incapacitadas para a prática de exercício.

Entretanto, considerando-se que o exercício físico altera vários eventos fisiológicos, a exata compreensão desse fenômeno não será facilmente alcançada.

Vários eventos fisiológicos que também são modulados pelo exercício têm sido positivamente associados à expressão aumentada de Hsp72 e, em tese, poderiam estar envolvidos na indução de Hsp72 dependente do exercício. Os principais exemplos são os aumentos da temperatura corporal (Taylor et al., 1999; Hamilton et al., 2001; Harris e Starnes, 2001; Kim et al., 2004; Staib et al., 2007 e 2009), do estresse mecânico (Hernando e Manso 1997), da produção de radicais livres (Benjamin e McMillan, 1998; Nishizawa et al., 1999; González e Manso 2004) e do Ca^{2+} intracelular (Duncan et al 1997; Kiang et al. 1994; Benjamin e McMillan, 1998; Eickelberg et al. 2001; Kiang et al., 2002), a hiperestimulação adrenérgica (Paroo e Noble, 1999; Maloyan e Horowitz, 2002), a depleção dos estoques de glicogênio e ATP intracelular (Why et al., 1994; Winegarden et al., 1996; Benjamin e McMillan, 1998; Febbraio e Koukoulas, 2000), a redução do pH intracelular

(Neuhaus-Steinmetz et al., 1996) e o aumento da ativação de receptores hormonais androgênicos (Milne et al., 2006).

Apesar das muitas possibilidades fisiológicas, o mecanismo molecular responsável pelo aumento de Hsp72 induzido pelo exercício físico permanece indeterminado.

Malyshev et al. (1995 e 1996) observaram que o estresse térmico aumentou a produção de óxido nítrico (NO) no coração e em vários outros órgãos de ratos. O aumento de NO associou-se positivamente com o aumento da expressão de Hsp72. Além disso, a expressão cardíaca de Hsp72 dependente do estresse térmico foi atenuada em 45% quando a síntese de NO foi farmacologicamente inibida. Posteriormente, evidenciou-se em cultura de células do músculo liso vascular que a ativação do HSF1 seguida pela expressão de Hsp72 era dependente de NO (Xu et al., 1997). Na sequência, resultado similar foi encontrado em células epiteliais do intestino humano (*T84 cells*) (Kiang et al., 2002), uma vez que após inibição da produção do NO com o fármaco N^ω-nitro-L-arginina os pesquisadores encontraram inibição da transcrição de mRNA-Hsp72 e da expressão de Hsp72.

De fato, tem sido mostrado que o NO ativa proteínas quinases (ex: PKA e PKC) (Vila-Petroff et al., 1999; Balafanova et al., 2002; Kiang et al., 2002; Massion et al., 2003; Seddon et al., 2007), as quais estão envolvidas na expressão de Hsp72 (Morimoto, 1993; Kiang e Tsokos, 1998; Kiang et al., 2002; Melling et al., 2004 e 2006). Além disso, o NO também é um radical livre e sua produção aumenta, entre outros, após eventos como o estresse térmico (Malyshev et al., 1995 e 1996) e aumentos do Ca²⁺ intracelular (Kiang et al., 2002) e contratilidade cardíaca (Kaye et al. 1996). Estes mesmos eventos já foram positivamente associados com o aumento da expressão de Hsp72.

Atualmente, sabe-se que o NO é produzido por praticamente todas as células cardíacas (Massion et al., 2003; Seddon et al., 2007). O exercício físico realizado por alguns dias ou semanas também aumenta a biodisponibilidade cardíaca de NO por mecanismos que incluem aumento da expressão e atividade de enzimas sintases de NO (NOS) (Zhang et al. 2007; Grijalva et al. 2008) e o aumento do NO derivado do endotélio de artérias coronárias via força tangencial exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a superfície do endotélio (estresse de cisalhamento ou *shear stress*) (Kingwell, 2000; Duncker e Bache, 2008).

Dessa forma, a hipótese formulada nesse estudo é de que o NO estaria envolvido na cascata de eventos que determina o aumento de expressão de Hsp72 induzido pelo exercício no miocárdio de ratos. Até a presente data não foram encontrados estudos que tenham testado essa hipótese.

É necessário pontuar que o NO é um gás solúvel com meia vida de apenas alguns segundos, mas com ampla ação sinalizadora intra e intercelular (Seddon et al., 2007). No organismo de vertebrados ele é produzido por enzimas NOS a partir do aminoácido L-arginina e na presença dos cofatores oxigênio e nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). As NOSs também estão ligadas de forma relativamente estável aos cofatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), a um grupo heme (ferro protoporfirina IX) e a tetrahydrobiopterina (BH₄). Esses cofatores permitem que elétrons sejam aproveitados do NADPH e que a reação que converte L-arginina e oxigênio em NO e L-citrulina seja catalizada. A interação da proteína calmodulina com a NOS também é importante para acelerar a transferência de elétrons do NADPH para o domínio redutase da NOS, e a interação Ca²⁺-calmodulina é importante para ativar as isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) das NOSs. A Figura 2 apresenta um esquema resumido que ilustra a produção de NO por uma enzima NOS a partir do substrato L-arginina.

A importância fisiológica do NO foi evidenciada a partir dos estudos produzidos por Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad, os quais foram premiados em 1998 com o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina (Alderton et al., 2001).

A ação fisiológica clássica do NO refere-se à sua participação direta no relaxamento do músculo vascular dependente do endotélio. Os mecanismos para a ocorrência desse fenômeno são iniciados principalmente pela interação da acetilcolina com receptores muscarínicos ou via liberação intracelular de Ca²⁺ decorrente do estresse de cisalhamento na parede vascular. Esses eventos sinalizam para o aumento da produção de NO (Seddon et al., 2007). O NO, por sua vez, sinaliza para a enzima guanilil ciclase catalisar a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP) (Seddon et al., 2007). Sugere-se que o GMPc promove o relaxamento do músculo vascular por duas vias: (1) modulação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc); (2)

ativação da proteína quinase G (PKG) que fosforila a troponina I e dessensibiliza os miofilamentos cardíacos ao Ca^{2+} (Massion et al., 2003).

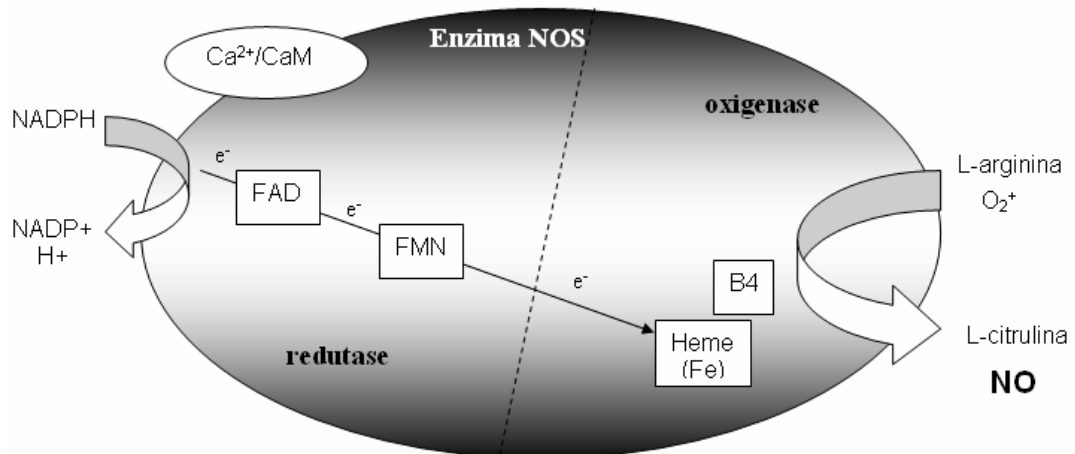


Figura 2. Produção de NO via enzimas NOS.

Os elétrons (e^-) são doados pela NADPH para o domínio redutase da enzima NOS e carregados por FAD e FMN para o domínio oxigenase onde interagem com ferro (Fe) do grupo heme e com o BH_4 . A reação do oxigênio com L-arginina é catalizada gerando citrulina e NO. O fluxo de elétron através do domínio redutase requer a interação da Ca^{2+} /Calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) - *Adaptado de Alderton et al. 2001.*

Existem três isoformas NOS, as quais foram identificadas, descritas, clonadas e purificadas entre 1989 e 1994 (Alderton et al., 2001), sendo elas: 1) NOS neuronal (NOS1 ou nNOS); 2) NOS induzível (NOS2 ou iNOS); 3) NOS endotelial (NOS3 ou eNOS). Embora as nNOS e eNOS tenham sido inicialmente denominadas como NOS constitutivas (cNOS) para que fossem diferenciadas da iNOS, sabe-se atualmente que as três isoformas NOS podem ser induzidas, e, dependendo do tecido ou tipo celular, as três isoformas podem ser constitutivas (Alderton et al 2001). As cNOS, entretanto, podem ser moduladas por Ca^{2+} intracelular (ao menos para isoformas humano), enquanto a iNOS não parece depender do Ca^{2+} intracelular e, geralmente, é induzida por eventos inflamatórios (Alderton et al 2001).

Apesar da nomenclatura, essas enzimas podem ser constitutivamente expressas em diferentes tecidos. Por exemplo, a eNOS é encontrada em células do endotélio vascular e nos músculos cardíaco e liso. A nNOS é encontrada no cérebro, algumas vísceras e nos músculos esquelético e cardíaco. A iNOS é encontrada em células endoteliais, inflamatórias e cardíacas (Seddon et al., 2007).

Especificamente no coração, as cNOS são encontradas em diferentes localizações subcelulares. No cardiomiócito a eNOS está localizada principalmente em regiões conhecidas como cavéolas, que são pequenas invaginações da membrana plasmática de formato vesicular. A eNOS também já foi encontrada associada aos receptores de rianodina (RyR). Quando se considera a estrutura cardíaca como um todo, a eNOS é encontrada em maior quantidade em células endoteliais dos vasos coronarianos e do endocárdio (Seddon et al., 2007).

A nNOS está localizada no retículo sarcoplasmático dos cardiomiócitos, e também já foi encontrada acoplada a proteínas do sarcolema (Seddon et al., 2007). Recentemente, em camundongos que hiperexpressam a nNOS, constatou-se que a nNOS interage com a importante proteína envolvida na recaptção de Ca^{2+} intracelular denominada ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), e também com canais de Ca^{2+} do tipo L, um importante tipo de canal envolvido na entrada de Ca^{2+} para a contração muscular (Burkard et al., 2007).

A localização da nNOS no retículo sarcoplasmático tem permitido especular que o NO derivado dessa enzima possa agir sobre proteínas moduladoras da liberação e recaptção do Ca^{2+} intracelular (ex: SERCA, fosfolambam, RyR e canais de Ca^{2+} tipo L). As nNOS também são encontradas em nervos cardíacos autonômicos (Massion et al., 2003; Seddon et al., 2007).

A iNOS também é encontrada no coração, principalmente em células endoteliais e, como já mencionado anteriormente, é hiperexpressada em situações de inflamação tecidual (Seddon et al., 2007) moduladas por citocinas inflamatórias (Massion et al., 2003).

Em relação à hipótese desse estudo, já previamente mencionada, pode-se especular que se a expressão de Hsp72 em resposta ao exercício físico for modulada pela liberação de NO, numa intervenção em que se inibe a produção de

NO durante o treinamento físico espera-se uma menor expressão cardíaca de Hsp72.

A inibição *in vivo* da produção de NO pode ser feita com o fármaco N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um análogo da L-arginina que compete pelo sítio de ligação da L-arginina localizado nas isoformas NOS e, dessa forma, inibe de forma não seletiva a produção de NO por todas as isoformas NOS (Southan e Szabó, 1996).

Entretanto, uma consequência da administração de L-NAME por vários dias ou semanas é a indução de lesões cardiovasculares caracterizadas por fibrose e necrose principalmente na região do subendocárdio ventricular (Moreno et al., 1995, 1996 e 1997; Oliveira et al., 2000; Coelho-Filho et al., 2001; Sampaio et al., 2002; Neves et al., 2006). Como tais lesões poderiam confundir a interpretação dos resultados, uma vez que o estresse patológico induz a síntese de Hsp72 (Kiang e Tsokos, 1998), uma forma de minimizar a incidência de lesões cardiovasculares induzidas pelo L-NAME é realizando estudos de curta duração.

Além disso, alguns estudos têm mostrado que a administração crônica de L-NAME em ratos ou camundongos pode induzir aumento compensatório das isoformas NOS ou aumento da atividade das NOSs em vários tecidos (Miller et al 1996; Henningsson et al 2000; Coelho-Filho et al 2001; Darblade et al 2001; Bernátová et al 2007) incluindo o miocárdio (Sampaio et al 2002; Suda et al 2002; Zaobornyj et al 2009).

Dessa forma, para se determinar a hipotética participação do NO na expressão da Hsp72 induzida pelo exercício físico é importante mensurar tanto a expressão como a atividade das NOS no coração dos animais submetidos ao estresse físico.

1.2. Contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados: relação com o óxido nítrico.

Atualmente sabe-se que o NO participa de vários outros eventos fisiológicos além do clássico mecanismo de vasodilatação vascular como, por exemplo, na imunorregulação e captação de glicose pelo miócito. No músculo cardíaco o NO participa da supressão da síntese de colágeno, do crescimento e sobrevivência celular, do metabolismo de substratos e, também, da contração muscular (Kolpakov et al., 1995; Cao et al., 1997; Kingwell, 2000; Seddon et al., 2007; Xavier-Vidal et al., 2003).

Como anteriormente apresentado, praticamente todas as células cardíacas expressam as enzimas NOS (Kingwell, 2000; Massion et al., 2003; Seddon et al., 2007) e a inibição *in vivo* do NO promove lesões no coração com conseqüente redução da função cardíaca quando avaliada em preparações isoladas, evidenciando a importância fisiológica do NO.

Além desse prejuízo contrátil induzido por lesões, os resultados obtidos após inibição aguda da produção de NO em preparações de corações isolados ou após redução da oferta de NO em cardiomiócitos isolados permitem sugerir que o NO também modula diretamente a resposta inotrópica e lusitrópica, a resposta a β -adrenérgicos e a relação força-frequência (Seddon et al. 2007).

Entretanto, os resultados são bastante contraditórios (Massion et al., 2003; Sedon et al 2007) e, desta forma, ainda não é possível afirmar o real efeito do NO sobre o acoplamento excitação-contração de cardiomiócitos isolados. Em miócitos cardíacos isolados o que se evidencia mais frequentemente são efeitos inotrópico negativo e lusitrópico positivo induzidos pelo NO (Georg e Kottenberg, 1999; Massion et al., 2003), mas vários estudos mostram resultados opostos a estes (Khan et al., 2003; Martin et al., 2006; Wang et al., 2008).

