

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

José Antonio Dias Garcia

Efeito Antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na hipertrofia ventricular esquerda (HVE) em camundongos hipercolesterolêmicos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr-/-).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina C. Spadari-Bratfisch

Campinas
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G165e Garcia, José Antonio Dias
Efeito antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na hipertrofia ventricular esquerda (HVE) em camundongos hipercolesterolêmicos knockout para o receptor de LDL (LDL^{-/-}). / José Antonio Dias Garcia. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Marta Helena Krieger.
Co-orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hipertrofia ventricular esquerda. 2. Camundongos knockout. 3. Deficiência em LDLR. 4. S-nitrosotiol. I. Krieger, Marta Helena. II. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Anti-inflammatory effect of the S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) on left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic LDL^{-/-} mice.

Palavras-chave em inglês: Left ventricular hypertrophy; Mice, knockout; LDLR deficient; S-nitrosotiol.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marta Helena Krieger, Dora Maria Grassi-Kassisse, Wilson Nadruz Junior, José Wilson Magalhães Bassani.

Data da defesa: 31/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 31/08/06

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Marta Helena Krieger (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani.

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

“O importante não é estar aqui ou ali, mas ser.

Ser é uma ciência dedicada.

Feita de pequenas grandes observações do cotidiano, dentro e fora da gente.

Se não executarmos estas observações não chegamos a ser, apenas estamos e desaparecemos”.

Carlos Drummond de Andrade

Aos animais:

“Teu reino te obriga a ser rude e selvagem, como companheiro és humilde e amigo.

Lutas pela tua vida como um gigante, e a desprezas em vista da nossa.

Em laboratórios é fonte de informações e muitos de nós não sabemos respeitar-te.

A ti meu leal amigo, pelo teu reino que me fascina, pela tua companhia que me conforta, pela tua abnegação que me envergonha e pelo teu corpo no meu estudo e atividades, prometo respeitar-te como a um evangelho, com a minha total admiração.”

A minha esposa **Érika:**

Pela sua força agenciadora de construção e amor, mantendo em mim a esperança e vontade de seguir em frente.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS:

A Professora **Marta H. Krieger:**

Ao longo de tua caminhada tu guiaste o meu caminho.

Mostraste a cada momento conhecimento, compreensão, luta, paciência, inteligência e dedicação. E diante disso carreguei na bagagem da vida o ensinamento eterno.

Hoje é minha vez de retribuir te desejando a continuidade de muito sucesso e que tua estrela continue sempre brilhando.

A minha mãe Maria Izabel: por você ser meu anjo da guarda, rezar por mim e ser está pessoal humilde e que sempre luta pelo bem estar dos seus filhos.

Ao meu pai Nelson: por entender as poucas vezes que fui a sua casa durante este doutorado (que parece uma eternidade) e sempre torcendo para que tudo desse certo.

A minha irmã Neuceli, meu cunhado Gilson e meu sobrinho Gabriel: pelos momentos alegres e principalmente pelo apoio constante durante esse difícil período. Eu me orgulho de ter vocês, e não é preciso estar perto para mostrarmos o quanto gostamos das pessoas.

A professora Regina C. Spadari-Bratfisch pela valiosa co-orientação, pelo exemplo de seriedade e serenidade nos momentos mais complicados.

À Professora Dora Maria Grassi-Kassisse, pelas sugestões feitas durante o exame de qualificação, pela pessoa atenciosa, humilde e dedicada na arte de ensinar.

Ao Professor Francesco Langone, pelo exemplo de capacidade, humildade e dedicação. Fica aí uma frase que resume o senhor como professor: “Educar é ser um artesão da personalidade, um poeta da inteligência, um semeador de idéias”.

Ao Professor Wilson Nadruz Jr, pelas dicas e sugestões dadas durante a qualificação, pela pessoa atenciosa, humilde e prestativa.

Ao Professores Miguel Arcanjo Areas, pelas lições e amizade.

A Professora Fernanda Gadelha, pelos ensinamentos em Bioquímica e pela amizade.

A professora Carmem, pelos ensinamentos em Bioquímica e pela e sua capacidade de saber ensinar. Adorei suas aulas.

Ao professor Kleber Franchini, pelo apoio e confiança para que eu utilizasse o software, e também pela confiança na minha participação no manuscrito: “Digital image analysis software for morphometric quantitation in tissues and cells”.

Ao meu sogro Oswaldo e minha sogra Cila, por me acolherem com tanto carinho em seu lar todas as semanas e estarem sempre torcendo pelo nosso sucesso. Obrigado.

Ao meu amigo Leandro dos Santos: pela grande amizade, ou melhor, pelo irmão que consegui, pelas boas risadas e desabafos nessa caminhada e as longas viagens para Campinas. A brincadeira de corredor está tornando realidade, não é mesmo? Dos Santos & Garcia.

Ao meu amigo Rodrigo Gonçalves Dias, pela grande amizade, respeito e companheirismo.

A minha amiga Kelly, minha irmã científica, que me recebeu bem no laboratório, pela colaboração, pela amizade, pelos bons e maus momentos que passamos no Labcard.

A minha amiga Mika, pela disposição e enorme paciência para sintetizar o SNAC, pela amizade e pelos papos e risadas durante os nossos almoços.

A minha amiga Claudia, pela sua atenção e por estar sempre disposta a ajudar, pelos conselhos e dicas experientes, pela amizade e pelos papos e risadas durante os nossos almoços.

Ao meu amigo André L. Moura, pela pessoa atenciosa, pela colaboração e pela grande amizade que fizemos.

Ao Professor Heraldo Possolo de Souza, pela contribuição com o CD40L, no fornecimento dos anticorpos e também na ajuda das análises do Western blotting.

A Thais Franchini, pelo auxílio, pela sua capacidade prestativa e pela amizade.

A todos os professores do Departamento Fisiologia e Biofísica da Unicamp, pelas muitas vezes que foram família.

Aos meus colegas de laboratório: Amarylis, Viviane, Daniel, André pela amizade, pela colaboração, por serem pessoas humildes e lutadoras. Vocês com certeza chegarão os seus objetivos pessoais. Felicidades e um fraterno abraço do Zé.

Aos meus amigos Karina, Emiliane, Juliana, Elaine, Elisangela, Ana cláudia, Alessandro, Edgar, Héder, Alexandre Miotto, Danilo, pelos momentos alegres e tristes nos quais se mostraram amigos.

Aos amigos Fábio Rogério, Rafael e Alexandre Rezende pela amizade e paciência quando a gente alojava no laboratório 11 para usar o microscópio e tirar as microfotografias.

Ao meu amigo Antonio Marcos, pela ajuda nos cortes histológicos e na preparação das lâminas.

Aos funcionários do Departamento, pelo tratamento respeitoso e amizade.

As secretárias Andréia e Marina, pelos esclarecimentos e risadas.

Ao meu amigo Ivo (flamenguista) e a minha amiga Alexandra (corintiana), pela educação com que sempre me trataram. Vocês são pessoas iluminadas.

A Fapesp e ao CNPq, pelo apoio financeiro para desenvolver o projeto.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram com a elaboração deste trabalho e para minha formação pessoal.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	xiii
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
1- Introdução.....	01
1.1- Conceito e Classificação da Hipertrofia Ventricular Esquerda	04
1.2- Pressão Arterial e Hipertensão.....	05
1.3- Fatores que Induzem a Hipertrofia Ventricular Esquerda.....	08
1.3.1- Fatores Hemodinâmicos.....	08
1.3.1.1- Aumento da Necessidade Metabólica.....	09
1.3.1.2- Sobrecarga de Pressão e/ou Volume.....	09
1.3.2- Fatores Neuro-Humorais.....	11
1.3.2.1- Catecolaminas e Sistema Nervoso Simpático.....	11
1.3.2.2- Angiotensina II.....	13
1.3.2.3- Insulina.....	14
1.3.2.4- Estresse Oxidativo.....	14
1.3.2.5- Hipercolesterolemia.....	15
1.3.2.6- Citocinas e fatores de Crescimento Induzidos pelo Processo Inflamatório..	15
1.4- Via Óxido Nítrico/ Óxido Nítrico Sintase na Homeostasia Cardiovascular.....	17
1.4.1- Óxido Nítrico Sintases.....	17
1.4.2- Mecanismos Regulatórios da Ativação das Oxido Nítrico Sintases.....	19
1.4.3- Desacoplamento da Síntese de Óxido Nítrico.....	20
1.4.4- Funções do Oxido Nítrico.....	22
1.5- Doadores de Óxido Nítrico.....	26

2- Objetivos	29
3- Capítulos	31
3.1- S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) Prevents Left Ventricular Hypertrophy in Hypercholesterolemic LDLr ^{-/-} mice by Anti-inflammatory Action.....	32
3.2- Digital image analysis software for morphometric quantitation in tissues and cells.....	58
4- Conclusão	73
5- Referências Bibliográficas.....	75

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADH - Hormônio antidiurético ou vasopressina.

ADP- Adenosina difosfato.

Ang II - Angiotensina II.

ANP - Peptídeo natriurético atrial.

AT1 - Receptor 1 para Angiotensina II.

AT2 - Receptor 2 para Angiotensina II.

α -AR - Receptor alfa adrenérgico.

Bax e Bak - Membros da família de genes reguladores de apoptose.

Bcl-2 - Genes reguladores de apoptose.

β MHC- cadeia pesada da β miosina.

β -AR –Receptor β adrenérgico.

bpm - batimentos por minuto.

°C - graus centígrados.

CD40 – Grupo de diferenciação 40 = Ligante do receptor do CD40L

CD40L – Grupo de diferenciação 40L = Ligante do receptor do CD40.

cNOS – (Constitutive nitric oxide synthase) - Óxido nítrico sintase constitutiva.

DC - Débito cardíaco.

DAG- Diacil glicerol.

DNA - Ácido Desoxiribonucléico.

ECA- (Angiotensin converting enzyme) – Enzima conversora de Angiotensina I.

EDRF – (Endothelium-derived relaxing factor) - Fator relaxante derivado do endotélio.

EDTA- (Ethylene diamine tetra-acetic acid) - Ácido tetra acético etilendiamina.

eNOS – (Endothelial nitric oxide synthase) - óxido nítrico sintase endotelial.

ERK- quinases reguladas por sinais extracelulares.

ET1- Endotelina 1.

FAD – (Flavin adenine dinucleotide) - Flavina adenina dinucleotídeo

FC - Frequência cardíaca.

FGF - Fator de crescimento de fibroblasto.

FMN – (Flavin mononucleotide) Flavina mononucleotídeo.

GCs - Guanilato ciclase solúvel

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica.

GPCR- Receptor acoplado a proteína G.

Gs- Proteína G estimulatória.

GSN - S-nitroso-glutathione.

GTP – Guanosina trifosfato.

HA - Hipertensão arterial.

HDL – (High-density lipoprotein) - Lipoproteína de alta densidade.

HVE - Hipertrofia ventricular esquerda.

IL - Interleucina.

IP3- Inositol trifosfato.

IGF – (Insulin like growth factor) - Fator de crescimento semelhante a Insulina.

IKK - quinase inibitória do Kappa β .

INF- γ - Interferon- γ .

iNOS -(inducible nitric oxide synthase) Óxido nítrico sintase induzida.

ip - Intraperitonal.

JNK - quinase terminal NH₂ cJun

ko – “*knockout*”.

LTCC - Canais de Ca^{+2} tipo L.

LDL - (Low-density lipoprotein) lipoproteína de baixa densidade.

LDLr^{-/-} - *knockout* para o receptor de LDL.

LPS - Lipopolissacarídeos.

LVH- Left Ventricular hypertrophy.

M2- Receptores colinérgicos muscarínicos tipo 2

MAPKs - Proteínas quinases ativadoras mitogênicas.

μm - micrômetros.

MLP - Proteína LIM muscular.

mmHg - milímetros de mercúrio

MMP (matrix metalloproteinase) collagenases intersticiais

NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida adenina

NE- Norepinefrina

NFAT- (Nuclear factor of activated T cells) - Fator nuclear ativador de células T.

NFkappaB - Fator nuclear kappa β .

NO (nitric oxide) - Óxido nítrico.

NOS - Óxido nítrico sintase.

nNOS -(Neuronal nitric oxide synthase) Óxido nítrico sintase neuronal

O_2^- - Ânion superóxido.

ONOO^- - Peroxinitrito.

PA - Pressão arterial.

PAD - Pressão arterial diastólica.

PAM - Pressão arterial média.

PAS - Pressão arterial sistólica.

PDE II– Fosfodiesterase II.

PKA - Proteína quinase A.

PKG - Proteína quinase G.

PBS (phosphate-buffered saline) - Tampão fosfato.

RGB – (Red-blue-green)- Vermelho- verde -azul

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro.

RNS – Espécies reativas de nitrogênio.

ROS - Espécies reativas de oxigênio.

RSNOs (S-nitrosothiols) - S-nitrosotióis.

RVS - Resistência vascular sistêmica.

RPT - Resistência Periférica Total.

SEM - Erro padrão da média.

SHRs – (Spontaneously hypertensive rats) - Ratos espontaneamente hipertensos.

SMCs – (Smooth muscle cell) células musculares lisas.

SNAC – S-nitroso-N-acetilcisteína.

SRA- Sistema renina angiotensina.

TGF- β – (Transforming growth factor beta) Fator transformador de crescimento β .

TNF- α – (Tumor necrosis factor alpha) Fator de necrose tumoral- α .

TnI- Troponina I.

RESUMO

Recentemente demonstrou-se que S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) atenua o desenvolvimento da placa de aterosclerose na aorta em cerca de 55% de camundongos deficientes do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}). O presente estudo teve como objetivo: i) verificar se a deleção do gene do receptor de LDL pode alterar o perfil hemodinâmico e a resposta inotrópica do coração a agentes adrenérgicos; ii) determinar a capacidade do SNAC na prevenção das alterações estruturais e funcionais do miocárdio e; iii) verificar o efeito do SNAC na pressão arterial de camundongos hipercolesterolêmicos. Camundongos machos C57BL6 (Wild Type = WT) e camundongos LDLr^{-/-} (S) foram alimentados com dieta comercial por 15 dias. Em relação aos camundongos WT, os camundongos S apresentaram aumento de 11% na pressão arterial, diminuição de 62% na contratilidade do átrio esquerdo, e aumento na expressão do CD40L e redução na expressão de NOSe no tecido ventricular esquerdo. Camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta enriquecida em 1,25% de colesterol, 20% de gordura e 0,5% de ácido cólico por 15 dias (Chol) apresentaram hipertrofia ventricular esquerda (HVE) comparados aos camundongos S, a qual foi caracterizada por: a) aumento de 1,25 vezes na razão entre o peso ventricular esquerdo (mg) e o peso corporal (g) ($4,17 \pm 0,09$ vs $3,34 \pm 0,07$ mg/g, respectivamente; $p < 0,05$); b) aumento do diâmetro dos cardiomiócitos ($25 \pm 0,6$ vs $19 \pm 0,7$ μm , $p < 0,05$); c) aumento na expressão das isoformas das NOS (óxido nítrico sintases) e hiperexpressão do CD40L; d) aumento do depósito de colágeno; e) sem alterações na performance contrátil do átrio esquerdo e na responsividade à noradrenalina. A administração do SNAC aos camundongos Chol (chol+SNAC) ($0,51$ $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.), preveniu o aumento na razão do peso ventricular esquerdo (mg) e o peso corporal (g) ($3,38 \pm 0,23$ mg/g), no diâmetro dos cardiomiócitos ($20 \pm 0,7$ μm), no depósito de colágeno,

na expressão das isoformas da NOS e a hiperexpressão do CD40L. O SNAC não apresentou efeito no aumento da pressão arterial e nem sobre a hipocontratilidade, mas recuperou a responsividade para noradrenalina. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que camundongos com deleção do gene do receptor LDL apresentaram hipertensão e marcada redução contrátil. Essas características podem estar relacionados com o estresse oxidativo resultante do processo inflamatório e da hipoexpressão da NOS. A dieta hiperlipídica promoveu hipertrofia ventricular esquerda (HVE), devida ao aumento nos processos inflamatório e oxidativo. O SNAC impediu o desenvolvimento da HVE por mecanismos que envolveram efeito antiinflamatório (detectado pela diminuição na expressão do CD40L), a hiperexpressão das NOS, a redução das alterações estruturais ventriculares induzidas pela hipercolesterolemia de maneira independente da hipertensão. No presente estudo, a necessidade de quantificar as análises histológicas exigiu a validação de um *software* interativo para analisar imagens de amostras teciduais. O *software* foi projetado para permitir que o usuário altere os tipos de coloração vermelha, verde e azul (RGB) para uma cor padrão que possa ser usada para segmentar a imagem e calcular a fração da área de interesse. Os resultados obtidos com a contagem manual e com a contagem feita com o uso do *software* foram similares, indicando que são métodos alternativos confiáveis para análises quantitativas de cortes histológicos. Entretanto, o *software* permite processar as imagens de maneira eficiente e confiável, além de reproduzir o corte tecidual em um menor tempo, e pode ser executado com o microscópio e o computador padrão.