A causa dos dados divergentes pode estar relacionada aos modelos de estudo. A maioria dos estudos que investiga os efeitos da inibição das NOSs na contração de cardiomiócitos isolados foi conduzido em camundongos *knockout* para os genes eNOS e nNOS (Belevych e Harvey, 2000; Gödecke et al 2001; Ashley et al 2002; Barouch et al 2002; Khan et al 2003; Sears et al 2003; Martin et al 2006; Wang et al 2008). O termo *knockout* é usado para descrever a eliminação de um gene

específico via manipulação genética de camundongos. Geralmente, o gene eliminado é descrito seguido pelo símbolo *-/-* (ex: nNOS*-/-*).

De fato, alguns estudos têm mostrado que cardiomiócitos de camundongos nNOS*-/-* (Ashley et al., 2002; Martin et al., 2006) e eNOS*-/-* (Wang et al., 2008; Barouch et al., 2002; Khan et al., 2003) apresentam maior contratilidade. Por outro lado, outros estudos evidenciaram que cardiomiócitos de camundongos nNOS*-/-* tem menor contratilidade (Barouch et al., 2002; Khan et al., 2003) e cardiomiócitos de camundongos eNOS*-/-* não apresentam qualquer alteração contrátil (Martin et al., 2006; Gödecke et al., 2001; Belevych e Harvey, 2000). Alguns estudos com camundongos NOS*-/-* também evidenciaram que a ausência dessas enzimas tem impacto na modulação do Ca²⁺ intracelular (Khan et al., 2003; Sears et al., 2003; Wang et al., 2008), mas essa resposta não foi observada por outros pesquisadores (Gödecke et al., 2001; Belevych e Harvey, 2000).

Apesar da importância desse modelo de camundongo, evidencia-se que a eliminação do gene eNOS, nNOS ou iNOS isoladamente apenas extingue a produção de NO daquele gene. Ou seja, a eliminação de um gene não elimina completamente a produção de NO, e ainda não se sabe claramente qual a magnitude da produção de NO no miocárdio por cada isoforma NOS. Por exemplo, no cardiomiócito a eNOS aparentemente tem maior participação por via parácrina, uma vez que a maior produção de NO ocorre no endotélio microvascular coronariano, enquanto que a nNOS teria maior participação por via autócrina, em consequência de sua localização intracelular (Seddon et al., 2007).

Os corações de camundongos *knockout* também apresentam densidade aumentada de receptores β -adrenérgicos (Barouch et al., 2002), o que evidentemente confunde a interpretação dos resultados. Gödecke et al (2001) encontraram aumento de 50% para a densidade de receptores β -adrenérgicos no coração de camundongos eNOS*-/-*.

Além disso, não é possível afirmar que a deleção de um determinado gene seja inócua para outras funções fisiológicas e moleculares (Barouch et al., 2002; Sears et al., 2003).

Outra estratégia para inibição das NOSs é por via farmacológica como, por exemplo, o L-NAME. A manipulação do L-NAME permitiria investigar pelo menos

duas questões: (1) se as respostas contráteis de cardiomiócitos isolados são alteradas após inibição *in vivo* das NOSs; e (2) se a inibição farmacológica *in vitro* de todas as isoformas NOS altera as respostas contráteis dos cardiomiócitos isolados.

Entretanto, não se pode desconsiderar que o uso do L-NAME *in vivo* também pode apresentar limitações como indução de lesões cardíacas e aumento compensatório da produção de NO, como já previamente mencionado. Em relação a isso, resultados referentes à contratilidade dos cardiomiócitos isolados após tratamento *in vivo* com L-NAME poderiam representar apenas respostas induzidas pelo remodelamento funcional dos cardiomiócitos, e não respostas caracterizadas pela menor produção de NO. Dessa forma, num desenho experimental em que se utilize o L-NAME *in vivo* para inibir a produção cardíaca de NO torna-se importante mensurar a expressão de proteínas envolvidas na regulação contrátil para, dessa forma, avaliar o hipotético remodelamento funcional dos cardiomiócitos induzido pelo L-NAME.

Por outro lado, diferentemente dos cardiomiócitos de camundongos *knockout* que apenas têm permitido conhecer as respostas contráteis na ausência de uma isoforma NOS específica, a administração do L-NAME *in vitro* permitiria esclarecer mais precisamente o efeito da inibição das NOSs na função contrátil dos cardiomiócitos isolados.

Até o presente momento não foram encontrados estudos que tenham investigado os efeitos do tratamento com L-NAME *in vivo* na resposta contrátil de cardiomiócitos isolados ou, ainda, que tenham investigado os efeitos da inibição aguda das NOSs via L-NAME *in vitro* na resposta contrátil de miócitos cardíacos isolados.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar se o tratamento de curta duração com L-NAME, um inibidor não seletivo das enzimas NOS, é capaz de inibir a expressão da proteína de estresse Hsp72 induzida pelo exercício físico e se é capaz de alterar a dinâmica de contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo (VE) de ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Investigar se o tratamento com L-NAME por curto prazo (7 dias) é capaz de inibir a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico no VE de ratos Wistar;
- b) Investigar se as intervenções com L-NAME e exercício físico de curto prazo (7 dias) são capazes de alterar a atividade e expressões das NOS total (eNOS, nNOS e iNOS) e isoformas fosforiladas (p-eNOS^{Thr495} e p-eNOS^{Ser1177}; p-nNOS^{Ser852}) do VE de ratos Wistar;
- c) Investigar se o tratamento com L-NAME de curto prazo (7 dias) é capaz de alterar a dinâmica de contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados do VE de ratos Wistar;
- d) Investigar se a inibição aguda *in vitro* das NOSs em cardiomiócitos isolados do VE de ratos Wistar tratados e não tratados com L-NAME por curto prazo (7 dias) pode alterar as respostas contráteis;
- e) Investigar se o tratamento com L-NAME de curto prazo (7 dias) é capaz de alterar a expressão de proteínas envolvidas na modulação do Ca²⁺ intracelular (SERCA2a, RyR2 e trocador Na⁺/Ca²⁺) do VE de ratos Wistar;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais de experimentação – Ratos Wistar com 70 a 100 dias de vida participaram do desenho experimental. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (n = 4 a 5 por gaiola), receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22-26°C e regime de 12h/12h claro/escuro. Os pesos dos animais foram obtidos no início e final do experimento. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Experimentação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (Protocolo: 003/2009).

3.2 - Protocolos experimentais – Foram realizados 2 protocolos experimentais para atender os objetivos propostos, aqui denominados de Protocolos 1 e 2. O Protocolo 1 foi delineado para avaliar os efeitos do exercício físico e do tratamento com L-NAME sobre a hemodinâmica e para obtenção de fragmentos do VE para posterior análise das proteínas de interesse e atividade das NOS. O Protocolo 2 foi delineado para avaliar os efeitos do tratamento com L-NAME nas respostas de contratilidade-relaxamento de cardiomiócitos isolados do VE. O detalhamento metodológico dos Protocolos 1 e 2 estão apresentados na sequência.

3.2.1 - Protocolo 1

3.2.1.1 - Grupos experimentais

Foram constituídos 4 grupos de animais:

- 1) Grupo Exercício (E1; n = 13) - animais submetidos ao exercício em esteira, mas não ao tratamento com L-NAME;
- 2) Grupo L-NAME (L1; n = 12) - animais submetidos ao tratamento com L-NAME, mas não ao exercício;
- 3) Grupo Exercício + L-NAME (EL1; n = 20) - animais submetidos ao exercício em esteira e ao tratamento com L-NAME, concomitantemente;
- 4) Grupo Controle (C1; n = 12) - animais que não foram submetidos ao exercício ou tratamento com L-NAME;

3.2.1.2 – Protocolo de Exercício

Uma semana antes do início do protocolo de exercício, os ratos foram submetidos a uma sessão de exercício em esteira específica para roedores (10 min; 15 m/min) para avaliar a predisposição à corrida. Após isso, todos os animais que completaram o protocolo foram aleatoriamente distribuídos entre os 4 grupos, conforme mencionado no tópico anterior.

Após a semana de seleção e distribuição dos animais, os ratos dos grupos E1 e EL1 foram submetidos a 7 dias de exercício aeróbico progressivo em esteira (sem inclinação). O protocolo de exercício consistiu de 1 sessão diária, duração entre 40-60 min/sessão e intensidade de 15 a 25 m/min, conforme segue: Dia 1) 15 m/min por 60 min; Dia 2) 18 m/min por 60 min; Dia 3) 20 m/min por 40 min; Dia 4) 20 m/min por 60 min; Dia 5) 22,5 m/min por 40 min; Dia 6) 22,5 m/min por 60 min; Dia 7) 25 m/min por 60 min.

Este protocolo se caracteriza como predominantemente aeróbico (Pilis et al., 1993) e foi assim estabelecido porque ao menos três turnos de exercício são recomendados para indução significativa de Hsp72 no VE de ratos (Locke et al., 1995). O presente protocolo foi adaptado de Hamilton et al. (2003) e ajustado a partir de um estudo piloto em que a progressão intensidade-duração respeitou o limite de tolerância dos animais ao exercício físico.

3.2.1.3 - Administração de L-NAME

Os grupos L1 e EL1 foram tratados com L-NAME (700 mg/L) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolvido na água de beber por 7 dias consecutivos. Concentrações similares de L-NAME são habitualmente utilizadas (Ribeiro et al., 1992; Darblade et al., 2001) sendo suficientes para inibir em aproximadamente 100% a atividade das NOSs (Pfeiffer et al., 1996; Taylor et al., 2007). Em um estudo piloto realizado previamente ao início desse experimento, dentre 3 diferentes concentrações de L-NAME (300, 500 e 700 mg/L) experimentadas, apenas a concentração de 700 mg/L foi capaz de aumentar a pressão sanguínea ao final de 7 dias. O aumento da pressão sanguínea é considerado um marcador da inibição das NOSs (Ribeiro et al 1992). A ingestão de água em cada gaiola foi medida diariamente, permitindo estimar o consumo médio de água e L-NAME por animal.

3.2.1.4 - Medida direta da pressão arterial e contratilidade do ventrículo esquerdo

Ao final do sétimo dia de intervenção com L-NAME e exercício (entre 20 e 24h após última sessão) os animais foram anestesiados (cetamina: 90 mg/kg, a 10%; xilazina: 10 mg/kg, a 2%) e submetidos à cirurgia de implantação de um catéter de polietileno 50 (P50) na artéria carótida direita. Em seguida a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) foram obtidas conectando-se o cateter a um transdutor de pressão (TRA021, LSI, Letica Scientific Instruments, Espanha) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4 sp, modelo sp 4922, ADInstruments, Austrália) e transmitido a um computador onde as medidas foram registradas e processadas (Software Chart 5.5.1). Em seguida, o cateter foi direcionado para o VE para registro da pressão sistólica desenvolvida pelo VE (PSVE), da pressão diastólica final do VE e obtenção da primeira derivada temporal da pressão intraventricular positiva ($dP/dT+$) e negativa ($dP/dT-$). A frequência cardíaca foi determinada pelo número de sístoles por minuto observada no registro da pressão arterial pulsátil.

3.2.1.5 - Eutanásia

Após o cateterismo cardíaco os animais foram eutanasiados e o coração e vísceras de interesse foram obtidos e pesados em balança de precisão. A tíbia direita foi obtida e medida com auxílio de um paquímetro. Fragmentos do VE foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em freezer -80°C para posterior análise da expressão de proteínas de interesse e atividade das NOSs.

3.2.2 - Protocolo 2

3.2.2.1 - Grupos experimentais

Foram constituídos 2 grupos experimentais:

- 1) Grupo L-NAME (L2; $n = 8$) - animais submetidos ao tratamento com L-NAME por 7 dias;

- 2) Grupo Controle (C2; $n = 8$) - animais não tratados com L-NAME nos 7 dias de experimento;

3.2.2.2 - Administração de L-NAME

O protocolo de administração de L-NAME para o grupo L2 é o mesmo do grupo L1, conforme descrito no tópico 3.2.1.3.

3.2.2.3 – Eutanásia e isolamento de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

Ao final do experimento os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical. Os corações foram rapidamente removidos e lavados com solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 para remover o excesso de sangue. A artéria aorta foi canulada retrogradamente em Langendorff e o coração perfundido com solução de isolamento em um fluxo constante para limpeza dos vasos coronários. No momento em que o coração passou a contrair forte e regularmente a perfusão foi trocada por uma solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido etileno glicol tetracético [EGTA - *ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*] durante 4 minutos para depleção do Ca^{2+} cardíaco e separação dos discos intercalares. Em seguida, o coração foi perfundido com solução 100 μM de CaCl_2 contendo 1 mg/ml de colagenase (Worthington Tipo II) durante 25 a 30 minutos, para o rompimento das fibras colágenas.

Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios. O ventrículo direito foi removido e o VE aberto através do septo interventricular. Ressalta-se que os ventrículos foram pesados, mas por causa da hiperhidratação cardíaca pós-perfusão esses resultados foram desconsiderados. Os músculos papilares e o tecido conectivo foram removidos da superfície do endocárdio. Amostras do VE foram colocadas separadamente em frascos contendo solução enzimática (colagenase) suplementada com 1% de albumina bovina. Os miócitos foram dispersos através de agitação moderada dos frascos em “banho-maria” à temperatura de 37°C. As amostras foram oxigenadas (oxigênio a 100%). Após 5 minutos de agitação, as células foram separadas por filtração e centrifugação por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em solução de 750 μM de

CaCl₂. Esse processo foi repetido duas vezes. As células foram armazenadas em placas de Petri à 5°C para, na sequência, serem utilizadas.

As soluções utilizadas para o isolamento dos miócitos ventriculares foram feitas usando-se solução básica com água milli-Q, com a seguinte composição (em mM): NaCl (130); MgCl₂ (1,43); KCl (5,4); N-2-hidroxietil piperazina N-2-etanosulfônico (HEPES) (5); glicose (10); taurina (20); creatina (10); pH = 7,3, temperatura ambiente. Para elaboração da solução de isolamento contendo Ca²⁺ foram adicionados à solução básica 750 μM de CaCl₂. Para a solução de isolamento livre de Ca²⁺ foram adicionados à solução básica 0,1 mM de EGTA. A exemplo do Protocolo 1, vísceras de interesse foram obtidas e pesadas.

3.2.2.4 – Contração-relaxamento dos cardiomiócitos

As medidas de contração-relaxamento foram feitas pela medida de alteração do comprimento dos miócitos usando-se o sistema de detecção de bordas montado num microscópio invertido com uma lente objetiva de 40 vezes (Nikon Eclipse – TS100, EUA). Os miócitos foram acomodados em uma câmara experimental circular com base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão bicarbonato à temperatura ambiente. A solução de perfusão tampão bicarbonato era composta por (em mM): Na⁺ (135); K⁺ (5); Mg²⁺ (1); Cl⁻ (102); HCO₃²⁻ (20); SO₄²⁻ (1); Ca²⁺ (1); acetato (20); glicose (10) e insulina (5 u/l). Esta solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida à temperatura ambiente (26 a 28°C). Para uma célula ser selecionada para análise ela tinha que estar isolada das demais, imóvel quando na ausência de estimulação, com bordas nítidas, estriações sarcoméricas bem definidas e com contração-relaxamento sem aparente anormalidade.