Abstract

Recently, it has been that S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) attenuate in 55% the plaque development in low-density lipoprotein-receptor-deficient (LDLr^{-/-}) mice fed a hypercholesterolemic diet for 15 days. The present study was designed to verify whether deletion of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene may affect the hemodynamic profile and adrenergic inotropic cardiac responses and, particularly, to identify the ability of SNAC to prevent the myocardial alterations and hypertension in hypercholesterolemic mice. C57BL6 wild-type (WT) and LDLr^{-/-} male mice (S) were fed a commercial diet for 15 days. Control mice (S) showed 11 % blood pressure increase, 62% left atrial contractility decrease, CD40L overexpression and eNOS underexpression in comparison to WT. LDLr^{-/-} mice which were fed for 15 days with 1,25% cholesterol, 20% of fat and 0.5% of colic acid enriched diet (Chol), showed significant left ventricular hypertrophy (LVH) versus S, which was characterized by: a) 1.25-fold increase in the LV weight (mg)/body weight (g) ratio (4.17 ± 0.09 vs. 3.34 ± 0.07 mg/g, respectively; $p < 0.05$); b) increased cardiomyocyte diameter (25 ± 0.6 vs. 19 ± 0.7 μm , $p < 0.05$); c) enhanced expression of the constitutive and inducible NOS isoforms and CD40L; d) increased collagen deposit; e) no alteration in the atrial contractile performance or responsiveness to norepinephrine. Administration of SNAC to Chol mice (Chol +SNAC) (0.51 $\mu\text{mol/kg/day}$, for 15day, i.p.) prevented increases in the left ventricular weight/body weight ratio (3.38 ± 0.23 mg/g), cardiomyocyte diameter (20 ± 0.7 μm), collagen deposit, NOS isoforms and CD40L overexpression, but had no effect on increased blood pressure or atrial basal hypocontractility, although it recovered responsiveness to norepinephrine. In conclusion,

the present study demonstrated that the deletion of the LDL receptor gene in mice determined hypertension and a marked left atrial contractile deficit. These findings may be related to oxidative stress, resulting from inflammation and eNOS underexpression. High-cholesterol diet promoted LVH in LDLr^{-/-} mice associated with enhanced inflammatory and oxidant processes. SNAC prevented LVH by processes that involved decreased CD40L expression and NOS overexpression effects attenuating the ventricular structural alterations induced by hypercholesterolemia independent of hypertension. Histological quantization demanded the development of interactive software for image analysis of tissue samples. The software was designed to allow a user-oriented change of a chosen red, green and blue (RGB) staining in a standardized color that can be used to segment the image and calculate the fractional area of interest. Thus the method allows efficient, reliable and reproducible processing of tissue sections that is less time-consuming than conventional methods and can be performed with standard microscope and computer.

I- Introdução

1- INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2005), as doenças cardiovasculares lideram as causas de morte no mundo. Dentre essas doenças, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um indicador de grande relevância no risco de morbimortalidade cardiovascular. O aumento da massa ventricular esquerda representa, no entanto, um marcador do desenvolvimento da insuficiência do órgão, geralmente decorrente de um persistente efeito deletério da hipertensão arterial. A partir desse quadro, vários estudos foram realizados, com o intuito de avaliar e melhor entender o efeito da HVE sobre os eventos cardiovasculares e a incidência na mortalidade. Segundo o “*Framingham Heart Study*” (Kannel, 1983), os indivíduos que apresentaram HVE, diagnosticada por meio de alterações eletrocardiográficas, apresentaram risco de morte seis vezes maior que a população em geral associada aos fatores de risco tradicionais, como dislipidemia (Sundström *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2005), tabagismo (Zhang *et al.*, 2006) e hipertensão arterial (Kempf e Wollert, 2004). Por este motivo, cada vez mais se enfatiza a necessidade de prevenção e tratamento da HVE.

O miocárdio dos mamíferos passa por um crescimento hipertrófico durante a maturação pós-nascimento, que é caracterizado por aumento no tamanho individual dos cardiomiócitos sem divisão celular (Lorrell e Carabello, 2000). Este padrão de desenvolvimento hipertrófico pode ser reiniciado no coração adulto em resposta a diferentes mecanismos hemodinâmicos, neuro-hormonais e/ou a estímulos patogênicos (Hunter e Chien, 1999).

O aumento no estiramento dos cardiomiócitos é o principal fator indutor de crescimento hipertrófico, mas substâncias circulantes, como a endotelina 1 (ET1) (Lee *et al.*, 2005), a angiotensina II (Ang II) (Lang *et al.*, 2000), a insulina (Fredesdorf *et al.*, 2004), e as catecolaminas (Sussman *et al.*, 2002; Dash *et al.*, 2003); assim como fatores de crescimento e citocinas liberadas localmente pelas células miocárdicas (Izumo e Sadoshima, 1997) e produtos

do estresse oxidativo, como exemplo o ânion superóxido (O_2^-) (Nakagami *et al.*, 2003) também induzem o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. Entretanto, ainda não está completamente elucidado se o estímulo primário para a hipertrofia é o estiramento mecânico do coração, fatores neuro-humorais, ou mesmo da interação de ambos.

A sinalização extracelular induz o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos pode também regular e modular a expressão gênica (Izumo e Sadoshima, 1997). O estiramento dos cardiomiócitos ativa segundos mensageiros como a proteína quinase C (PKC), as proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPKs) e a calcineurina. Essas proteínas ativadas promovem alterações nos fatores nucleares e na regulação de alguns genes, incluindo o gene que codifica o peptídeo natriurético atrial (ANP), o fator nuclear de ativação de células T (NFAT) e a cadeia pesada da β -miosina (β -MHC) (Molkentin & Dorn II, 2001; Kempf & Wollert, 2004; Molkentin, 2004). Assim sendo, parece que não há uma cascata de sinalização isolada para cada estímulo ou resposta, mas que múltiplas moléculas sinalizadoras ocorrem e podem formar uma rede de cascatas com numerosos elementos, facilitando o cruzamento entre elas. Assim, torna-se evidente que o bloqueio de uma das vias de sinalização intracelular não é suficiente para prevenir eficientemente o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. Similarmente, por meio da ativação de uma das vias, o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos pode ser deflagrado pelo cruzamento e pela ativação de outras redes de cascatas de sinalização.

O óxido nítrico (NO) produzido no coração é apontado como inibidor endógeno da cascata de sinalização que induz a hipertrofia cardíaca mal adaptada (Kempf e Wollert, 2004).

As primeiras evidências de que o NO pode apresentar efeitos anti-hipertróficos no coração foram obtidas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sob tratamento crônico com L-arginina (Matsuoka *et al.*, 1996). Posteriormente, tal papel do NO foi confirmado em

camundongos que hiperexpressam eNOS, nos quais o NO atenuou a hipertrofia cardíaca induzida pela infusão crônica de isoprenalina (ISO) (Ozaki *et al.*, 2002), indicando que o NO endógeno pode atuar como modulador negativo para a hipertrofia cardíaca.

1.1- Conceito e Classificação da Hipertrofia Ventricular Esquerda

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um conjunto de alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da microcirculação coronariana (Shirani *et al.*, 2000; Sussman *et al.*, 2002; Wollert e Drexler, 2002).

O crescimento dos cardiomiócitos que ocorre na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer de duas maneiras diferentes: pela adição de sarcômeros em série (sobrecarga de volume) ou em paralelo (sobrecarga de pressão), permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (Kempf e Wollert, 2004).

Segundo Kempf e Wollert (2004), a hipertrofia causada por sobrecargas hemodinâmicas podem conduzir à adaptada (fisiológica) ou mal-adaptação (patológica). Hipertrofia adaptada é aquela desenvolvida em decorrência da sobrecarga hemodinâmica transitória como as observadas no crescimento cardíaco durante a adolescência, a gestação e em resposta à exercícios regulares (coração de atleta), enquanto que a hipertrofia mal adaptada é aquela decorrente de sobrecarga hemodinâmica persistente. Na hipertrofia mal adaptada, além do aumento do tamanho da célula e a organização de novos sarcômeros, ocorrem diversas mudanças quantitativas e qualitativas, nos níveis de expressão gênica do cardiomiócito, as quais modificam as proteínas contráteis, os canais iônicos, e determinam prejuízo da função contrátil.

1.2- Pressão Arterial e Hipertensão

A pressão arterial (PA) depende de variáveis hemodinâmicas que podem ser equacionadas segundo a expressão: $PA = \text{Débito cardíaco (DC)} \times \text{Resistência Periférica Total (RPT)}$ ou Resistência Vascular Sistêmica (RVS). Cada um desses determinantes primários da PA é, por sua vez, determinado por uma interação complexa de processos e substâncias endógenas biologicamente ativas (Figura 1) (Cotran *et al.*, 1999).

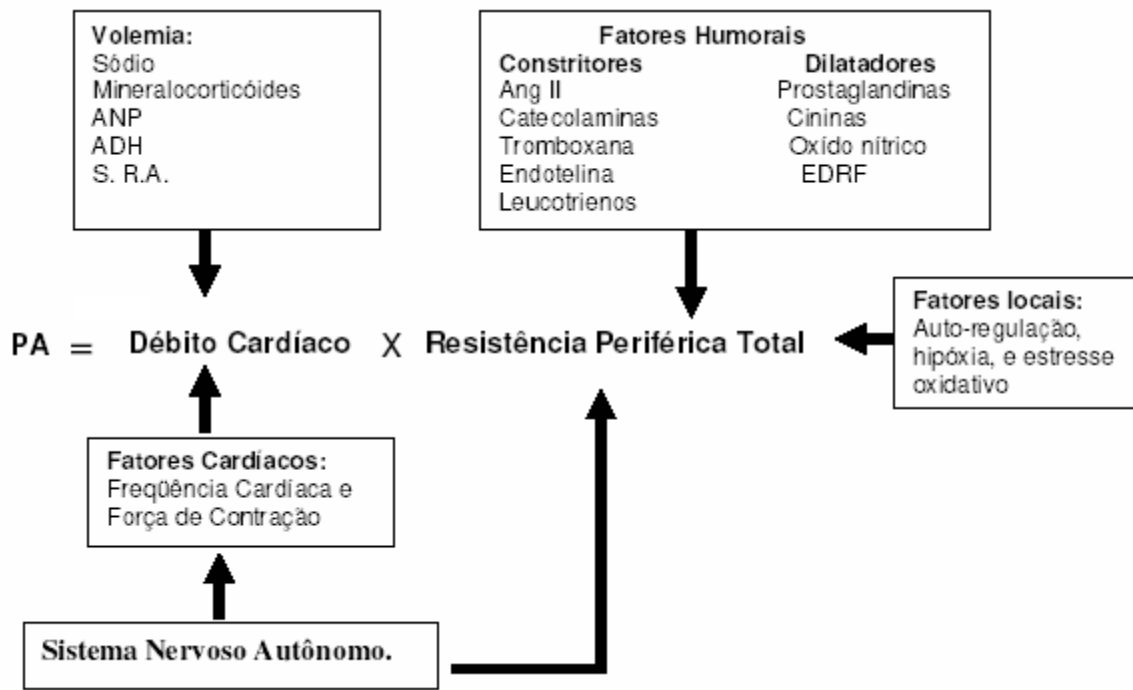


Figura 1 - Fatores envolvidos no controle da PA segundo Cotran *et al.* (1999).

O controle adequado da pressão arterial é imprescindível para a manutenção da pressão de perfusão tecidual nos diversos órgãos e sistemas em mamíferos e para a homeostase cardiovascular.

A hipertensão arterial (HA) é uma entidade clínica multifatorial, sendo classificada em hipertensão primária, quando não é possível identificar uma causa evidente, e, em hipertensão secundária, quando é causada por uma determinada disfunção conhecida (Filho, 2004).

Na hipertensão estabelecida são encontradas alterações nos mecanismos de controle (Figura 2), sendo difícil estabelecer quais os que tiveram papel preponderante no desencadeamento e mesmo na manutenção dos elevados valores de PA.

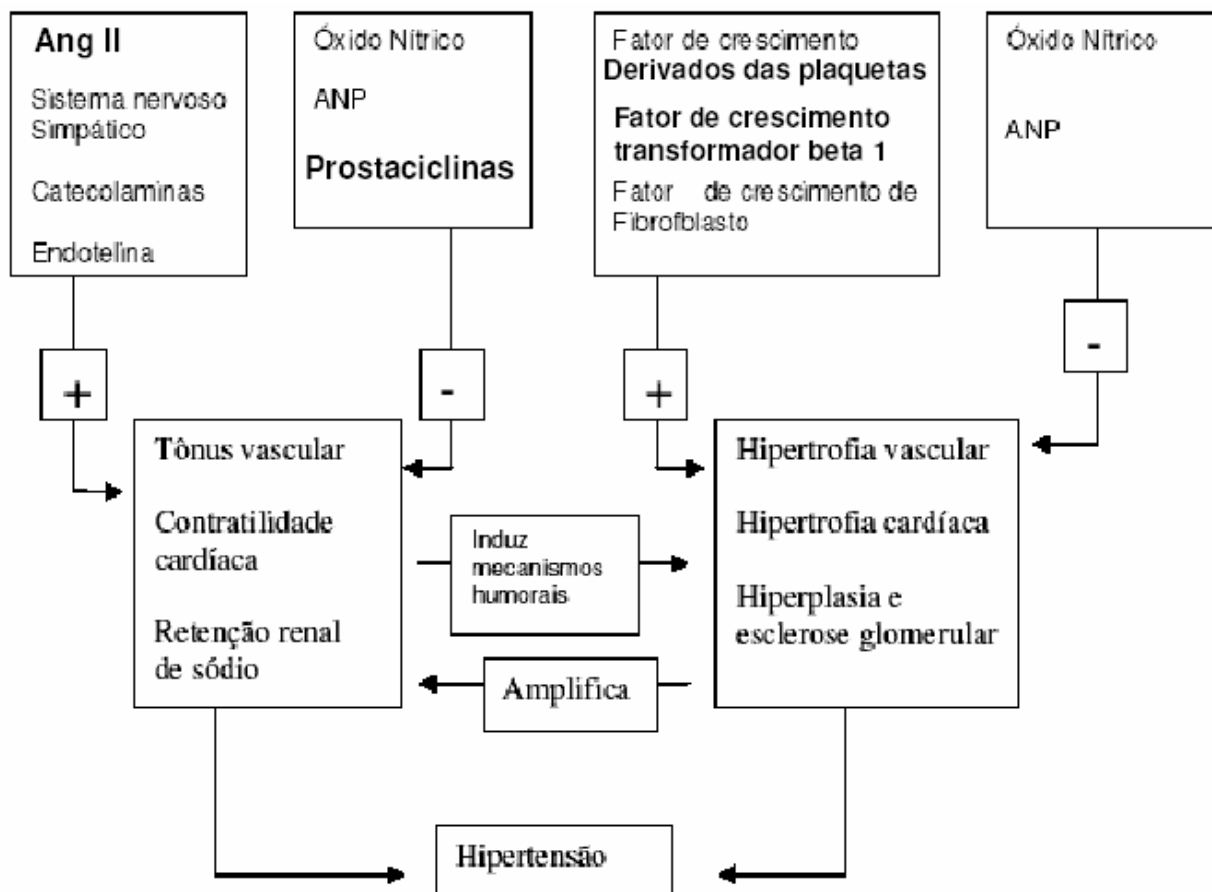


Figura 2 - Interação dos mecanismos que induzem à hipertensão arterial, segundo Dzau e Krieger (1993) + = estimulação; - = inibição.

Embora seja improvável que todos esses fatores estejam alterados ao mesmo tempo num dado indivíduo, arranjos múltiplos podem ser encontrados, uma vez que o marcador hemodinâmico da hipertensão primária é o aumento persistente da resistência vascular periférica, o qual pode ser determinado por diferentes associações desses fatores (Figura 1).

Numerosas evidências mostram que a disfunção endotelial desempenha importante fator fisiopatológico na síndrome HA. Essa disfunção pode ocorrer em resposta à redução de fatores

vasodilatadores e/ou ao aumento de fatores vasoconstritores, ou seja, a uma mudança compensatória nos diversos mediadores vasoativos. Tal decréscimo nos mecanismos que determinam a motricidade vascular contribui para o aumento sustentado da resistência periférica total. Sabe-se que indivíduos com predisposição genética ao desenvolvimento de HA apresentam disfunção endotelial e menor biodisponibilidade vascular de óxido nítrico (NO), o que contitue a provável gênese do processo hipertensivo. Padrão semelhante de disfunção endotelial é encontrado em hipertensos de difícil controle (Yugar-Toledo *et al.*, 2004). Contudo, a própria hipertensão, ou mediadores como a Ang II promovem a disfunção endotelial por meio da redução na produção do NO, aumento na produção dos fatores constritores derivados do endotélio e aumento dos radicais livres derivados do oxigênio (Vanhoutte,1996). Assim, ao lado de outros mecanismos, a disfunção endotelial contribui para o desequilíbrio do tônus nos territórios de resistência vascular (arteríolas e meta-arteríolas), induz à hipertrofia e à hiperplasia da musculatura lisa vascular e ao aumento da matriz extracelular com conseqüente redução da complacência vascular, perpetuando e agravando o quadro hipertensivo. O efeito hipertensivo promovido pelos inibidores enzimáticos da NOS em diversos modelos de estudo (Ribeiro *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2003), bem como a verificação do aumento da pressão arterial em camundongos homozigotos com a deleção do gene da NOS endotelial (Biecker *et al.*, 2004), demonstraram claramente a participação do NO secretado no endotélio na regulação da pressão arterial.

Por outro lado, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) correlaciona-se aos diversos processos fisiopatológicos cardiovasculares, dentre eles a HA (Harrison, 1997). O aumento das ROS altera os mecanismos que controlam a função endotelial (Li e Shah 2004; Tandon *et al.*, 2005), prejudicando a vasodilatação dependente do endotélio. Dentre as conseqüências deletérias do aumento da produção de superóxidos mediado pela ação

da Ang II, destaca-se a inativação do NO com a formação de peroxinitrito (Harrison, 1997) e sua conseqüente toxicidade e aumento da disfunção endotelial (Griendling *et al.*, 1994; Laursen *et al.*, 1997).

Em camundongos, a avaliação da pressão arterial sistólica (PAS), força que o sangue exerce na parede das artérias durante a sístole, é empregada com maior freqüência nos estudos dos parâmetros cardiovasculares. Nesses estudos, métodos não invasivos computadorizados têm sido utilizados por meio de pletismografia caudal (Kreger *et al.*, 1995). Os estudos efetuados em diversas cepas de camundongos mostram que os valores de PAS encontram-se no intervalo de 103 a 139 mmHg nos machos e de 102 a 135 mmHg nas fêmeas (Deschepper *et al.*, 2004), enquanto que a freqüência cardíaca em ambos os sexos encontra-se no intervalo de 470 a 650 bpm (Rao e Verkman, 2000).

1.3 - Fatores que Induzem a Hipertrofia Ventricular Esquerda

Os fatores que desencadeiam a resposta hipertrófica são de várias origens, incluindo fatores físicos associados às alterações hemodinâmicas (sobrecarga de volume ou pressão) e fatores neuro-humorais, os quais determinam diferentes fenótipos. O fenótipo hipertrófico dos cardiomiócitos é iniciado por múltiplos sinais endócrinos, autócrinos e parácrinos que estimulam os receptores encontrados no sarcolema da célula (Silva e Krieger, 2000; Franchini, 2002). Esses fatores são traduzidos no interior da célula como alterações bioquímicas que levam à ativação de segundos (citosólicos) e terceiros (nucleares) mensageiros que irão agir no núcleo da célula, regulando a atividade dos fatores de transcrição, e finalmente determinarão a expressão gênica que induz o crescimento do cardiomiócito (Silva e Krieger, 2000). Atualmente encontra-se descrito uma série de fatores associados às vias de sinalização e aos mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo hipertrófico.