As células foram estimuladas a 1 Hz (por 30 segundos) através de um par de eletrodos acoplados à câmara, utilizando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). As células foram visualizadas em um monitor de um computador com auxílio de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com frequência de amostragem de 200 Hz.

As bordas das células foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda). A definição das bordas foi ajustada através do contraste gerado pela qualidade da imagem projetada das células. Os sinais capturados foram armazenados em um computador para posterior análise. A amplitude de contração (percentual de encurtamento) e as velocidades máximas de contração e relaxamento foram avaliadas.

3.2.2.5 - Procedimento de análises da contratilidade-relaxamento e número de células analisadas por animal.

Três gotas da solução contendo células eram colocadas na câmara experimental. A câmara experimental continha 1 mL de solução de perfusão tampão bicarbonato. Inicialmente, os miócitos selecionados eram estimulados a 1 Hz para registro das medidas de contratilidade-relaxamento na condição basal (medida basal). Em seguida, limpava-se a câmara, adicionavam-se novos miócitos e acrescentava-se 300 microlitros de solução contendo L-NAME e, após 1 minuto, repetia-se a estimulação (1 Hz) e o registro das medidas de contratilidade-relaxamento (medida pós-droga). Ressalta-se que esta solução com L-NAME foi previamente preparada utilizando-se solução de perfusão tampão bicarbonato, sendo ajustada para que quando adicionada à câmara experimental apresentasse concentração de 0,2 mM de L-NAME. Esta concentração de L-NAME *in vitro* inibe quase completamente a atividade de enzimas NOS purificadas (Pfeiffer et al 1996). Foram analisadas 7 células por animal na condição basal e 4 células por animal na condição pós-droga.

Em um estudo piloto realizado para direcionar as análises do presente estudo não foram encontradas alterações contráteis induzidas por concentrações menores de L-NAME (0,05 mM e 0,1 mM). Além disso, no experimento propriamente dito, os mesmos procedimentos analíticos descritos no parágrafo anterior foram também realizados para duas outras concentrações de L-NAME (1 mM e 2 mM). Entretanto os resultados foram similares aos encontrados para a concentração de 0,2 mM e, por isso, apenas os resultados obtidos com a concentração de 0,2 mM estão apresentados nesse estudo.

3.3 - Extração e análises das proteínas por Western blotting

3.3.1 - Determinação da expressão protéica das isoformas Hsp72 e Hsp73.

Amostras do VE foram pulverizadas com nitrogênio líquido usando um mortár (Fisher Scientific, USA) e em seguida homogeneizadas em tampão gelado (600 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH 7,5). Após 5 min no gelo, os tecidos homogeneizados foram centrifugados (14.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi usado para determinação da concentração de proteínas pela técnica de Bradford (reagente Bio-Rad, USA). Extratos de proteínas (75 µg) foram separados por eletroforese (7,5% SDS-PAGE; 40 Volts; ~ 20 h) em tampão de corrida (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,05% SDS). Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas polivinilideno difluoreto (Amersham, USA) usando um sistema de transferência de proteínas (*Trans-Blot Cell system*; Bio-Rad, USA) em tampão (25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% metanol, 0,05% SDS).

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado e em seguida incubadas por ~12 h, em 4°C, com anticorpo monoclonal anti-Hsp70 (1:1.000, Sigma-Aldrich) que reconhece as isoformas Hsp72 e Hsp73. Depois de lavadas (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% *Tween* 20) as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (1:2.000, Bio-Rad, USA). Os imunocomplexos foram detectados usando o sistema de quimioluminescência a partir do luminol catalizada pela *horseradish peroxidase* (ECLPlus, Amersham) e submetida a autoradiografia (Hyperfilm ECL, Amersham). Os *blots* foram quantificados com o software Scion Image. Considerando que eventos de estresse podem apenas muito levemente aumentar a expressão de Hsp73, cuja expressão retorna rapidamente (~ 4 h) para os níveis basais (Hernando e Manso, 1997; González e Manso, 2004), sua expressão total foi usada como controle interno para normalização da expressão de Hsp72.

3.3.2 - Controle positivo para Hsp72 - um rato Wistar adulto não submetido a qualquer tratamento foi anestesiado com cetamina:xilazina (cetamina: 90 mg.kg⁻¹; 10%; xilazina: 10 mg.kg⁻¹; 2%; i.p.) e, em seguida, colocado em uma câmara fechada contendo orifícios para permitir a entrada de ar ambiente. Um termômetro digital foi inserido no reto intestinal do animal para permitir a aferição da

temperatura. A temperatura corporal foi aumentada para 42°C por 15 min com auxílio de um secador Taiff®. Após o estresse térmico, permitiu-se a recuperação do animal por 24 h. Em seguida, o animal foi eutanasiado e fragmentos do VE foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80°C para posterior verificação da expressão de Hsp72.

3.3.3 - Determinação da expressão protéica da SERCA cardíaca (SERCA2a), RyR cardíaco (RyR2), trocador de Na⁺/Ca²⁺ sarcoplasmático (NCX), eNOS, iNOS e nNOS total e isoformas fosforiladas (p-NOS).

Fragmentos do VE foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150mM; Tris 50mM; EDTA 2Na⁺ 5mM; MgCl₂ 1mM) acrescido de 0,1% *nonidet P40*, que é um solubilizador de proteínas de membranas com ação protetora contra íons peróxidos, de 1% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Para a determinação das proteínas fosforiladas também foram utilizados inibidores de fosfatase (NaF 20mM; Na₃VO₄ 0,1mM). Utilizou-se a proporção de 25 mg de tecido para 100 µl de tampão de lise enriquecido com coquetel de inibidores de proteases. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1954).

As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6% β-mercaptoetanol). Para separação foram aplicados 50 µg de proteína em gel de SDS-PAGE. Para o gel de concentração utilizou-se concentração de 4% e para o gel de separação 5-15%.

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF; Millipore®, USA) com poro de 0,45 µm. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada durante todo o período noturno em câmara fria (6-8°C) com o anticorpo primário específico. Os seguintes

anticorpos primários foram utilizados: anti-SERCA2a policlonal, anti-NCX monoclonal e anti-RyR2 policlonal (1:2.000); anti-eNOS, anti-nNOS, anti-iNOS, anti-p-eNOS^{Ser1177}, anti-p-eNOS^{Thr495}, anti-p-nNOS^{Ser852} (Policlonal; 1:1.000); e anti- β -actina monoclonal (1:3.000). Esses anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Por último, o anticorpo para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (anti-GAPDH; 1:3.000) adquirido da empresa Sigma, St. Louis, MO.

Após incubação com o anticorpo, as membranas foram lavadas com TBS contendo 0,3% de Tween 20 por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:5.000, *anti-goat IgG-HRP* e *anti-rabbit IgG-HRP*, Sigma, St.Louis, MO). Após o período de incubação as membranas foram novamente lavadas em Tween 20 (três vezes, 5 minutos cada). As bandas protéicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil LTDA) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software Image J 1.40g. Foram utilizados o sistema *Mini Protean III-Tetracell* e *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad®, CA, USA).

As expressões da GAPDH e β -actina foram realizadas para permitir a normalização das expressões protéicas (Expressão normalizada = expressão da proteína de interesse/GAPDH ou beta-actina).

3.4 - Medida da atividade das NOS

O método usado baseia-se na estimativa da atividade das enzimas NOS pela conversão de L-arginina em L-citrulina desenvolvido a partir dos ensaios descritos por McKee et al. (1994).

Fragmentos do VE foram homogeneizados por meio de ondas de ultra-som em 1 mL de tampão contendo: 20mM HEPES pH 7,4; 0,32 M Sacarose; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 1,0 mM PMSF; 10 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL aprotinina. Em seguida, essa suspensão de tecido foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da enzima NOS. Do sobrenadante, 500 μ l foram aplicados em uma coluna de 0,3 ml de resina DOWEX 50WX8 200-400 na forma sódica para retirar a L-arginina endógena.

Após a determinação da concentração protéica da amostra por kit Bio-Rad, as amostras foram diluídas para a concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C em 200 μL de meio reacional contendo: 100 μM de L-arginina (0,5 μCi), 4 μM de FAD, 4 μM de FMN, 10 μM de BH_4 , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Calmodulina, e 1mM de NADPH e 100 μL de amostra. Para interromper a reação, os tubos foram colocados no gelo, e 1mL de HEPES 20 mM pH 5,5 foi adicionado. O volume total contido no tudo de reação foi transferido para uma coluna com 0,3 ml de resina DOWEX na forma sódica, recolhendo-se o eluato num recipiente para espectrofotometria. Para lavar a resina e garantir máxima recuperação do produto, outros 1 mL de HEPES pH 5,5 e 1 mL de água destilada foram aplicados à coluna, recolhendo-se também o eluato no mesmo recipiente. Do líquido de cintilação (Ultima Gold™) 8 mL foram adicionados ao recipiente e a atividade presente na amostra foi determinada com o auxílio de um contador de radiação β . As contagens em c.p.m. (contagem por minuto) foram convertidas para d.p.m. (decaimento por minuto) e a atividade específica das NOSs foi calculada em $\text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de citrulina.

O controle negativo, usado como o branco da reação, foi obtido usando-se o mesmo procedimento de uma amostra em que se adicionou tampão de homogeneização no lugar da amostra.

3.5 – Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes quando o interesse foi comparar médias de dois grupos; o teste de análise de variâncias (ANOVA) de duas vias seguido do *post-hoc* de Tukey quando o interesse foi identificar efeitos de dois fatores (ex: exercício e L-NAME) e a interação entre esses fatores em relação a uma variável de interesse; e o teste de correlação de Pearson para identificar uma possível correlação entre a expressão de Hsp72 cardíaca com PAS, PAD e PSVE. Os testes foram bicaudais com alfa máximo tolerado de 5% ($p = 0,05$).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 – Protocolo 1

Perda amostral – Durante o experimento, dois animais (15%) do grupo E1 foram excluídos por não conseguirem cumprir o protocolo de exercício. No grupo EL1, cinco animais (25%) foram excluídos por não conseguirem cumprir o protocolo de exercício, e outros cinco animais (25%) morreram durante o experimento. As mortes ocorreram nas horas seguintes à sessão de treinamento (período noturno) e sempre entre o antepenúltimo e último dia de experimento. Portanto, os resultados descritos a seguir referem-se aos animais que completaram os protocolos experimentais.

Pesos corporal e visceral e comprimento da tibia – Não foram encontradas diferenças entre os quatro grupos experimentais para os pesos corporal inicial e final, pesos dos ventrículos absoluto e normalizado pelo comprimento da tibia, e pesos dos pulmões e glândulas adrenais (Tabela 1).

Ingestão hídrica – Para a ingestão hídrica diária estimada não houve diferença estatística entre os grupos tratados com L-NAME (L1 vs. EL1; 34 ± 1 vs. 34 ± 1 mL/dia; $p > 0,05$). Conseqüentemente, o consumo de droga também foi similar (~ 24 mg/dia). A ingestão de água diária foi significativamente maior ($p < 0,05$) para os grupos não tratados com L-NAME (C1 = 44 ± 1 e E1 = 43 ± 1 mL/dia; $p > 0,05$ entre C1 vs. E1) quando comparados com os grupos tratados, portanto evidenciando efeito para o fator droga.

Hemodinâmica e contratilidade do ventrículo esquerdo – O tratamento com L-NAME aumentou significativamente a pressão sanguínea e a PSVE no grupo não exercitado (grupo L1) quando comparado aos demais grupos. O exercício físico impediu o aumento da pressão sanguínea e da PSVE induzido por L-NAME (grupo EL1). As intervenções com L-NAME ou exercício não alteraram a frequência cardíaca, pressão diastólica final ou dP/dT positiva e negativa do VE. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Pesos corporal e visceral e comprimento da tíbia dos grupos experimentais referentes ao Protocolo 1.

Grupos	Controle (C1; n: 12)	L-NAME (L1; n: 12)	Exercício (E1; n: 11)	Exercício + L-NAME (EL1; n: 10)	Interação entre os fatores Exercício vs. L-NAME
PC inicial (g)	338±8	348±8	338±6	338±9	p = 0,77
PC final (g)	369±11	359±11	357±11	346±12	p = 0,94
Tíbia (cm)	3,56±0,03	3,52±0,03	3,53±0,03	3,53±0,03	p = 0,37
VE (g)	0,74±0,02	0,76±0,02	0,75±0,03	0,76±0,02	p = 0,42
VD (g)	0,20±0,01	0,22±0,01	0,22±0,01	0,21±0,01	p = 0,06
VE/Tíbia (g/cm)	0,211±0,007	0,216±0,006	0,216±0,006	0,209±0,006	p = 0,35
VD/Tíbia (g/cm)	0,059±0,003	0,063±0,003	0,063±0,003	0,057±0,003	p = 0,06
Pulmões (g)	1,78±0,06	1,83±0,07	1,73±0,06	1,62±0,07	p = 0,28
Adrenais (mg)	50±3	45±30	44±3	50±3	p = 0,10

PC = peso corporal; VE = ventrículo esquerdo; VD = ventrículo direito. Dados apresentados como média±EPM; Análise de variância de duas vias.

Tabela 2. Dados hemodinâmicos dos grupos experimentais referentes ao Protocolo 1.

Grupos	Controle (C1; n: 10)	L-NAME (L1; n: 10)	Exercício (E1; n: 11)	Exercício + L-NAME (EL1; n: 9)	Interação entre os fatores Exercício vs. L-NAME
PAS (mmHg)	131±5 #	157±4 * #	130±5	122±6 *	p = 0,01
PAD (mmHg)	101±4 #	124±4 * #	98±4	94±4 *	p = 0,01
PAM (mmHg)	112±4 #	135±5 * #	109±4	103±4 *	p < 0,01
FC (bpm)	247±10	237±4	215±10	236±11	p = 0,16
PSVE (mmHg)	133±5 #	150±5 * #	135±5	131±5 *	p = 0,04
PDFVE (mmHg)	9±1	10±1	10±1	7±1	p = 0,08
dP/dT+ (mmHg/s)	5406±285	5482±301	4876±272	5305±301	p = 0,55
dP/dT- (mmHg/s)	4248±265	4240±280	3770±253	4129±278	p = 0,50

PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca; PSVE = pressão sistólica ventricular esquerda; PDFVE = pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; dP/dT+ e - = derivada máxima positiva e negativa de pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo. Dados apresentados como média±EPM; p < 0,05 para símbolos iguais (* e #) na mesma variável. Análise de variância de duas vias seguida do *post-hoc* de Tukey. Apenas as diferenças estatísticas que são pertinentes ao estudo estão apresentadas na tabela.