1.3.1- Fatores Hemodinâmicos

1.3.1.1- Aumento da Necessidade Metabólica

A sobrecarga de trabalho é considerada o fator mais frequentemente envolvido na HVE. O aumento na atividade cardíaca pode estar associado à maior demanda fisiológica, como no exercício físico (Russel *et al.*, 2000; Machida *et al.*, 2000) e em estados de anemia crônica (Pereira *et al.*, 1993), como conseqüência do aumento da necessidade de bombear mais sangue para a periferia. Esse é um tipo de hipertrofia adaptativa. Nessas condições, ocorre hipertrofia predominantemente por aumento no volume dos cardiomiócitos, o que se acompanha de um aumento proporcional dos componentes do estroma, os quais são representados pelos fibroblastos e fibras colágenas, pelas células endoteliais e pelas células musculares lisas das paredes vasculares (Silva e Krieger, 2000), ocorrendo, assim, uma adaptação adequada às novas exigências. Esse processo é compatível com o estado funcional adequado do coração, não ocorrendo alterações das propriedades mecânicas do estroma, e, portanto, não levando à insuficiência funcional do órgão.

1.3.1.2- Sobrecarga de Pressão e/ou Volume

Condições patológicas como hipertensão arterial, estenose ou coarctação da aorta, denominadas de sobrecarga de pressão; ou as de insuficiência aórtica ou comunicação interatrial, denominadas sobrecarga de volume, podem promover a hipertrofia por aumento no volume dos cardiomiócitos, acompanhado de aumento e alteração na qualidade dos componentes da matriz colágena (Ozaki *et al.*, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002; Kempf e Wollert, 2004). A sobrecarga pressórica e o estímulo humoral da angiotensina II são os principais agentes estimuladores para a síntese de colágeno, enquanto o estiramento muscular imposto pela sobrecarga de volume favorece a sua degradação (Chancey *et al.*, 2002).

O aumento desproporcional da matriz intersticial colágena pode ocasionar disfunção miocárdica pela diminuição da complacência ventricular, bem como pela modificação da

geometria cardíaca (Janicki, 1992). Outro fator que determina a disfunção ventricular é o crescimento não-proporcional da densidade de vasos que ocasiona diminuição da reserva coronariana, com potencial deficiência de oxigenação e de nutrientes para os cardiomiócitos. Assim, o aumento do colágeno intersticial miocárdico, associado ou não à isquemia relativa, é o principal evento que promove disfunção miocárdica, notadamente a disfunção diastólica observada na hipertrofia ventricular.

O estímulo mecânico (sobrecarga de pressão ou volume) sobre o cardiomiócito, por meio do estiramento ou da deformação, pode ativar a célula por modificação da condutância de íons específicos ou de sinalização, utilizando proteínas transmembrana conhecidas como integrinas e liberando fatores de crescimento com atuação autócrina e parácrina (Franchini, 2002). O estiramento é capaz de ativar canais de Ca^{+2} , de Na^{+} e os trocadores de Na^{+}/H^{+} ; inativar canais de K^{+} ; ativar adenilciclase e fosfolipase C (Morgan *et al.*, 1987), além de estar associado ao acúmulo de inosítois de fosfato, os quais atuam como segundos mensageiros (Von Harsdorf *et al.*, 1989). As modificações induzidas pela ativação dos canais iônicos do sarcolema levam a variações da concentração iônica intracelular, o que pode representar um estímulo inicial para ativação de proteínas quinases (MAPK), envolvidas na ativação de proteínas reguladoras da atividade gênica (fatores de transcrição). As integrinas são responsáveis pelo acoplamento entre a matriz extracelular e o complexo de proteínas que formam a linha Z do sarcômero (Pardo *et al.*, 1983), não possuem atividade enzimática definida, mas atuam como receptores celulares de proteínas da matriz extracelular (p. ex.: colágeno e laminina). Na face intracelular da membrana, as integrinas conectam-se aos filamentos de desmina, que compõem a linha Z, por meio proteínas intermediárias como a vinculina, talina e α -actinina, as quais formam uma malha de proteínas filamentosas. Nessa malha posicionam-se proteínas sinalizadoras, como as tirosina-quinases coativadora de receptores esteroidais (Src) e quinase de

adesão focal (Fak), além de outras responsáveis pelo início do processo de sinalização ativado pelas integrinas (Burrige *et al.*, 1996). O mecanismo preciso pelo qual se dá o vínculo entre o estímulo mecânico e a ativação dessas vias de sinalização não está ainda esclarecido, mas sabe-se que, após o estímulo mecânico, essas moléculas são ativadas e ativam mecanismos que controlam o crescimento celular (Franchini *et al.*, 2000; Torsoni *et al.*, 2001). O estímulo mecânico também provoca a liberação local de fatores de crescimento e citocinas [fator de crescimento de fibroblatos (FGF), fator de crescimento transformador β (TGF β), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e cardiotrofina-1] pelas células miocárdicas (Sussman, *et al.*, 2002). A ação parácrina ou autócrina desses fatores pode contribuir ou mesmo determinar o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. Esses fatores podem ligar-se aos receptores específicos de membrana com atividade de tirosina quinase ou serina quinase e dar início à cascata de eventos responsáveis pelo crescimento hipertrófico cardíaco.

1.3.2- Fatores Neuro-Humorais

1.3.2.1- Catecolaminas e Sistema Nervoso Simpático

O sistema nervoso simpático contribui para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, bem como para a deterioração funcional e estrutural na hipertrofia mal adaptada. Os efeitos das catecolaminas sobre os cardiomiócitos são mediados por receptores β e α adrenérgicos. Tanto os receptores β -adrenérgicos (β -AR) como os α -adrenérgicos (α -AR) pertencem à superfamília dos receptores acoplados às proteínas G (GPCR) (Sabri *et al.*, 2000).

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) ativa a adenilato-ciclase pela interação com a proteína G estimulatória (Gs), a qual desencadeia cascatas intracelulares que ativam proteínas quinases A, estimulando também a p38-MPAK (Dash *et al.*, 2003). Essa via estimulada determina diferentes funções celulares, incluindo a transcrição gênica e o crescimento celular que se forem mantidos cronicamente, poderá acarretar a falência cardíaca. A

estimulação crônica dos β -AR pela administração de isoproterenol (Xião *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2006) induz aumento da massa cardíaca, dos cardiomiócitos, da fibrose miocárdica e da disfunção progressiva, o que culmina com insuficiência cardíaca. A utilização de animais geneticamente modificados permitiu elucidar a participação relativa dos subtipos β -AR no desenvolvimento das alterações fenotípicas cardíacas. Assim, a hiperexpressão miocárdica de receptores β_1 -AR induz à hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose do tecido cardíaco, o que leva a insuficiência cardíaca (Engelhardt *et al.*, 1999). Entretanto, o aumento de cerca de 5 a 15 vezes que ocorre na população de β -AR, neste modelo experimental, não é acompanhado de ativação espontânea da adenilato-ciclase, mas causa aumento de sensibilidade às catecolaminas endógenas, sendo a causa provável do desenvolvimento das alterações fenotípicas observadas. Por outro lado, a hiperexpressão de β_2 -AR, com aumento de cerca de 200 vezes, produz ativação basal da adenilato-ciclase acompanhada de aumento na produção basal de cAMP e na contratilidade (Milano *et al.*, 1994). Contudo, nenhuma alteração fenotípica foi observada nos corações desses animais. A causa da discrepância entre os efeitos da hiperexpressão de β_1 -AR e β_2 -AR sobre o fenótipo cardíaco não está esclarecida, mas pode ser devida à mobilização de adenilato-ciclasas, localizadas em compartimentos celulares diferentes ou à ativação de distintos mecanismos contra-regulatórios.

Os cardiomiócitos expressam também receptores α_1 -adrenérgicos dos subtipos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} . Agudamente, a ativação dos α_1 -AR aumenta a contratilidade mediada pela ativação da proteína Gq. Esta induz à ativação da fosfolipase C, que estimula hidrólise de fosfatidil inosítois da membrana, gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). O IP3 estimula a liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, enquanto que o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e, esta, por sua vez, induz hipertrofia em cultura de miócitos

neonatais (Shubeita *et al.*, 1992). Quando os cardiomiócitos são expostos cronicamente a agonistas de α_1 -AR, estes desenvolvem hipertrofia (Simpson e MCGrath, 1983).

A hiperexpressão de adrenoceptores α_{1A} e α_{1B} em coração de camundongos, no entanto, não induz alterações significativas na estrutura miocárdica ou qualquer grau de hipertrofia, embora a atividade basal desses receptores esteja aumentada (Milano *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2001). Por outro lado, o aumento da expressão da proteína Gq no miocárdio resulta em intensa indução de genes hipertroáficos (Sakata *et al.*, 1998). No entanto, vários outros receptores de diferentes sistemas, como Ang II, endotelina e o próprio sistema adrenérgico, estão acoplados às proteínas Gq, de forma que os resultados obtidos nesse modelo podem não se referir especificamente às vias de sinalização intracelulares ativadas por α_1 -AR.

1.3.2.2- Angiotensina II

A expressão de genes que codificam precursores do sistema renina-angiotensina (SRA) como, por exemplo, o angiotensinogênio e o mRNA da enzima renina podem ser detectados no tecido cardíaco. Em situações de sobrecarga hemodinâmica determinada por coarctação da aorta abdominal, a hipertrofia cardíaca foi associada ao aumento na expressão do angiotensinogênio no ventrículo esquerdo (Baker *et al.*, 1990). Além disso, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) estão entre as drogas anti-hipertensivas com maior eficácia na redução da HVE (Schmieder *et al.*, 1996). Apesar de tais evidências indicarem a participação da Ang II na hipertrofia miocárdica, sua participação no processo de hipertrofia em modelos *in vivo* ainda não foi possível de estudos realizados em animais transgênicos e “knockout” para os componentes do SRA são conflitantes.

Camundongos transgênicos que hiperexpressam o receptor AT1 humano, direcionado pelo promotor da α -MHC de camundongo, apresentaram alterações morfológicas nos cardiomiócitos e nas demais células do miocárdio que mimetizam aquelas observadas durante o

desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em humanos e em animais de experimentação (Paradis *et al.*, 2000). Tais animais apresentaram remodelamento cardíaco significativo com desenvolvimento da insuficiência cardíaca precoce, expressão do ANP e deposição de colágeno intersticial. No entanto, animais com deleção de receptores AT1 não apresentaram atenuação da hipertrofia induzida por sobrecarga pressora (Harada *et al.*, 1998), o que pode indicar que a participação da Ang II na hipertrofia cardíaca se restringe a algumas condições específicas de excesso de Ang II, associada à alterações nos mecanismos de controle dos receptores da Ang II. Nesse contexto, estudos de Senbonmatsu *et al.* (2000) demonstraram que camundongos com deleção do receptor AT2 apresentaram atenuação da hipertrofia induzida por sobrecarga pressora, sugerindo que a deficiência de receptores AT1 pode ser compensada pelos receptores AT2, ou, ainda, que este subtipo AT2 possa ter papel predominante nos efeitos tróficos da Ang II em cardiomiócitos.

1.3.2.3- Insulina

A insulina pode estimular a síntese de proteínas miocárdicas e a hipertrofia cardíaca direta ou indiretamente. No primeiro caso, sinalizadores da via da insulina estão envolvidos na promoção do crescimento do miócito e interagem com respostas proliferativas mediadas por receptores acoplados à proteína G. esta via induz à hipertrofia cardíaca via MEK/ERK1/2, caracterizada pela hipertrofia dos cardiomiócitos e aumento da fibrose intersticial (Samuelsson *et al.*, 2006). Indiretamente, a insulina pode aumentar a expressão de RNAm dos receptores AT2 (Samuelsson *et al.*, 2006) e induzir à ativação do sistema nervoso simpático (Hunter e Chien, 1999).

1.3.2.4- Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) é denominada de estresse oxidativo / nitrosativo, respectivamente. O

acúmulo de ROS e de RNS causa danos à estrutura das biomoléculas e de outros componentes celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (Droge, 2002) em diversos tecidos e órgãos, inclusive hipertrofia cardíaca (Lang *et al.*, 2000; Aikawa *et al.*, 2001).

Várias situações fisiopatológicas e genéticas podem induzir estresse oxidativo cardíaco, como, por exemplo, aumento na concentração de Ang II (Lang *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2003), hipercolesterolemia (Sato *et al.*, 2004), estresse mecânico no miocárdio (Aikawa *et al.*, 2001), processos inflamatórios (Yao *et al.*, 2006).

A hipertensão e o estresse mecânico no miocárdio induzem ao aumento das ROS nos cardiomiócitos, ativando a família de proteínas quinase ativadora mitogênica (MAPK) (Aikawa *et al.*, 2001), as quais desempenha papel importante na hipertrofia cardíaca. Além disso, o desequilíbrio redox reduz a biodisponibilidade do NO no sistema cardiovascular (Li e Shah, 2004; Stokes e Granger, 2005) alterando a rede de sinalização no controle pro e antiproliferativo do coração, desencadeando um remodelamento do miocárdio (Ungvari *et al.*, 2005).

1.3.2.5- Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia, além de induzir ao estresse oxidativo (Ohara *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 2004), pode, alterar a função e a expressão de canais de K_{ATP} em miocárdio (Ueda *et al.*, 1999; Genda *et al.*, 2002) induzindo à hipertrofia cardíaca, pelo simples fato de que a ativação desses canais atenua a hipertrofia cardíaca por meio da inibição da 70- KDa S6 Kinase (Lee *et al.*, 2004), enzima que atua como gatilho para síntese protéica no remodelamento do miocárdio. Além disso, a hiperlipidemia está associada a aumentos na concentração de endotelina 1 (ET1) plasmática, induzindo à alteração vasomotora (Lee *et al.*, 2005). Em adição à propriedade vasoconstritora, a endotelina ativa três vias de sinalização hipertrófica nos cardiomiócitos: PKC, MAPK e fosfatidil 3 quinase /AKT (Sugden, 2002).

1.3.2.6- Citocinas e Fatores de Crescimento Induzidos pelo Processo Inflamatório

A trílogia composta por: processo inflamatório (Libby *et al.*, 2002; Kai *et al.*, 2005), disfunção do endotélio (Keaney Jr, 2000; Aubin *et al.*, 2006) e estresse oxidativo (Harrison, 1997; Lang *et al.* 2000), no ambiente cardiovascular, é considerada como o denominador comum dentre os mecanismos que promovem e sustentam a hipertrofia cardíaca e a aterogênese. Os eventos subseqüentes à hipercolesterolemia, associados ao estresse oxidativo, que induzem ao processo inflamatório e à formação do ateroma podem ser a oxidação da LDL, infiltração de macrófagos na parede vascular coronariana e nas regiões intersticiais do tecido cardíaco, englobamento das partículas de LDL modificadas, e conseqüente ativação das células inflamatórias com superexpressão do CD40L (Sanguigni *et al.*, 2005) e produção de citocinas (Nian *et al.*, 2004).

O CD40L (ligante) é uma proteína transmembrana expressa na superfície de linfócitos, das células endoteliais, das células da musculatura lisa vascular e de macrófagos (Schoenberck e Libby, 2001). Essa proteína exerce um efeito pró oxidante (Urbich *et al.*, 2002) e sua interação com seu receptor CD40 induz à resposta inflamatória, favorecendo a progressão da aterogênese (André *et al.*, 2002), a síndrome coronária aguda (Vishnevetsky *et al.*, 2004) e a insuficiência cardíaca (Ueland *et al.*, 2005). A interação entre CD40 e CD40L ativa a via NFkappa β (Bowie e O'Neill 2000; Gelbmann *et al.*, 2003), promove a fosforilação do IKK (inibidor Kappa β quinase), resultando na translocação do fator nuclear Kappa β (NFkappa β) para o núcleo, onde ativa genes envolvidos na inflamação e no crescimento celular (Nian *et al.*, 2004; Vellaichamy *et al.*, 2005). A ativação do NFkappa β participa do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em camundongos, caracterizada por aumento do depósito de colágeno (Vellaichamy *et al.*, 2005).

Citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 6 (IL 6), não são expressas constitutivamente no tecido cardíaco (Kapadia *et al.*, 1997). O aumento na regulação e na produção dessas citocinas representa uma resposta inflamatória

contra injúrias do miocárdio (Mann, 2002). O TNF- α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, além de outras células, como linfócitos, fibroblastos, neutrófilos, células musculares lisas e mastócitos (Adamopoulos *et al.*, 2001). Além disso, cardiomiócito de mamíferos adultos pode produzir TNF- α , após estímulos extracelulares, tais como endotoxinas, hipóxia ou aumento do estresse mecânico (Kapadia *et al.*, 1997). O TNF α induz à hipertrofia cardíaca “*in vivo*”, por determinar aumento na síntese de proteínas estruturais e contráteis dos cardiomiócitos (Yokoyama *et al.*, 1997).

A ativação dos linfócitos T resulta na produção de interferon- γ que, por sua vez, aumenta a síntese de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1. Essas citocinas induzem à produção de grandes quantidades de IL-6, a qual estimulará a produção de proteínas inflamatórias (Hansson 2005) e também parece estar envolvida com a hipertrofia cardíaca. No miocárdio, a cardiotrofina-1 que é um importante membro da família das IL-6, interage com receptores de membrana gp-130 (Wollert *et al.*, 1996) e sua ativação induz à hipertrofia cardíaca em camundongos (Hirota *et al.*, 1995).

Citocinas incluindo TNF- α e o fator transformador de crescimento (TGF- β) também desempenham um importante papel na regulação do depósito de colágeno. O aumento da concentração de citocinas após do infarto do miocárdio em ratos aumenta os depósitos de colágeno dos tipos I e III (Deten *et al.*, 2001). TNF- α pode também induzir ao aumento na expressão de receptores AT1, aumentando o efeito mediado por angiotensina II em favor da fibrose (Peng *et al.*, 2002).