Expressão das Hsp72 e Hsp73 – Como esperado, a expressão da isoforma constitutiva Hsp73 foi similar entre os grupos C1 (9.838±776 unidades arbitrárias - U.A.), L1 (9.635±455 U.A.), E1 (9.132±449 U.A.) e EL3 (9.765± 413 U.A.). A expressão absoluta de Hsp72 e a expressão relativa de Hsp72 (razão Hsp72/Hsp73) foram significativamente maiores no VE dos animais do grupo E1 quando comparado ao grupo C1. Houve também interação entre os fatores exercício e L-NAME ($p < 0,001$). De fato, a expressão cardíaca de Hsp72 foi muito maior no VE dos animais submetidos concomitantemente ao L-NAME e exercício (grupo EL1) em comparação aos demais grupos. A Figura 3 apresenta os resultados referentes à expressão de Hsp72 absoluta e normalizada. Ressalta-se que nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão de Hsp72 vs. PAS ($r = -0,13$; $p = 0,6$), ou PAD ($r = -0,05$; $p = 0,8$) ou PSVE ($r = -0,02$; $p = 0,9$).

Expressão das enzimas eNOS, iNOS e nNOS e isoformas fosforiladas (p-NOS)

Na Figura 4 estão apresentados os resultados referentes à expressão das enzimas eNOS, nNOS e iNOS normalizadas pela β -actina, das p-eNOS^{Thr495} e p-eNOS^{Ser1177} normalizadas pela eNOS total e da p-nNOS^{Ser852} normalizada pela nNOS total.

Não houve qualquer alteração induzida pelo exercício (grupo E1), L-NAME (grupo L1) ou pela associação exercício+L-NAME (grupo EL1) na expressão da eNOS, iNOS e p-eNOS^{Thr495}. O exercício isoladamente também não alterou a expressão de qualquer isoforma NOS ou p-NOS. No grupo L1 as expressões de nNOS e p-nNOS^{Ser852} aumentaram significativamente quando comparadas ao grupo C1. No grupo EL1 foi evidenciado aumento da expressão da p-eNOS^{Ser1177} e redução da p-nNOS^{Ser852} em comparação aos demais grupos, portanto mostrando que houve interação entre os fatores exercício e L-NAME.

Atividade das NOS – Os resultados para a atividade total das NOSs obtida pela conversão de L-arginina para L-citrulina estão representados na Figura 5. Não houve diferença estatística entre os quatro grupos.

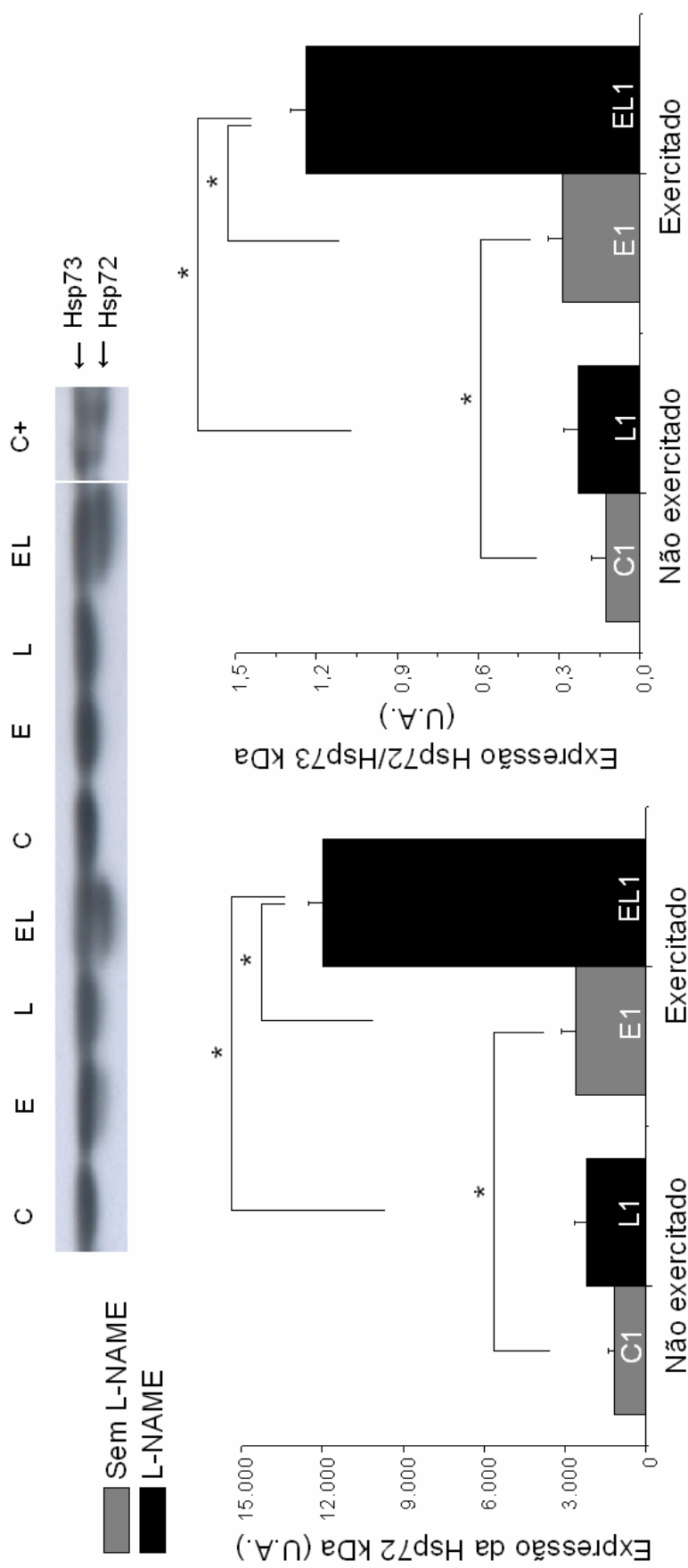


Figura 3. Expressão da proteína de estresse Hsp72 e razão Hsp72/Hsp73 no ventrículo esquerdo de ratos não exercitados, não tratados (grupo C1) ou tratados com L-NAME (grupo L1), e de ratos exercitados, não tratados (grupo E1) ou tratados com L-NAME (grupo EL1). U.A. = unidades arbitrárias. C+ = controle positivo; Dados apresentados como média±EPM; * = $p < 0,05$ entre colunas demarcadas por barra horizontal; Análise de variância de duas vias seguida do *post-hoc* de Tukey. Apenas as diferenças estatísticas mais relevantes à interpretação dos resultados estão apresentadas na figura. O Western blotting foi realizado de amostras do VE obtidas de 6 animais de cada grupo.

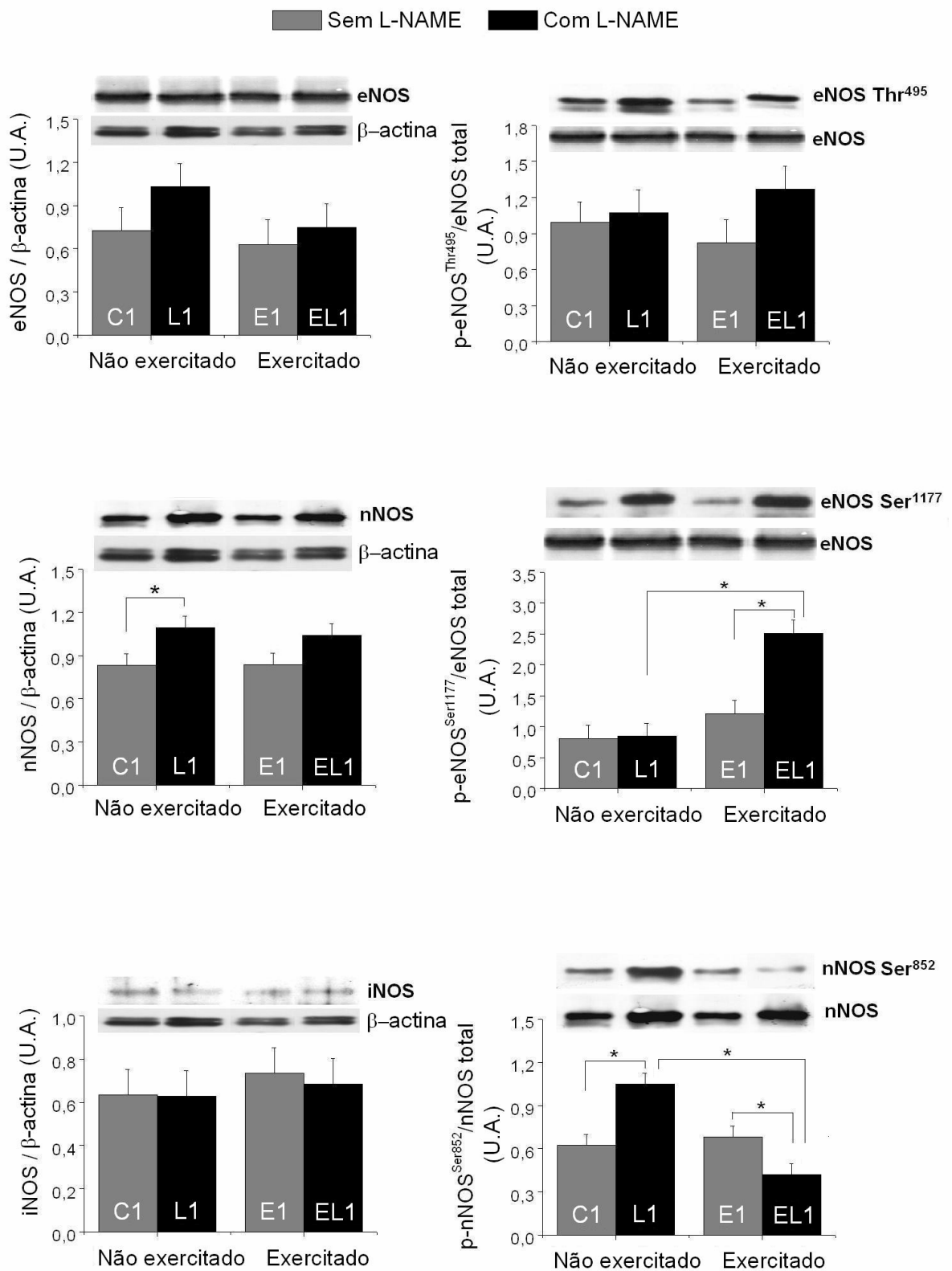


Figura 4. Expressão das sintase de óxido nítrico (NOS) e NOS fosforiladas (p-NOS) no ventrículo esquerdo de ratos não exercitados, não tratados (grupo C1) ou tratados com L-NAME (grupo L1), e de ratos exercitados, não tratados (grupo E1) ou tratados com L-NAME (grupo EL1). U.A. = unidades arbitrárias; Dados apresentados como média \pm EPM; * = $p < 0,05$ entre colunas demarcadas por barra horizontal; Análise de variância de duas vias seguida do *post-hoc* de Tukey. Apenas as diferenças estatísticas mais relevantes à interpretação dos resultados estão apresentadas na figura. O Western blotting foi realizado de amostras obtidas do VE de 5 ou 6 animais de cada grupo.

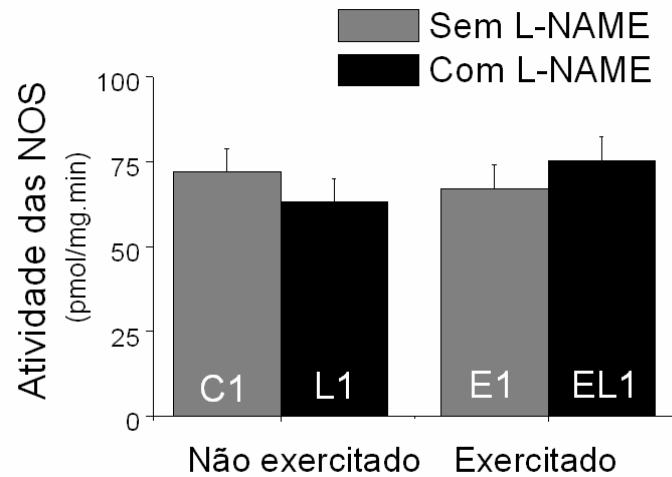


Figura 5. Atividade das sintase de óxido nítrico (NOS) no ventrículo esquerdo de ratos não exercitados, não tratados (grupo C1) ou tratados com L-NAME (grupo L1), e ratos exercitados, não tratados (grupo E1) ou tratados com L-NAME (grupo EL1). Dados apresentados como média±EPM. Análise de variância de duas vias seguida do post-hoc de Tukey. A atividade das NOS foi calculada pela concentração de [³H]L-citrulina resultante da conversão de [³H]L-arginina. As amostras foram obtidas do VE de 6 animais de cada grupo.

4.2 - Protocolo 2

Pesos corporal e visceral – Não foram observadas diferenças entre os grupos C2 e L2 para os pesos (g) corporal inicial (C2 vs. L2; 367 ± 25 vs. 376 ± 22) e final (C2 vs. L2; 392 ± 23 vs. 389 ± 18), peso dos pulmões (g) (C2 vs. L2; $1,71 \pm 0,11$ vs. $1,81 \pm 0,10$) e peso das adrenais (mg) (C2 vs. L2; 44 ± 3 vs. 48 ± 3).

Ingestão hídrica – A estimativa de ingestão hídrica por animal (mL/dia) não foi diferente entre os grupos C2 (44 ± 5) e L2 (43 ± 3). A estimativa de ingestão de L-NAME por animal do grupo L2 foi de 30 ± 2 mg/dia.

Medidas de contração-relaxamento dos cardiomiócitos – Não foram constatadas diferenças significativas para o comprimento dos cardiomiócitos em repouso entre os grupos C2 (116 ± 3 μm) e L2 (115 ± 30 μm).

Na condição basal, ou seja, antes da adição *in vitro* de L-NAME, os cardiomiócitos dos animais do grupo L2 exibiram maior percentual de encurtamento e maior velocidade máxima de contração, além de uma tendência ($p = 0,06$) a maior velocidade máxima de relaxamento, quando comparados aos cardiomiócitos do grupo C2. Após os registros na condição basal, cardiomiócitos dos grupos C2 e L2 foram expostos ao L-NAME (0,2 mM) *in vitro*. A exposição ao L-NAME aumentou as velocidades máximas de contração e de relaxamento em ambos os grupos. Para o percentual de encurtamento não foram evidenciadas alterações significativas. Os resultados das medidas de contração-relaxamento e as diferenças estatísticas entre os grupos estão apresentados na Figura 6.

Expressão da SERCA2a, do RyR2 e do NCX - Expressões da SERCA2a, RyR2 e do NCX normalizadas pela GAPDH são mostradas na Figura 7. Ressalta-se que em relação a essas proteínas as expressões de interesse foram apenas para os grupos controle (grupo C1) e tratado *in vivo* com L-NAME (grupo L1). A expressão da SERCA2a não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos. Por outro lado, as expressões do RyR2 e do NCX foram significativamente maiores para o grupo tratado *in vivo* com L-NAME.