1.4- Via Óxido Nítrico/Óxido Nítrico Sintase na Homeostasia Cardiovascular

1.4.1- Oxido Nítrico Sintases

O NO é produzido por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOSs). Do ponto de vista bioquímico, essa é uma família de enzimas complexas que catalisam a oxidação da L-

arginina para produzir óxido nítrico e L-citrulina. Três isoformas de NOS foram inicialmente caracterizadas: a isoforma neuronal (NOS neuronal ou NOSn), identificada no cérebro; a isoforma induzida (NOS induzida ou NOSi) em macrófagos; e a isoforma endotelial (NOS endotelial ou NOSe) em células endoteliais (Harrison, 1997) e cardiomiócitos (Balligand *et al.*, 1995). NOSn e NOSe apresentam expressão constitutiva (óxido nítrico sintases constitutivas, NOSc) e produzem baixa quantidade de NO, quando ativadas por cálcio (Ca^{+2}) (Balligand e Cannon, 1997). A NOSi é expressa somente em resposta a estímulos pró-inflamatórios e citocinas e pode produzir grande quantidade de NO (Balligand e Cannon, 1997).

No miocárdio sadio, a NOSe encontra-se expressa principalmente no endotélio vascular coronariano e no endotélio cardíaco (Schulz *et al.*, 1991; Andries *et al.*, 1998), assim como nos cardiomiócitos (Balligand *et al.*, 1995). Nessas células localiza-se nas cavéolas, ancorada pela caveolina 3 na membrana plasmática, próximo aos canais de Ca^{+2} tipo L (Kempf e Wollert, 2004).

A NOSn está presente nos gânglios nervosos intracardíacos, nas fibras nervosas atriais e em algumas fibras nervosas perivasculares dos ventrículos (Klimaschewski *et al.*, 1992). Sua expressão também foi detectada nos cardiomiócitos e nas células da musculatura lisa de pequenas e grandes artérias coronarianas de ratos (Tambascia *et al.*, 2000). Nessas células a NOSn localiza-se no retículo sarcoplasmático, próximo aos receptores de rianodina (Xu *et al.*, 1999). O coração adulto não expressa normalmente NOSi. Essa é ativada por mediadores do processo inflamatório em muitos tipos de células, incluindo células endoteliais e cardiomiócitos (Andrey e Mayer, 1999). Pode ser identificada no citosol (Kempf e Wollert, 2004), mas já foi encontrada no espaço perinuclear, no complexo de Golgi, na mitocôndria e na membrana plasmática (Xu *et al.*, 2003).

As oxido nítrico sintases (NOSs) possuem, em cada lado da molécula, duas porções funcionalmente complementares. Na porção carboxiterminal, existe um domínio redutase, o qual recebe elétrons do NADPH e, na porção aminoterminal, existe o domínio oxidase, o qual subtrai um elétron do substrato L-arginina e possui sítios de ligação para o grupo heme e para o co-fator tetraidrobiopterina. As duas porções são unidas por um sítio de ligação para cálcio-calmodulina, essencial para o acoplamento funcional da transferência de elétrons dos grupos flavina para o grupo heme (Stuehr *et al.*, 2001). A produção de NO ocorre após cinco passos envolvendo transferência de elétrons, dada pela seguinte ordem: NADPH – FAD (flavina adenina dinucleotídeo) – FMN (flavina mononucleotídeo) – calmodulina – heme/oxigênio – L-arginina/NO. A transferência de elétrons para o ferro do grupo heme induz a sua ativação, com conseqüente ligação ao oxigênio molecular, e este complexo catalisa a oxidação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, resultando na síntese de NO e do subproduto L-citrulina (Sase e Michel, 1997; Govers e Rabelink, 2001).

1.4.2- Mecanismos Regulatórios da Ativação das Oxido Nítrico Sintases

A expressão da NOSe pode ser ativada por hormônios, como catecolaminas e vasopressina; autacóides, como bradicinina e histamina, e por mediadores derivados das plaquetas, como serotonina e adenosina difosfato (ADP) (Andrey e Mayer, 1999). A ativação da NOSe por forças mecânicas como *shear stress* e estiramento cíclico pode ser mediado pelo aumento na concentração de cálcio intra celular e também através da ativação da proteína G (Andrey e Mayer, 1999).

Como citado anteriormente, a NOSe encontra-se ancorada por meio da proteína caveolina nas cavéolas, invaginações da membrana plasmática ricas em esfingolípídeos e colesterol (Govers e Rabelink, 2001). O tráfego da NOSe para a cavéola é dependente da adição enzimática de resíduos de ácidos graxos (Govers e Rabelink, 2001). O enriquecimento da NOSe

com uma molécula de miristato e duas de palmitato, adicionadas após a tradução, permite a ancoragem da NOSe na cavéola por meio da caveolina, a qual exerce ação inibitória sobre a NOSe (Michel, 1997; Govers e Rabelink, 2001). Essa conformação inibitória da NOSe é atenuada e revertida mediante a elevação da concentração de cálcio/calmodulina e/ou sua fosforilação pela AKT quinase (Shiojima e Walsh, 2002).

Um outro mecanismo que influencia a atividade das NOSs é a inibição alostérica pelo próprio NO, que é capaz de se ligar ao grupo heme da enzima e inibir o transporte de elétrons (Griscavage *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 2002). A inibição pelo NO parece ocorrer particularmente para NOSn, em grau menor para NOSe e está caracteristicamente ausente na NOSi (Griscavage *et al.*, 1994; Espey *et al.*, 2002).

1.4.3 – Desacoplamento da Síntese de Óxido Nítrico

Em situações de aumento na atividade enzimática das NOSc e atividade normal e sustentada da iNOS pode ocorrer uma deficiência relativa de cofatores, o que induz ao fenômeno denominado de desacoplamento da NOS (Harrison, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Cai e Harrison 2000). O desacoplamento da NOS é designado em condições em que a transferência de elétrons da NOS não se completa de modo adequado. Assim, os elétrons que vazam durante a atividade enzimática são captados pelo oxigênio molecular, que é por excelência o aceptor de elétrons em organismos aeróbicos, geram o radical superóxido, conforme pode ser visto na figura 3 (Harrison, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998;).

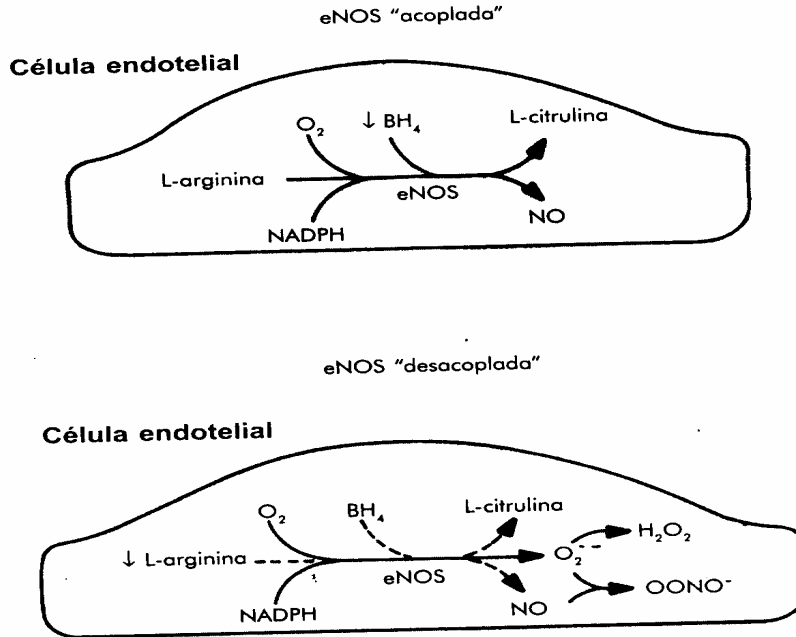


Figura 3 – Representação esquemática do “desacoplamento” da eNOS segundo Da Luz *et al.* (2003)

Em outras palavras, a NOS desacoplada funciona como uma NADPH oxidase, pois a sua atividade determina a transferência de um elétron do NADPH para o oxigênio molecular (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). Portanto, a NOS desacoplada não apenas priva o ambiente celular da síntese de NO, como também produz o principal antagonista do NO, o radical superóxido, propiciando uma situação ideal para geração do intermediário tóxico peroxinitrito (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Cai e Harrison 2000).

O desacoplamento da NOS parece constituir um importante mecanismo na geração da disfunção endotelial (Consetino *et al.*, 1998; Govers e Rabelink, 2001) e do remodelamento cardíaco (Takimoto *et al.*, 2005), uma vez que uma série de condições associadas à hipertrofia cardíaca é capaz de induzir desacoplamento. Essas condições são demonstradas em células endoteliais tratadas com LDL nativa (Pritchard *et al.*, 2001) ou LDL oxidada (Goligorski *et al.*,

2002), deficiência de co-fatores e L-arginina (Cooke e Okda, 2001), aumento plasmático da dimetil arginina assimétrica em presença da LDL oxidada (Boger *et al.*, 2000) e sobrecarga de pressão cardíaca (Takimoto *et al.*, 2005). Em relação ao desacoplamento da NOSe, recentes estudos mostram o paradoxal aumento da suscetibilidade à aterosclerose em camundongos que superexpressam a NOSe (Napoli e Ignarro, 2001). Esse efeito parece ser explicado pela desproporção entre a expressão da proteína NOSe e a atividade dos co-fatores da enzima. Assim, um aumento da expressão da NOSe não é suficiente para garantir que o substrato final da enzima seja o NO, em condições de exercer bioatividade protetora do vaso.