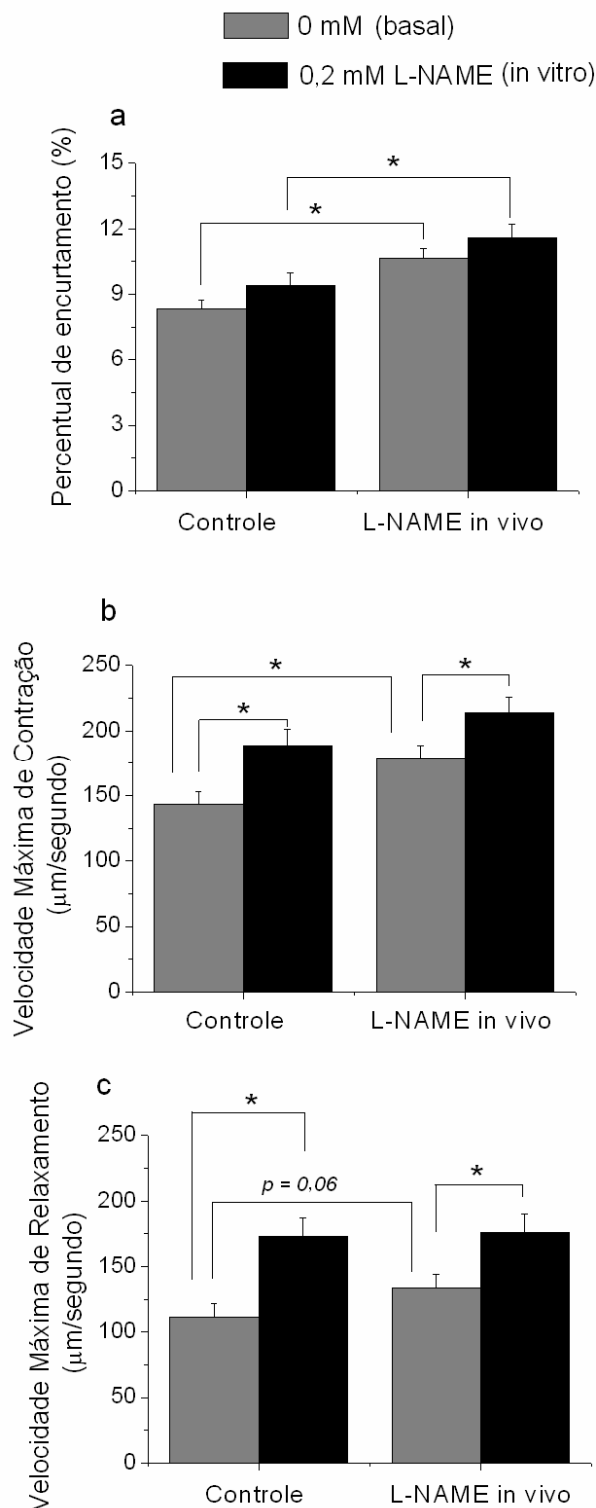


Figura 6. (a) Percentual de encurtamento celular em relação ao comprimento de repouso, (b) velocidade máxima de contração e (c) velocidade máxima de relaxamento de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos controle e tratados com L-NAME antes (basal; 0 mM) e após exposição ao L-NAME (0,2 mM) *in vitro*. Dados apresentados como média \pm EPM. * = $p < 0,05$ entre colunas demarcadas por barra horizontal. Análise de variância de duas vias seguida do *post-hoc* de Tukey. Os cardiomiócitos foram estimulados a 1 Hz em temperatura ambiente. As medidas na condição basal e pós-droga foram obtidas de 56 e 34 células, respectivamente, dos 8 ratos de cada grupo.

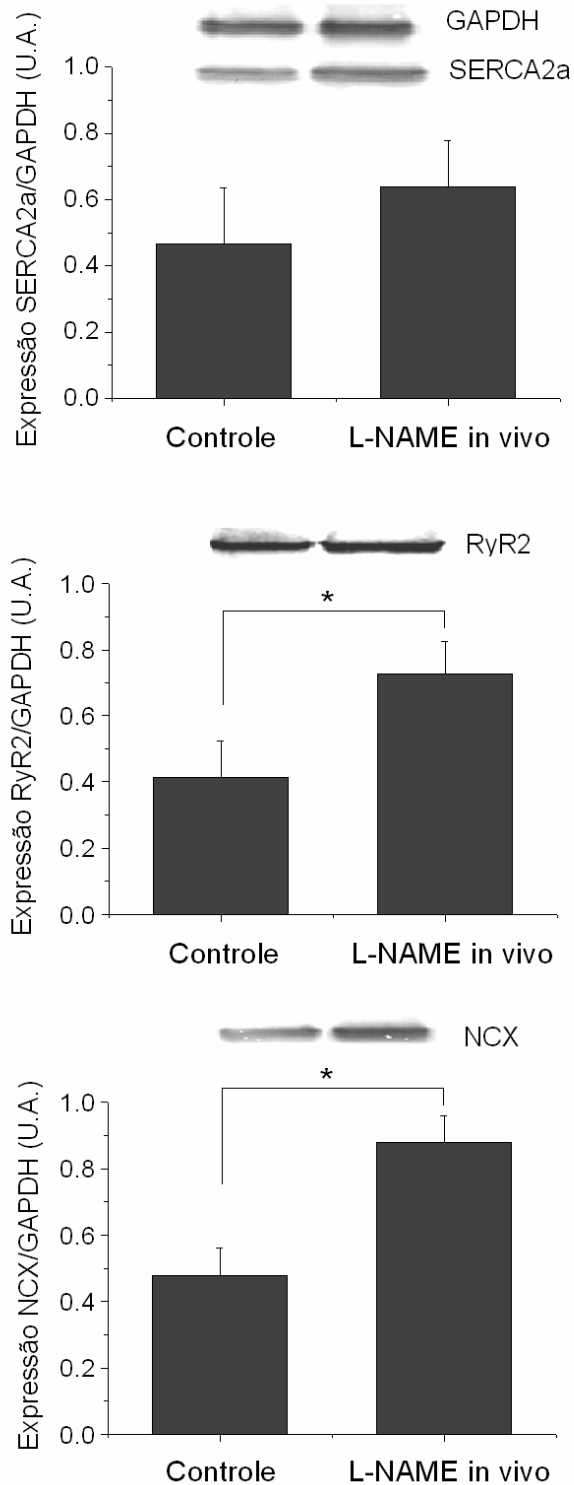


Figura 7. Expressão protéica da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), do receptor de rianodina (RyR2) e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) do ventrículo esquerdo de animais não tratados (grupo C1) ou tratados *in vivo* com L-NAME (grupo L1). U.A. = unidades arbitrárias. * = $p < 0,05$ entre colunas demarcadas por barra horizontal. Dados apresentados como média±EPM. Teste t de Student para amostras independentes. O Western blotting foi realizado de amostras obtidas de 4 a 6 animais de cada grupo.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A forte associação entre a hiperexpressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico com a cardioproteção e cardioregeneração (Noble et al., 1999; Locke et al., 1995a; Benjamin e Mcmillan, 1998; Powers et al., 2001) tem fomentado o interesse pelo mecanismo que determina o aumento da expressão de Hsp72 pós exercício.

A hipótese testada no presente estudo foi que o NO participaria da expressão cardíaca de Hsp72 induzida pelo exercício físico. Entretanto, contrária a nossa expectativa, o tratamento *in vivo* com inibidor não seletivo das enzimas NOS por sete dias amplificou em aproximadamente quatro vezes a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico no VE de ratos.

A hipótese original do nosso estudo foi formulada porque Malyshev et al. (1995 e 1996) mostraram que o NO contribuiu para a expressão de Hsp72 induzida pelo estresse térmico. Nesses estudos, Malyshev et al. (1995 e 1996) mostraram que o aumento da temperatura corporal (41°C; 15 min) aumentou a produção de NO. O pico de produção de NO ocorreu aproximadamente 1 hora após o estresse térmico. O NO, por sua vez, modulou a expressão de Hsp72 no coração e fígado de ratos (entre 45 e 75%). A expressão da Hsp72 foi mensurada 24h após o estresse térmico. Estudos posteriores em cultura de células confirmaram a importância do NO na expressão de Hsp72 (Xu et al., 1997; Kiang et al., 2002).

O exercício físico também aumenta a biodisponibilidade de NO no coração via aumento da expressão das NOSs (Zhang et al. 2007; Grijalva et al. 2008) e, principalmente, via estresse de cisalhamento na parede de vasos coronários (Kingwell 2000; Duncker e Bache, 2008).

Um estudo prévio sugeriu que o NO não participaria da expressão cardíaca de Hsp72 induzida pelo exercício físico (Taylor et al. 2007). Entretanto, o referido estudo avaliou a expressão de Hsp72 somente após isquemia/reperfusão, e tanto a atividade como a expressão das NOS não foram mensuradas pelo estudo, o que limitou a interpretação do resultado.

No presente estudo, a expressão das NOS total e NOS fosforiladas, assim como a atividade das NOS foram mensuradas para melhor compreender a hipotética participação do NO na expressão de Hsp72 no coração de ratos exercitados.

No presente estudo os resultados encontrados para a expressão das NOSs e p-NOS não apresentaram um padrão similar. A regulação *in situ* da expressão e atividade das NOS tem se apresentado muito complexa. Por exemplo, a atividade da eNOS cardíaca ou vascular parece envolver a fosforilação de vários sítios de resíduos serina-treonina (ex: Ser1177, Thr495, Ser114, Ser615, Ser617, Ser633 e Ser635) além de fosfatases específicas (Mount et al., 2007; Zhang et al., 2009). Atualmente sabe-se também que o fluxo de Ca^{2+} não é o único responsável pela ativação das cNOS (Mount et al., 2007), e que . Além disso, mitocôndrias contém sua própria isoforma de NOS denominada 'mtNOS' (Brookes 2004) que aparentemente tem importante impacto para a produção de NO no coração (Ghafourifar e Sen 2007; Zaobornyj et al 2009). Foi demonstrado também que o aumento da fosforilação da isoforma estimulatória nNOS^{Ser1412} é contrabalanceada por aumento da fosforilação da isoforma inibitória nNOS^{Ser847} (Mount et al 2006). O próprio NO, produto das NOS, regula negativamente (via *feedback* negativo) a atividade (Alderton et al 2001) e expressão (Vaziri e Wang, 1999) das NOS. Esse conjunto de informações sugere que a regulação das NOSs é bastante sofisticada e complexa.

Essa regulação refinada das NOS poderia explicar alguns dos nossos resultados. Por exemplo, o grupo tratado com L-NAME isoladamente aumentou a expressão de p-nNOS^{Ser852}, a qual está associada com inibição da atividade da nNOS em vários tecidos (Mount et al., 2006; Osuka et al., 2002; Rameau et al., 2004), mas também promoveu aumento da expressão total de nNOS, possivelmente na tentativa de compensar a menor atividade causada pela p-nNOS^{Ser852}. Uma produção compensatória de NO no miocárdio de ratos tratados com L-NAME poderia manter a produção de NO em um estado de equilíbrio e explicar a razão pela qual a atividade das NOSs medida pela conversão de [³H]L-arginina para [³H]L-citrulina foi similar entre os grupos experimentais.

A fosforilação da eNOS no sítio Thr495, que participa da inibição da eNOS (Mount et al., 2007), e a fosforilação da eNOS no sítio Ser1177 que é considerado o mais importante sítio estimulatório da eNOS (Mount et al., 2007) não apresentaram alteração significativa de expressão no grupo tratado apenas com L-NAME. O mesmo ocorreu em relação à expressão da eNOS e iNOS total. Esses resultados sugerem que o tratamento com L-NAME por curto prazo não é suficiente para induzir compensação da expressão dessas isoformas.

O exercício físico isoladamente também não alterou a expressão das NOSs e p-NOS. Considerando que protocolos de maior duração (ex: 4 a 10 semanas) aumentam a expressão de NOSs e p-NOS no miocárdio de ratos (Zhang et al., 2007; Grijalva et al. 2008) e endotélio coronariano de humanos (Hambrecht et al., 2003), é possível que a ausência de resultados significativos tenha ocorrido em virtude do protocolo de curto prazo utilizado no presente estudo. O exercício físico também não alterou a atividade das NOS medida pela conversão de L-arginina para L-citrulina. Esses resultados, em conjunto, contribuem para a sugestão de que o aumento da expressão de Hsp72 induzido pelo exercício físico não seja diretamente dependente do NO.

Houve interação dos fatores L-NAME e exercício físico (grupo EL) para a expressão da p-eNOS^{Ser1177}. Não foram encontrados outros estudos que tenham avaliado os efeitos conjuntos do exercício e L-NAME na expressão cardíaca da p-eNOS^{Ser1177}. Considerando que a fosforilação da eNOS no sítio Ser1177 é explicada por vários mecanismos incluindo a quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), a via fosfatidilinositol 3 quinase/Akt, as PKA e PKG, o fluxo de Ca²⁺, peróxido de hidrogênio e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Mount et al., 2007), investigações futuras serão necessárias para compreender o mecanismo pelo qual a interação exercício+L-NAME induz aumento da p-eNOS^{Ser1177}. No sentido de orientar novas investigações, um importante candidato é o AMPK.

O AMPK é uma enzima sensível ao estresse metabólico, sendo considerado um controlador chave do metabolismo energético do coração sob estresse (Dyck e Lopaschuk, 2006). O AMPK é hiperativado durante aumento agudo do trabalho cardíaco (Coven et al., 2003; Dyck e Lopaschuk, 2006). O AMPK contribui de forma importante para a fosforilação da eNOS^{Ser1177} durante o exercício físico, ao menos em células do endotélio vascular (Zhang et al. 2009), e o L-NAME também aumenta a fosforilação do AMPK (Jin et al 2009).

É interessante destacar que também houve interação dos fatores exercício e L-NAME na expressão da p-nNOS^{Ser852}, o que causou redução da expressão desta isoforma. Como a interação exercício+L-NAME diminuiu a expressão da p-nNOS^{Ser852} que está envolvida na inibição da nNOS, e aumentou a expressão da p-eNOS^{Ser1177} que está envolvida na estimulação da eNOS, poderia-se especular que a produção de NO no coração dos animais do grupo EL1 estivesse aumentada.

Entretanto, ao se utilizar a técnica que mensura a atividade das NOS *in vitro* a partir da conversão de L-arginina para L-citrulina não houve confirmação de maior produção de NO no VE dos animais do grupo EL1. Esse resultado também contribui para sugerir que a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício+L-NAME também não seja diretamente modulada pelo NO. Além disso, esse resultado fortalece o raciocínio de que há uma regulação refinada das NOS para manter a produção de NO em estado de equilíbrio. É possível especular que a fosforilação aumentada de outros sítios serina/treonina não mensurados no presente estudo possa ter contribuído para o estado de equilíbrio de produção de NO.

Outro ponto de discussão refere-se ao fato de que o tratamento com L-NAME aumentou a pressão sanguínea, mas a atividade das NOSs não foi alterada por este mesmo tratamento. O aumento da pressão sanguínea induzido pelo L-NAME é uma resposta já bem caracterizada (Ribeiro et al., 1992; Chen e Hu, 1997; Zats e Baylis, 1998). O mesmo pode-se afirmar em relação a inibição da atividade das NOSs no coração após intervenção aguda com L-NAME (Huckstorf et al., 1994; Malyshev et al., 1995; Pfeiffer et al., 1996; Vergely et al., 2002; Arnaud et al., 2003; Ramchandra et al., 2003; Williams et al., 2008; Khan et al., 2009). Entretanto, não há confirmação se a intervenção crônica com L-NAME seja capaz de inibir a atividade das NOSs no VE de roedores.

De fato, vários estudos têm mostrado que ratos ou camundongos tratados com L-NAME em diferentes quantidades (~ 1 a 50 mg/kg/dia) e com diferentes durações (2 a 60 dias) demonstram aumento compensatório da eNOS (Sampaio et al., 2002), nNOS (Suda et al., 2002), iNOS (Miller et al., 1996; Darblade et al., 2001; Suda et al., 2002), NOS mitocondrial (Zaobornyj et al., 2009), atividade ou expressão das NOSs em vários tecidos (Miller et al., 1996; Henningsson et al., 2000; Coelho-Filho et al., 2001; Darblade et al., 2001; Suda et al., 2002; Bernátová et al., 2007) incluindo o miocárdio (Sampaio et al., 2002; Suda et al., 2002; Zaobornyj et al., 2009).

É interessante pontuar que a maioria dos estudos tem estimado a inibição das isoformas NOS no coração usando como marcadores as alterações da pressão sanguínea (Jover et al., 1993; Moreno et al., 1995, Numaguchi et al., 1995; Pessanha e Mandarim-de-Lacerda, 2000; Sampaio et al., 2002; Arnaud et al., 2003; Dutra-de-Souza et al., 2007; Gazzoto et al., 2008; Ricchiuti et al., 2009), ou concentrações de nitrito/nitrato no plasma e soro sanguíneo (Coelho-Filho et al.,

2001; Taylor et al., 2007), ou aumento da pressão de perfusão coronariana e/ou redução do fluxo coronário (Huckstorf et al., 1994; Pfeiffer et al., 1996; Arnaud et al., 2001; Vergely et al., 2002). Esses marcadores da inibição das NOS, entretanto, podem não ser apropriados para se avaliar a inibição crônica das NOSs no coração.

Especula-se que até mesmo o bem conhecido efeito hipertensivo do L-NAME seja causado ou pelo sistema nervoso simpático (Zatz e Baylis 1998), ou pela inibição das NOSs em áreas específicas do sistema nervoso central ou renal (Ramchandra et al 2003) ou ainda por efeitos colaterais como regulação aumentada de enzimas conversora de angiotensina (Suda et al., 2002).

A medida de nitrito/nitrato também exhibe limitações como marcadores da produção de NO *in situ* (Moshage 1997; Sampaio et al., 2002), em particular nos estudos de maior duração. Por exemplo, a administração de L-NAME (1mg/1mL; 8 semanas) diminuiu a concentração de nitrito/nitrato no plasma e urina de camundongos, mas não afetou significativamente a produção local de NO de artérias coronárias de corações isolados (Suda et al., 2002). Dessa forma, o uso crônico do L-NAME como estratégia para inibição das NOSs no coração deve ser feito com cautela, e para a confirmação da inibição *in situ* torna-se necessário o uso de métodos mais sensíveis e específicos (Moshage 1997).

Como discutido previamente os resultados do presente estudo não permitem sugerir que o NO esteja diretamente envolvido na expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico, ou pelo exercício+L-NAME. Por outro lado, os resultados encontrados permitem um novo questionamento: Por que o L-NAME amplificou a expressão cardíaca de Hsp72 em ratos exercitados?

Inicialmente poderia-se especular que o aumento da pressão sanguínea, seguido do conseqüente aumento da pós-carga cardíaca, seria o fator causal, uma vez que o estresse mecânico também está positivamente associado com a expressão de Hsp72 (Delcayre et al., 1988; Knowlton et al., 1991; Xu et al., 2000). Entretanto, não foi evidenciada qualquer correlação entre a expressão de Hsp72 vs. as pressões sanguínea e ventricular esquerda. Além disso, o grupo EL1 que apresentou a maior expressão de Hsp72 no VE teve pressões sanguínea e ventricular menor em relação ao grupo apenas tratado com L-NAME.

Ressalta-se que o exercício físico é capaz de prevenir a hipertensão induzida pelo L-NAME (Husain 2002; Kuru et al., 2002 e 2009) e o mecanismo sugerido é o aumento da produção de NO do endotélio vascular periférico, em particular artérias

de resistência (Kuru et al., 2002 e 2009). Embora seja necessário ressaltar que a vasodilatação dependente do endotélio promovida pelo exercício físico também ocorra por mecanismos que independem do ON (Woodman et al., 2003; Sugawara et al., 2004). De qualquer maneira, considerando que no presente estudo não foram avaliadas a reatividade de artérias ou atividade e expressão das NOSs em vasos de resistência, e, adicionalmente, que os animais do grupo EL1 apresentaram maior estresse ao exercício físico evidenciado tanto pela maior expressão de Hsp72 quanto por algumas mortes, não é possível afirmar que as menores pressões sanguínea e ventricular encontrada no grupo EL1 sejam respostas fisiológicas ao exercício.

Os resultados encontrados no presente estudo também permitem sugerir que hiperexpressão cardíaca de Hsp72 evidenciada nos corações de ratos exercitados e tratados com L-NAME não é diretamente explicada por menor produção de NO. *Primeiro*, a produção de NO nos corações dos animais estudados foi similar entre todos os grupos; *segundo*, a expressão de Hsp72 foi muito maior no grupo EL1; *terceiro*, a frequência de ratos que não concluiu o protocolo de exercício foi muito maior no grupo EL1 sugerindo que os ratos desse grupo foram submetidos a um esforço físico maior e, como consequência, fadigaram precocemente; *quarto*, somente a intervenção concomitante do exercício e L-NAME causou mortes de animais, o que sugere estresse patológico.

Dessa forma, muito provavelmente a hiperexpressão de Hsp72 evidenciada no coração de ratos do grupo EL1 tenha ocorrido em resposta a estresse patológico. De fato, recentemente foi constatada maior fibrose cardíaca em ratos que exercitaram por 8 meses e que foram tratados com L-NAME nos últimos sete dias quando comparados a ratos apenas tratados com L-NAME (Dutra-de-Souza et al 2007).

Portanto, ao menos dois mecanismos poderiam ser sugeridos para explicar o aumento de Hsp72 no coração de ratos concomitantemente exercitados e tratados com L-NAME: 1º) lesões cardíacas induzidas por isquemia; ou 2º) produção aumentada de radicais livres.

Quanto às lesões cardíacas induzidas por isquemia, a administração com L-NAME reduz o fluxo sanguíneo coronário (Huckstorf et al., 1994; Moreno Jr et al., 1996 e 1997; Kingwell, 2000; Vergely et al., 2002; Taylor et al., 2007; Williams et al., 2008), e a administração de L-NAME (Moreno et al., 1995, 1996 e 1997; Oliveira et

al., 2000; Coelho-Filho et al., 2001; Sampaio et al., 2002; Neves et al., 2006) promove alterações isquêmicas no coração como inflamação (Neves et al., 2006), fibrose e necrose tecidual especialmente em regiões do subendocárdico (Moreno et al., 1995, 1996 e 1997; Coelho-Filho et al., 2001; Sampaio et al., 2002; Neves et al., 2006). Esses efeitos ocorrem independentemente de alterações da pressão sanguínea, hipertrofia do VE ou do sistema renina-angiotensina (Moreno et al., 1995 e 1996; Suda et al., 2002). A isquemia causa danos teciduais, aumenta proteases ativadas pelo Ca^{2+} (Benjamin e McMillan, 1998) e aumenta o estresse oxidativo (Vergely et al 2002). Em resposta, o tecido cardíaco aumenta a expressão da proteína citoprotetora Hsp72 (Kiang e Tsokos, 1998; Snoeckx et al., 2001) na tentativa de prevenir apoptose celular (Latchman, 2001).

Apesar de no presente estudo o tratamento isolado com L-NAME não ter aumentado significativamente a expressão de Hsp72, é possível que a demanda cardíaca por oxigênio aumentada pelo exercício físico (Duncker e Bache, 2008) possa ter amplificado o efeito isquêmico dependente do L-NAME.

A maior frequência de ratos do grupo EL1 que não conseguiu concluir o protocolo de exercício ou que morreu durante o treinamento também poderia ser explicada por uma menor disponibilidade de oxigênio, uma vez que a reserva de dilatação dependente do endotélio parece representar a resposta mais importante durante o treinamento para proteger o miocárdio da isquemia induzida pelo esforço físico (Kingwell, 2000).

De qualquer maneira, os resultados referentes à dificuldade dos animais do grupo EL1 em concluir o protocolo de exercício evidenciam a importância do NO para a performance física. Novos estudos precisarão investigar se a fonte fisiológica mais importante de NO para manutenção da performance física é aquela derivada do endotélio vascular periférico ou aquela derivada do endotélio vascular coronariano e de cardiomiócitos.

Em relação à produção aumentada de radicais livres, há evidências de associação positiva entre a produção de radicais livres com a expressão de Hsp72 (Benjamin e McMillan, 1998; Nishizawa et al. 1999; Snoeckx 2001). O exercício físico aumenta a produção de radicais livres no miocárdio (Móran et al 2004; Powers e Jackson 2008; Staib et al., 2009), o que aparentemente causa oxidação protéica e contribui para o aumento da expressão de Hsp72 (Staib et al., 2009).

Além disso, atualmente sabe-se que nem todo NO produzido está biodisponível (Sullivan e Pollock, 2006; Schiffrin 2008; Silberman et al., 2010). De fato, as enzimas NOS, além da produção de NO, também podem produzir ânions superóxidos (O_2^-). A maior produção de O_2^- ocorre principalmente em situações de menor quantidade do cofator BH_4 (Sullivan e Pollock, 2006; Schiffrin 2008; Silberman et al., 2010) e do substrato L-arginina (Alderton et al., 2001). Esse fenômeno é conhecido como “desacoplamento da NOS” (*NOS uncoupling*) sendo responsável pelo aumento de peroxinitrito ($ONOO^-$). O $ONOO^-$ é um potente agente oxidante capaz de alterar estruturas protéicas, danificar DNA e mitocôndrias e causar a morte celular (Ghafourifar e Sen 2007; Powers e Jackson, 2008).

Recentemente, Waard et al. (2009) evidenciaram em camundongos que o exercício voluntário e a hiperexpressão cardíaca de eNOS, isoladamente, atenuaram o remodelamento do VE e a disfunção do miocárdio após infarto. Entretanto, a combinação do exercício com a hiperexpressão de eNOS aboliu os efeitos benéficos dos tratamentos isolados. Os pesquisadores mostraram que essa associação entre exercício e hiperexpressão de eNOS causou maior produção de O_2^- . O tratamento com antioxidantes e com BH_4 e L-arginina preveniram o efeito prejudicial do exercício+eNOS, sugerindo que essa associação aumenta o estresse oxidativo via desacoplamento das NOSs. Em nosso estudo, o grupo EL1 apresentou maior expressão da isoforma estimulatória p-eNOS^{Ser1177} e menor expressão da isoforma inibitória p-nNOS^{Ser852}, o que poderia gerar um fenômeno similar ao apresentado por Waard et al. (2009). Além disso, análogos da L-arginina usados para inibir as isoformas NOS são conhecidos por aumentar o desacoplamento das NOSs (Alderton et al., 2001). É possível que a associação exercício+L-NAME amplifique este efeito. Entretanto, como não avaliamos marcadores do estresse oxidativo induzido por $ONOO^-$, essa hipótese precisará ser investigada futuramente.

Dessa forma, apesar de nossos resultados não confirmarem uma direta participação do NO na expressão de Hsp72 cardíaca, uma contribuição indireta pelo $ONOO^-$ não deveria ser descartada. A produção aumentada de $ONOO^-$ poderia explicar a sugerida hiperexpressão de Hsp72 dependente do NO encontrada por estudos prévios (Xu et al. 1997; Malyshev et al. 1995; Kiang et al. 2002). De fato, em um desses estudos foi especulado que danos protéicos causados pelo NO seriam a causa da ativação do HSF1 (Xu et al., 1997).

É essencial reconhecer que a expressão de Hsp70 é um fenômeno complexo. Por exemplo, o sucesso da ligação HSF1-HSE-DNA (Winegarden et al., 1996) e o aumento do HSF1 fosforilado dentro do núcleo do cardiomiócito (Melling et al 2004 e 2006; Staib et al., 2009) podem ser, respectivamente, insuficiente e desnecessário para se alcançar a expressão máxima da expressão de Hsp70. Além disso, Melling e colaboradores (2004, 2006, 2007 e 2009) encontraram que a expressão de Hsp72 dependente do exercício é modulada pela PKA, e não pela PKC como classicamente sugerido.

Em resumo, considerando que no presente estudo o exercício físico isoladamente aumentou a expressão de Hsp72 no VE sem promover alteração da expressão e atividade das NOS, é possível que o NO tenha pouca influência na expressão de Hsp72 induzida pelo exercício. Por outro lado, a administração com L-NAME amplificou a expressão de Hsp72 cardíaca induzida pelo exercício, possivelmente via estresse patológico induzido pela interação exercício+L-NAME.

O outro protocolo experimental realizado no presente estudo foi no sentido de compreender se o tratamento com L-NAME *in vivo* de curto prazo alteraria a dinâmica de contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados do VE de ratos. Houve também o interesse de se investigar se a estimulação aguda com L-NAME (0,2 mM) *in vitro* alteraria os parâmetros contráteis de cardiomiócitos isolados.

Os resultados evidenciaram que o tratamento com L-NAME por 7 dias aumentou a função contrátil de cardiomiócitos isolados do VE. A inibição das NOS com L-NAME *in vitro* também aumentou a função contrátil de miócitos do VE tanto em ratos não tratados quanto em ratos previamente tratados com L-NAME *in vivo*.

Inicialmente, em relação à inibição das NOS *in vitro* pelo L-NAME que aumentou as velocidades máximas de contração e relaxamento dos cardiomiócitos, esses resultados concordam com resultados de outros estudos realizados em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para eNOS ou nNOS (Ashley et al 2002; Barouch et al 2002; Sears et al 2003; Martin et al 2006; Wang et al 2008), e em cardiomiócitos de camundongos que hiperexpressam nNOS (Burkard et al., 2007) e, ainda, em cultura de miócitos de ratos adultos incubados com outros análogos de L-arginina diferentes do L-NAME (Jover et al 1993).

Embora não haja consenso, o provável mecanismo pelo qual o NO modula negativamente o acoplamento excitação-contração está relacionado à inibição do influxo intracelular de Ca^{2+} através dos canais do tipo L e inibição da via AMPc-PKA (Massion et al 2003; Seddon et al 2007). Ainda não é possível afirmar se o NO teria efeito direto ou indireto sobre essas vias. Uma possível dessensibilização mediada pela PKG da troponina I em relação ao Ca^{2+} poderia explicar o suposto efeito lusitrópico positivo dependente do NO (Massion et al 2003; Seddon et al 2007); obviamente, o L-NAME teria efeito oposto ao mencionado neste parágrafo.

Como no presente estudo o L-NAME causou efeito lusitrópico positivo, não é possível sustentar o suposto efeito lusitrópico positivo induzido pelo NO. Há uma sugestão de que NO poderia inibir a atividade da SERCA2a (Seddon et al., 2007) o que, neste caso, causaria efeito lusitrópico negativo. Esse comportamento seria compatível com nossos resultados.

Como não foram encontrados estudos que também tenham usado o L-NAME *in vitro* para diminuir a produção de NO via inibição das NOSs, o confronto dos resultados do presente estudo com o de outros ficou prejudicado. Nesse sentido, propõe-se a seguir apresentar resultados de estudos que ilustram os controversos achados da literatura até então publicados.

Martin et al. (2006) registraram o encurtamento sarcomérico de miócitos do VE de camundongos eNOS^{-/-} e nNOS^{-/-} (em 1 e 3 Hz; 35°C) sob condições basais e na presença de isoproterenol (ISO; 10-100 nmol/L). A contratilidade não diferiu entre camundongos eNOS^{-/-} e eNOS^{+/+} jovens, mas os miócitos de camundongos eNOS^{-/-} velhos mostraram reduzida resposta inotrópica ao ISO. Por outro lado, os cardiomiócitos dos camundongos nNOS^{-/-} apresentaram maior contratilidade e menor relaxamento antes da estimulação com ISO (a 1 Hz), enquanto a sensibilidade ao ISO foi similar entre nNOS^{-/-} e seu controle nNOS^{+/+}.

Anteriormente, Ashley et al. (2002) haviam encontrado percentual de encurtamento e tempo para 50% do relaxamento em cardiomiócitos do VE de camundongos nNOS^{-/-} aumentados após estimulação por 3 diferentes frequências (1, 3, e 6 Hz), tanto em condições basais quanto pós estimulação com beta-adrenérgico (2 nmol/L). Em 2003, esses resultados foram reproduzidos pelo mesmo grupo de pesquisadores (ver Sears et al., 2003), os quais associaram o maior encurtamento contrátil ao maior influxo de Ca^{2+} pelos canais do tipo L, ao maior

conteúdo de Ca^{2+} sarcoplasmático e a maior amplitude do transiente de Ca^{2+} intracelular. Burkard et al. (2007) utilizando-se de um modelo de camundongo transgênico que hiperexpressa nNOS no miocárdio (aumento de 6 vezes na expressão e 30% na atividade da nNOS) mostraram resultados que concordam com os resultados de Ashley et al (2002) e Sears et al (2003).

Outros autores, entretanto, encontraram resultados diferentes aos mencionados acima. Wang et al. (2008) evidenciaram que cardiomiócitos de camundongos eNOS^{-/-}, comparados ao controle eNOS^{+/+}, apresentam amplitude de encurtamento e transiente de Ca^{2+} aumentados após estimulados com β -adrenérgico. Os autores encontraram resultados concordantes quando utilizaram um inibidor específico (L-NIO; 10 M) nos cardiomiócitos eNOS^{+/+}.

Barouch et al (2002) observaram que cardiomiócitos de camundongos nNOS^{-/-} apresentaram encurtamento atenuado quando estimulados com ISO. Khan et al. (2003) observaram em cardiomiócitos de nNOS^{-/-} menor transiente de Ca^{2+} intracelular e menor estoque de Ca^{2+} sarcoplasmático quando comparado ao controle nNOS^{+/+}. Por outro lado, essas mesmas respostas foram preservadas em cardiomiócitos de eNOS^{-/-}. Petroff et al. (2001) verificaram em cardiomiócitos isolados que a liberação aumentada de NO contribuiu para o aumento da amplitude e frequência da liberação (*sparks*) de Ca^{2+} e para o transiente intracelular de Ca^{2+} , que reconhecidamente está envolvido na resposta inotrópica positiva. Por último, nenhuma diferença antes ou após estimulação com ISO (de 1 nM a 1 μM) foi observada na corrente Ca^{2+} tipo L de cardiomiócitos de camundongos eNOS^{-/-} (Gödecke et al., 2001; Belevych e Harvey, 2000).

As causas desses resultados contraditórios ainda não estão completamente esclarecidas, mas como é possível perceber os estudos variam em relação à idade dos camundongos, medidas (basais ou estimuladas por β -adrenérgico), concentração de β -adrenérgico, frequências de estimulação e variáveis contráteis mensuradas. Além disso, algumas variáveis de controle como a expressão residual de receptores β -adrenérgicos e a quantidade de NO produzida pelo gene NOS que não foi eliminado, geralmente não são mensuradas. Certamente, esse conjunto de fatores contribui para as diferenças de resultados encontradas.

Investigações que avaliem o efeito da inibição aguda das isoformas NOS por L-NAME sobre o transiente de cálcio poderiam oferecer respostas mais seguras

quanto a real participação do NO no acoplamento excitação-contração-relaxamento, sendo, portanto, recomendadas.

Em relação à administração com L-NAME *in vivo* por 7 dias o presente estudo evidenciou aumento do percentual de encurtamento, da velocidade máxima de contração e tendência para aumento da velocidade máxima de relaxamento nos cardiomiócitos dos animais tratados com L-NAME. Não foram encontrados outros estudos que tivessem investigado os efeitos do tratamento *in vivo* com L-NAME sobre cardiomiócitos isolados. Como no presente estudo a atividade das NOS medida no VE dos ratos não foi alterada pelo tratamento com L-NAME, parece improvável que o aumento dessa resposta contrátil tenha sido influenciada por diferenças na produção de NO.

Sabe-se que o tratamento com L-NAME pode causar lesões isquêmicas no miocárdio caracterizadas por fibrose e necrose (Moreno et al., 1995 e 1996; Oliveira et al., 2000; Coelho-Filho et al., 2001; Sampaio et al., 2002; Taylor et al., 2007) causando redução da capacidade contrátil de corações isolados (Jover et al., 1993; Moreno et al., 1996; Gazzoto et al., 2008). Entretanto, em preparações com corações isolados ou em corações de animais íntegros toda estrutura cardíaca é avaliada, não sendo possível avaliar a resposta contrátil somente dos cardiomiócitos viáveis. Portanto, a resposta contrátil encontrada em preparações com corações inteiros pode ser diferente daquela encontrada em preparações com células isoladas em que apenas os miócitos viáveis são avaliados.

Nesse sentido, é possível nos animais do grupo tratado com L-NAME a maior pós-carga cardíaca induzida pela hipertensão somada a possíveis lesões cardíacas tenha induzido nos cardiomiócitos sobreviventes uma resposta compensatória para o componente contrátil (ex: proteínas reguladoras do Ca^{2+} intracelular). Esse tipo de remodelamento poderia manter o trabalho cardíaco normalizado, ao menos por curto prazo.

De fato, é interessante pontuar que não foram encontradas alterações significativas *in vivo* para a função contrátil ventricular (dP/dT positiva e negativa). Esse resultado é interessante porque sugere que o tratamento com L-NAME de curto prazo causa efeito inotrópico positivo em nível celular, mas essa resposta não é detectada no coração do animal íntegro possivelmente devido mecanismos adaptativos contrarreguladores (ex: modulação neural ou humoral). O aumento da

função contrátil dos cardiomiócitos viáveis também poderia ser parte desse mecanismo compensatório, pois contribuiria para suprir possíveis lesões teciduais induzidas pelo L-NAME. Não se pode, evidentemente, deixar de considerar como limitações para essa interpretação o fato dos resultados hemodinâmicos terem sido obtidos de animais anestesiados, o que pode ter influenciado os resultados.

Para iniciar uma tentativa de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na melhora da função contrátil induzida pelo tratamento com L-NAME por curto prazo, algumas proteínas envolvidas na regulação do Ca^{2+} intracelular foram medidas no presente estudo.

Os resultados mostraram expressão aumentada de RyR2 no grupo tratado com L-NAME. Os receptores RyR2 estão envolvidos na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, portanto, esse resultado contribui para explicar o aumento da resposta contrátil.

A expressão do NCX, que participa da extrusão de Ca^{2+} durante o relaxamento contrátil do cardiomiócito (Bers 2002), também foi aumentada no grupo tratado com L-NAME. É interessante ponderar que a participação relativa do NCX na extrusão do Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos é menor (em torno de 7%) que o da SERCA 2a (em torno de 90%) (Bers 2002). Isso poderia explicar porque houve apenas tendência para maior velocidade de relaxamento no grupo tratado com L-NAME.

Não houve alteração significativa para a SERCA 2a, entretanto, é preciso considerar que a atividade dessa proteína na recaptção do Ca^{2+} para o interior do retículo sarcoplasmático é regulada pela fosforilação da proteína denominada fosfolambam, que não foi medida nesse estudo e, portanto, representa uma limitação do estudo.

Além disso, os resultados de expressão protéica precisam ser interpretados com cautela porque a expressão de proteínas envolvidas no acoplamento excitação contração apenas sugere uma maior atividade contrátil. Medidas diretas do fluxo de Ca^{2+} intracelular, por exemplo, contribuiriam para uma interpretação mais segura.

Em resumo, os resultados desse segundo protocolo experimental sugerem que a inibição *in vivo* das NOS por apenas sete dias é suficiente para aumentar a função contrátil dos cardiomiócitos isolados, aparentemente devido remodelamento

funcional dos cardiomiócitos viáveis. Além disso, o significativo aumento da contratilidade de cardiomiócitos isolados após inibição das NOS com L-NAME *in vitro* confirma a importância do NO na modulação do acoplamento excitação-contracção-relaxamento, ao menos nessa condição experimental.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem sugerir que:

- 1) A expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico no VE de ratos não parece modulada pelo NO. Esse fenômeno seria explicado por mecanismos não estudados no presente estudo;
- 2) O L-NAME amplifica a expressão de Hsp72 induzida pelo exercício físico no VE de ratos por mecanismos que independem diretamente do NO. A amplificação de Hsp72 no miocárdio possivelmente é explicada por estresse patológico;
- 3) O exercício físico de curto prazo (7 dias) isoladamente não altera a expressão e atividade das enzimas NOS no VE de ratos. Possivelmente essas respostas sejam características de exercícios de longa duração;
- 4) A administração com L-NAME *in vivo* de curto prazo (7 dias) aumenta a expressão da isoforma inibitória p-nNOS^{Ser852} e da nNOS total. A interação L-NAME+exercício aumenta e reduz, respectivamente, as expressões das isoformas p-eNOS^{Ser1177} e p-nNOS^{Ser852}. A intervenção com L-NAME, exercício ou a interação L-NAME+exercício não alteram a atividade das NOS no VE de ratos. O controle refinado das enzimas NOS na tentativa de manter a produção de NO em estado de equilíbrio poderia explicar esse conjunto de resultados.
- 5) O tratamento com L-NAME *in vivo* de curto prazo (7 dias) aumenta a função contrátil de cardiomiócitos do VE de ratos que, ao menos parcialmente, é explicada pela modulação de proteínas reguladoras do Ca²⁺ intracelular;
- 6) A inibição aguda *in vitro* das NOS aumenta a função contrátil de cardiomiócitos isolados do VE de ratos tratados e não tratados *in vivo* com L-NAME, confirmando que ao menos *in vitro* o NO participa da regulação do acoplamento excitação-contração-relaxamento;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alderton WK, Cooper CE e Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615, 2001.
2. Amrani M, Latif N, Morrison K, Gray C, Jayakumar J, Corbett J et al. Relative induction of heat shock protein in coronary endothelial cells and cardiomyocytes: Implications for myocardial protection. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 115: 200-204, 1998.
3. Arnaud C, Godin-Ribuota D, Bottaria S, Peinnequin A, Joyeux M, Demenge P, Ribuo C. iNOS is a mediator of the heat stress-induced preconditioning against myocardial infarction in vivo in the rat. *Cardiovasc Res*, 58, 118-125, 2003.
4. Arnaud C, Laubriet A, Joyeux M, Godin-Ribuot D, Rochette L, Demenge P et al. Role of nitric oxide synthases in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol*, 132: 1845-1851, 2001.
5. Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation*, 105:3011-3016. 2002.
6. Balafanova Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, et al. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase C ϵ (PKC ϵ), facilitating PKC translocation via enhanced PKC ϵ -RACK2 interactions. *J Biol Chem*, 277: 15021-7, 2002.
7. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 416: 337-40, 2002.
8. Belevych AE, Harvey RD. Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca $^{2+}$ current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J Physiol (Lond)*, 528: 279-89. 2000.

9. Benjamin IJ, Mcmillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 83: 117-132, 1998.
10. Bernátová L, Kopincová J, Púzserová A, Janega P, Babál P. Chronic low-dose L-name. treatment increases nitric oxide production and vasorelaxation in normotensive rats. *Physiol Res*, 56 (Suppl. 2): S17-S24, 2007.
11. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415: 198-205, 2002.
12. Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*, 3: 187–204, 2004.
13. Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, et al. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res*, 100: e32–44, 2007.
14. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J*, 324: 305-310, 1997.
15. Chen HI, Hu CT. Endogenous nitric oxide on arterial hemodynamics: a comparison between normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 273:1816-1823, 1997.
16. Coelho-Filho OR, De Luca IMS, Tanus-Santos JE, Cittadino M, Sampaio RC, Coelho OR, Hyslop S, Moreno Jr. H. Pravastatin reduces myocardial lesions induced by acute inhibition of nitric oxide biosynthesis in normocholesterolemic rats. *Int J Cardiol*, 79: 215-221, 2001.
17. Coven DL, Hu X, Cong L, Bergeron R, Shulman GL, Hardie DG et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E629–E636, 2003.
18. Darblade B, Batkai S, Caussé E, Gourdy P, Fouque MJ, Rami J. Failure of L-Nitroarginine to Inhibit the Activity of Aortic Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Vasc Res*, 38: 266-275, 2001.

19. Delcayre C, Samuel JL, Marotte F, Best-Belpomme M, Mercadier JJ, Rappaport L. Synthesis of stress proteins in rat cardiac myocytes 2-4 days after imposition of hemodynamic overload. *J Clin Invest*, 82: 460-468, 1988.
20. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, and Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 91: 2205-2212, 2001.
21. Duncan CJ. An hypothesis for preconditioning and heat shock proteins: a model elucidating damage pathways in the heart? *J Therm Biol*, 22: 69-78, 1997.
22. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Ver*, 88: 1009 -1086, 2008.
23. Dutra de Souza HC, Penteado DMD, Martin-Pinge MC, Neto OB, Teixeira VPA, Blanco JHD et al. Nitric oxide synthesis blockade increases hypertrophy and cardiac fibrosis in rats submitted to aerobic training. *Arq Bras Cardiol*, 89 2: 88-93, 2007.
24. Dyck JRB, Lopaschuk GD. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol*, 574: 95-112, 2006.
25. Eickelberg O, Geibel J, Seebach F, Giebisch G, Kashgarian M. K⁺-induced HSP72 expression is mediated via rapid Ca²⁺ influx in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: F280–F287, 2001.
26. Febbraio MA, Koukoulas I. HSP 72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol*, 89:1055-1060, 2000.
27. Gazzoto A, Sabha M, Frigato V, Ferreira-Melo SE, Bignotto LM, Lacchini R, et al. L-NAME-induced hypertension does not completely reproduce the hemodynamic pattern of the hypertensive-diabetic cardiomyopathy in rats. *Int J Atheroscler*, 3: 44-49, 2008.
28. George Kottenberg. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res*, 41: 514-523, 1999.
29. Ghafourifar P, Sen CK. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Front Biosci*, 12: 1072-1078, 2007.

30. Gödecke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UKM, et al. Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J Physiol (Lond)*, 532: 195-204, 2001.
31. Gonzáles B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol*, 556: 369–385, 2004.
32. Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, et al. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc Diabetol* 7: 34, 2008.
33. Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC, Huang PL. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol*, 278: H971-981, 2000.
34. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 107: 3152-3158, 2003.
35. Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281: H1346–H1352, 2001.
36. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and hsp72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 34: 800-809, 2003.
37. Harris MB, Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2271-H2280, 2001.
38. Henningsson R, Alm P, Lindström E, Lundquist I. Chronic blockade of NO synthase paradoxically increases islet NO production and modulates islet hormone release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E95–E107, 2000.

39. Hernando R, Manso R. Muscle fibre stress in response to exercise Synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur J Biochem*, 243, 460-467, 1997.
40. Huckstorf C, Zanzinger J, Fink B, Bassenge E. Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 349: 367-73, 1994.
41. Husain K. Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol Cell Biochem*, 231: 129-137, 2002.
42. Hutter JJ, Mestral R, Tam EKW, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation*, 94: 1408-1411, 1996.
43. Jin BY, Sartoretto JL, Gladyshev VN, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase negatively regulates hydrogen peroxide-stimulated AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *PNAS*, 106: 17343–17348, 2009.
44. Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide. *Hypertension* 21: 944-948, 1993.
45. Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmons WW, Smith TW, Kelly RA. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 78: 217-224, 1996.
46. Khan M, Mohan IK, Kutala VK, Kotha SR, Parinandi NL, Hamlin RL, et al. Sulfaphenazole protects heart against ischemia–reperfusion injury and cardiac dysfunction by overexpression of iNOS, leading to enhancement of nitric oxide bioavailability and tissue oxygenation. *Antioxid Redox Signal*, 11: 725–738, 2009.
47. Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, et al. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res*, 92: 1322-1329, 2003.

48. Kiang JG, Carr FE, Burns MR, McClain DE. HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 267: C104-C114, 1994.
49. Kiang JG, Kiang SC, Juang YT, Tsokos GC. *N*-nitro-L-arginine inhibits inducible HSP-70 via Ca^{2+} , PKC, and PKA in human intestinal epithelial T84 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282: G415-G423, 2002.
50. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*, 80: 183-201, 1998.
51. Kim KB, Kim MH, Lee DJ. The effect of exercise in cool, control and hot environments on cardioprotective HSP70 induction. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*, 23: 225-230, 2004.
52. Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J*, 14: 1685-1696, 2000.
53. Knowlton AA, Eberli FR, Brecher P, Romo GM, Owen A, Apstein CS. A single myocardial stretch or decreased systolic fiber shortening stimulates the expression of heat shock protein 70 in the isolated, perfused rabbit heart. *J Clin Invest*, 88: 2018–2025, 1991.
54. Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ. Nitric oxide–generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 76: 305-309, 1995.
55. Kuru O, Senturk UK, Demir N, Yesilkaya A, Erguler G, Erkilic M. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol*, 87: 134-140, 2002.
56. Kuru O, Senturk UK, Koçer GO, Ozdem S, Baskurt OK, Çetin A, Yesilkaya A, Gunduz F. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol*, 107: 896–902, 2009.
57. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
58. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*, 51: 637-646, 2001.

59. Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol*, 269: H320-H325, 1995a.
60. Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. Activation of heat shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol*, 268: C1387-C1394, 1995b.
61. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1954.
62. Lunz W, Oliveira EC, Neves MTD, Fontes EPB, Dias CMGC, Natali AJ. Anabolic steroid- and exercise-induced cardiac stress protein (HSP72) in the rat. *Braz J Med Biol Res*, 39: 889-893, 2006.
63. Maloyan A, Horowitz M. β -Adrenergic signaling and thyroid hormones affect HSP 72 expression during heat acclimation. *J Appl Physiol*, 93: 107-115, 2002.
64. Malyshev IY, Malugin AV, Manukhina EB, Larionov NP, Malenyuk EB, Malysheva EV, Mikoyan VD, Vanin AF. Is HSP70 involved in nitric oxide-induced protection of the heart? *Physiol Res*, 45: 267-272, 1996.
65. Malyshev IY, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF. Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Letters* 370, 159-162, 1995.
66. Martin JL, Mestril R, Dandan RH, Brunton LL, Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*, 96: 4343-4348, 1997.
67. Martin SR, Emanuel K, Sears CE, Zhang Y-H, Casadei B. Are myocardial eNOS and nNOS involved in the beta-adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation. *Cardiovasc Res*, 70: 97-106, 2006.
68. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: Ten years after, and continuing. *Circ Res*, 93: 388-398, 2003.
69. Mcgrath LB, Locke M, Cane M, Chen C, Ianuzzo D. Heat shock protein (Hsp 72) expression in patients undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 109: 370-376, 1995.

70. McKee M, Scavone C, Nathanson JA. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12056–12060, 1994.
71. Melling CW, Thorp DB, Milne KJ, Krause MP, Noble EG. Exercise mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3692–H3698, 2007.
72. Melling CW, Thorp DB, Noble EG. Regulation of myocardial heat shock protein 70 gene expression following exercise. *J Mol Cell Cardiol* 37:847–855, 2004.
73. Melling CWJ, Krause MP, Noble EG. PKA-mediated ERK1/2 inactivation and hsp70 gene expression following exercise. *J Mol Cell Cardiol*, 41: 816–822, 2006.
74. Melling CWJ, Thorp DB, Milne KJ, Noble EG. Myocardial Hsp70 phosphorylation and PKC-mediated cardioprotection following exercise. *Cell Stress Chaperones*, 14: 141-150, 2009.
75. Miller MJS, Thompson JH, Liu X, Eloby-Childress S, Sadowska-Krowicka H, Zhang XJ, Clark DA. Failure of L-NAME to cause inhibition of nitric oxide synthesis: Role of inducible nitric oxide synthase. *Inflamm Res*, 45: 272-276, 1996.
76. Milne KJ, Thorp DB, Melling CWJ, Noble EG. Castration inhibits exercise-induced accumulation of Hsp70 in male rodent hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290:1610-1616, 2006.
77. Morán M, Delgado J, González B, Manso R, Megias A. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta Physiol Scand*, 180, 157-166, 2004.
78. Moreno Jr H, Metze K, Bento AC, Antunes E, Zatz R, Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardio*, 191: 248-255, 1996.
79. Moreno Jr H, Nathan LP, Metze K, Costa SK, Antunes E, Hyslop S, Zatz R, Nucci G. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24: 342–352, 1997.

80. Moreno Jr. H, Nathan LP, Costa SKP, Metzger K, Antunesa E, Zatz R, Nuccia G. et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 287: 93-96, 1995.
81. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1409-1410, 1993.
82. Moshage H. Nitric oxide determinations: much ado about NO•-thing? *Clin Chem*, 43: 553-556, 1997.
83. Mount PF, Fraser SA, Watanabe Y, Lane N, Katsis F, Chen ZP, et al. Phosphorylation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the kidney with high and low salt diets. *Nephron Physiol*, 102:36-50, 2006.
84. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42: 271-279, 2007.
85. Nakano M, Mann DL, Knowlton AA. Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. *Circulation*, 95: 1523-1531, 1997.
86. Neuhaus-Steinmetz U, Skrandies S, Rensing S. Heat shock protein synthesis is affected by intracellular pH: inhibition by monensin-induced alkalosis in C6 rat glioma cells. *Brain Res*, 724: 16-24, 1996.
87. Neves SRS, Machado CRS, Pinto AMT, Borges AHD, Cunha FQ, Camargos ERS. Macrophage populations and cardiac sympathetic denervation during L-NAME-induced hypertension in rats. *Histol Histopathol*, 21: 803-812, 2006.
88. Nishizawa J, Nakai A, Matsuda K, Komeda M, Ban T, Nagata K. Reactive Oxygen Species Play an Important Role in the Activation of Heat Shock Factor 1 in Ischemic-Reperfused Heart. *Circulation*, 99: 934-941, 1999.
89. Noble EG, Moraska A, Mazzeo RS, Roth DA, Olsson MC, Moore RL et al. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol*, 86: 1696-1701, 1999.
90. Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, Kadokami T, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension*, 26: 957-962, 1995.

91. Oliveira CF, Cintra KA, Teixeira SA, De Luca IMS, Antunes E, De Nucci G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. *Eur J Pharmacol*, 391: 121-126, 2000.
92. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E. Phosphorylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase at Ser847 by CaM-KII in the Hippocampus of Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22: 1098-1106, 2002.
93. Paroo Z, Noble EG. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones*, 4: 199-204, 1999.
94. Pessanha MG, Mandarim-de-Lacerda CA. Influence of the chronic nitric oxide synthesis inhibition on cardiomyocytes number. *Virchows Arch*, 437: 667-674, 2000.
95. Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marban E, Balligand J-L, et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol*, 3: 867-873, 2001.
96. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol*, 118: 1433-1440, 1996.
97. Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol*, 106: 285-289, 1993.
98. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest*, 95: 1854-1860, 1995.
99. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, 275: 1468-1477, 1998.
100. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Ver*, 88: 1243-1276, 2008.

101. Powers SK, Locke M, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc*, 33: 386-392, 2001.
102. Ramchandra R, Barrett, CJ, Malpas SC. Chronic blockade of nitric oxide does not produce hypertension in baroreceptor denervated rabbits. *Hypertension*, 42: 974-977, 2003.
103. Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-d-aspartate receptor. *J Biol Chem*, 279: 14307-14314, 2004.
104. Ribeiro M, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of hypertension. *Hypertension*, 20: 298-303, 1992.
105. Ricchiuti V, Lian CG, Oestreicher EM, Tran L, Stone JR, Yao T et al., Estradiol increases angiotensin II type 1 receptor in hearts of ovariectomized rats. *J Endocrinol*, 200: 75-84, 2009.
106. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia Basel*, 18: 571-573, 1962.
107. Robinson B, Morita T, Toft DO, Morris J. Accelerated recovery of postischemic stunned myocardium after induced expression of myocardial heat-shock protein (HSP70). *J Thorac Cardiovasc Surg*, 109: 753-764, 1995.
108. Sampaio RC, Tanus-Santos JE, Melo SE, Hyslop S, Franchini KG, Luca LM, Moreno Jr H. Hypertension plus diabetes mimics the cardiomyopathy induced by nitric oxide inhibition in rats. *Chest*, 122: 1412-1420, 2002.
109. Schiffrin EL. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: A matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. *Hypertension*, 51: 31-32, 2008.
110. Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, et al. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res*, 92: 52e-59e, 2003.

111. Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*, 75: 315–326, 2007.
112. Silberman GA, Fan TH, Liu H, Jiao Z, Xiao HD, Lovelock JD, et al. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation*, 121: 519–528, 2010.
113. Skidmore R, Gutierrez JA, Guerrero V, Kregal, KC. HSP70, induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol*, 268: R92-R97, 1995.
114. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L et al. HSP 72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol*, 279: R1539-R1545, 2000.
115. Snoeckx LHEH, Cornelussen RN, Nieuwenhoven FAV, Renemam RS, Vusse GJVD. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Ver*, 81: 1461-1497, 2001.
116. Southan GL, Szabd C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*, 51: 383-394, 1996.
117. Staib JL, Quindry JC, French JP, Criswell DS, Powers SK. Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 292: R432-R439, 2007.
118. Staib JL, Tumer N, Powers SK. Increased temperature and protein oxidation lead to HSP72-mRNA and protein accumulation in the in vivo exercised rat heart. *Exp Physiol* 94: 71-80, 2009.
119. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tanimoto A, Horiuchi M, Tasaki H, et al. Long-term treatment with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Circulation*, 106: 1729-1735, 2002.
120. Sugawara J, Maeda S, Otsuki T, Tanabe T, Ajisaka R, Matsuda M. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on decrease in peripheral arterial

- stiffness with acute low-intensity aerobic exercise. *Am J Physiol*, 287: 2666-2669, 2004.
121. Sullivan JC, Pollock JS. Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling. *Circ Res*, 98: 717-719, 2006.
 122. Taylor RP, Harris MB, Starnes JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H1098–H1102, 1999.
 123. Taylor RP, Olsen ME, Starnes JW. Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H601–H607, 2007.
 124. Vaziri, ND, and Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*, 34: 1237-1241, 1999.
 125. Vergely C, Perrin-Sarrado C, Clermont G, Rochette L. Postischemic recovery and oxidative stress are independent of nitric oxide synthases modulation in isolated rat heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 149-157, 2002.
 126. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res*, 84: 1020-1031, 1999.
 127. Waard MC, van der Velden J, Boontje NM, Dekkers DH, van Haperen R, Kuster DW, Lamers JM, de Crom R, Duncker DJ. Detrimental effect of combined exercise training and eNOS overexpression on cardiac function after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296: H1513–H1523, 2009.
 128. Wang H, Kohr MJ, Wheeler DG, Ziolo MT. Endothelial nitric oxide synthase decreases β -adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca^{2+} current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1473-H1480, 2008.
 129. Welch WJ. Mammalian stress Response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Ver*, 72: 1063-1081, 1992.

130. Why SKV, Mann AS, Thulin G, Zhu XH, Kashgarian M, Siegel NJ. Activation of heat-shock transcription factor by graded reductions in renal ATP, in vivo, in the rat. *J Clin Invest*, 94: 1518-1523, 1994.
131. Williams JG, Ojaimi C, Qanud K, Zhang S, Xu X, Recchia FA, Hintze TH. Coronary nitric oxide production controls cardiac substrate metabolism during pregnancy in the dog. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H2516–H2523, 2008.
132. Winegarden NA, Wong KS, Sopta M, Westwood JT. Sodium salicylate decreases intracellular ATP, induces both heat shock factor binding and chromosomal puffing, but does not induce hsp 70 gene transcription in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 271:26971–26980, 1996.
133. Woodman CR, Turk JR, Williams DP, Laughlin MH. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J Appl Physiol*, 94: 2017-2026, 2003.
134. Xavier-Vidal et al. Hydralazine reduces myocardial tissue damage in rats submitted to chronic inhibition of systemic nitric oxide synthesis during 4, 14 and 28 days. *J bras patol med lab*, 39: 245-252, 2003.
135. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock 1. *J Clin Invest*, 100: 1089-1097, 1997.
136. Xu Q, Schett G, Li C, Hu Y, Wick G. Mechanical stress–induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by rac and ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases. *Circ Res*, 86: 1122-1128, 2000.
137. Zaobornyj T, Valdez LB, Iglesias DE, Gasco M, Gonzales GF, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296: H1741–H1747, 2009.
138. Zatz R, Bayles C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32: 958-964, 1998.

139. Zhang QJ, Li QX, Zhang HF, Zhang KR, Guo WY, Wang HC, et al. Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. *Cardiovasc Res*, 75: 369-380, 2007.
140. Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED, Symons JD. Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol*, 587: 3911–3920, 2009.