De maneira similar à descrita para a NOSe, a NOSn em situação de baixa concentração ou na ausência de L-arginina também induz à formação de superóxido e H₂O₂ (Andrey e Mayer, 1999).

Após a indução, a NOSi permanece ativada por 20 horas (Davies *et al.*, 1995), durante as quais e sintetiza NO em concentração 1000 vezes maior que a NOSc (Wong e Marsden, 1996) e, em condições de substrato ou cofatores deficientes, reduz oxigênio molecular a superóxido (Kempf e Wollert, 2004). Superóxido e peroxinitrito, formado pela interação de NO com superóxido, são altamente tóxicos para os cardiomiócitos (Arstall *et al.*, 1999). Assim, camundongos que superexpressam NOSi em cardiomiócitos desenvolvem dilatação cardíaca e apresentam morte prematura. A superexpressão da NOSi miocárdica foi associada à infiltração de células inflamatórias, à fibrose, ao aumento da massa cardíaca e, ainda, a morte de cardiomiócitos (Wollert e Drexler, 2002).

1.4.4- Funções do Oxido Nítrico

A formação do NO em cardiomiócitos é altamente compartimentalizada (Ziolo e Bers, 2003), como resultado da localização das NOSs. Devido à alta reatividade natural do NO, sua síntese na proximidade do seu alvo facilita sua acessibilidade aos processos intracelulares para

uma sinalização coordenada (Fleming e Busse, 1999). Há evidências de que os efeitos opostos do NO na função cardíaca sejam devidos a este confinamento espacial das diferentes isoformas das NOSs. Tem sido verificado que o NO produzido pela NOSe e pela NOSn promove redução e aumento da contratilidade, respectivamente (Barouch *et al.*, 2002; Khan *et al.*; 2003). O NO diminui a atividade dos canais de Ca^{+2} tipo L da membrana plasmática, bem como dos receptores β adrenérgicos e, por outro lado, estimula os canais de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (Barouch *et al.*, 2002), determinando os efeitos opostos sobre a contratilidade do miocárdio.

Independente da especificidade funcional das NOSc em cardiomiócitos, o NO exerce um efeito anti-hipertrofico “*in vivo*”, já que camundongos deficientes em NOSn ou NOSe desenvolveram hipertrofia cardíaca espontânea (Barouch *et al.*, 2002) e, ainda, os deficientes em NOSn e NOSe desenvolveram hipertrofia mais pronunciada (Barouch *et al.*, 2003).

O efeito inotrópico promovido por doadores de NO é bimodal, com um efeito inotrópico positivo em baixa concentração de NO, mas negativo em alta concentração (Massion *et al.*, 2003). Definir a faixa de concentração de NO é muito difícil, pois há uma grande discrepância entre os modelos empregados. E, ainda, tal discrepância está relacionada à efetiva concentração de NO bioativo no tecido, devido à quantia produzida “*in vivo*” e à liberada por doadores exógenos de NO, uma vez que NO tem alta afinidade por radicais oxidantes ou “scavengers”, como a mioglobina, que é particularmente abundante no cardiomiócito (Massion *et al.*, 2003).

Os mecanismos intracelulares descritos para o efeito do NO são diversos (Massion *et al.*, 2003). O alvo intracelular bem definido do NO é a guanilato ciclase solúvel (GCs), a qual possui um grupo heme que atua comoceptor de NO e converte cataliticamente a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP). O cGMP, segundo mensageiro, pode promover a ativação de canais de potássio (canais K_{ATP}) no sarcolema dos cardiomiócitos,

da proteína kinase G (PKG) que inibe os canais de Ca^{+2} tipo L (Gallo *et al.*, 1998) e, ainda, a fosforilação a Troponina I (TnI), desensibilizando os miofilamentos cardíacos para o Ca^{+2} , resultando na diminuição da força contrátil e atenuando efeitos adrenérgicos (Layland *et al.*, 2002). Além disso, o cGMP ativa a fosfodiesterase II (PEDII) que reduz a concentração citosólica de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o que pode promover a inibição da proteína quinase A (PKA) com conseqüente efeito inotrópico e cronotrópico negativo (Massion *et al.* 2003). Esses efeitos atribuídos ao NO tem caráter autócrino, uma vez que este é produzido pela NOSe ou NOSi nos próprios cardiomiócitos, mediante estímulos variados (Han *et al.*, 1998; Ziolo *et al.*, 2001; Barouch *et al.*, 2002), mas pode ser também um efeito parácrino do NO, produzido pelas NOSi e NOSe nas células endoteliais (Balligand e Cannon, 1997). Por outro lado, o NO produzido pelas NOSc expressas nas varicosidades neuronais determina a diminuição da liberação de noradrenalina (NA) e potencializa a liberação de acetilcolina (ACh), reforçando a modulação anti-adrenérgica no coração (Paton *et al.*, 2002). O NO endógeno apresenta outros efeitos metabólicos e iônicos por meio de vias independentes do GMPc, como, por exemplo, a inibição da respiração mitocondrial, a inibição do transporte de glicose, aumento do transporte dos ácidos graxos livres e a ativação da Bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}_{ase}$ nos cardiomiócitos (Massion *et al.*, 2003).

Uma série de estudos demonstrou que o NO promove efeito anti-hipertrófico por meio da modulação negativa das vias pro-hipertróficas (Figura 4) (Kempf e Wollert, 2004), sendo que a via dependente de GMPc desempenha um papel central nesse efeito, como demonstrado nas figuras 4 e 5. O aumento de GMPc no meio intracelular inibe, via PKG, a rede de sinalização das diferentes vias pro-hipertróficas que envolvem as MAPKs (Fiedler e Wollert, 2004) (Figura 4). Essas vias, tanto podem estar relacionadas ao crescimento, à diferenciação celular como também a inflamação.

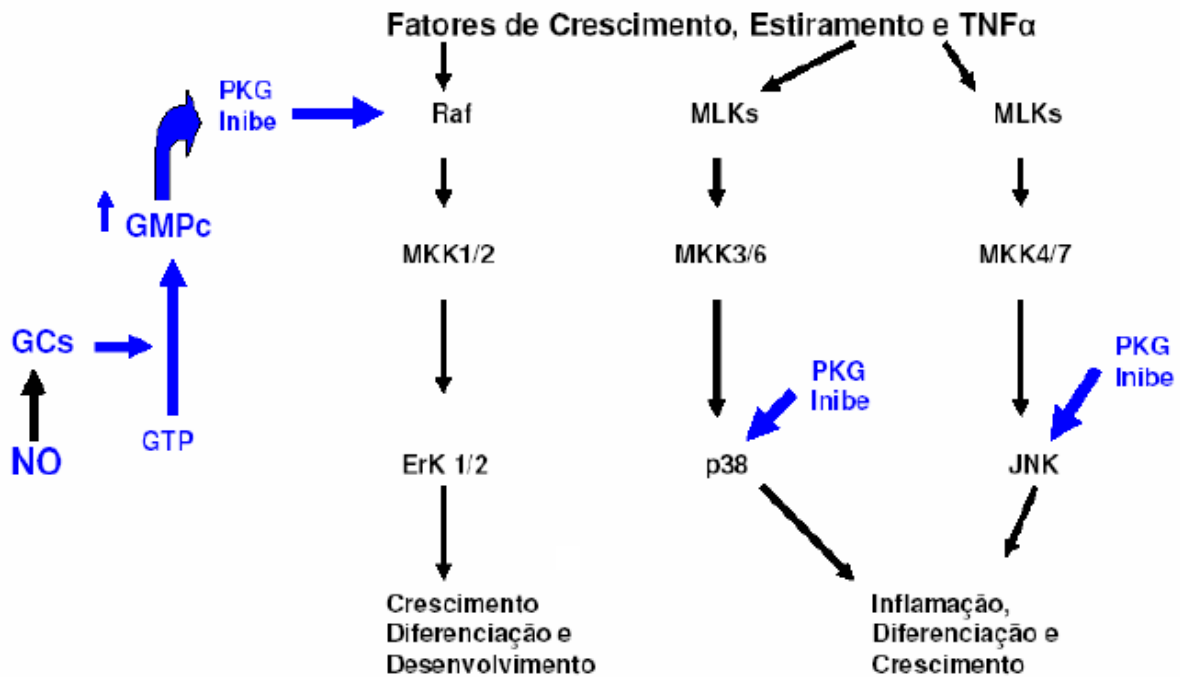


Figura 4 – Papel do GMPc intracelular na rede de sinalização das MAPKs via PKG na hipertrofia cardíaca.

Além disso, NO-GMPc dependente pode ser efetivado por meio de outras vias de sinalização anti-hipertróficas, como a via mediada pela proteína quinase G I (PKG I), a qual pode inibir os seguintes processos: (1) via calcineurina/fator nuclear ativador de células T (NFAT), pela diminuição do influxo de cálcio pelos canais de cálcio tipo L (LTCC) (Fiedler *et al.*, 2002; Fiedler *et al.*, 2004) (Figura 5); (2) expressão dos genes hipertróficos, como a ciclina D2 (Bush *et al.*, 2002), trocador Na^+/H^+ tipo I (Engelhardt *et al.*, 2002) e a proteína muscular LIM (MLP) (Heineke *et al.*, 2003) (Figura 5) e (3) ativação do fator de transcrição NFkappa β (Vellaichamy *et al.*, 2005).

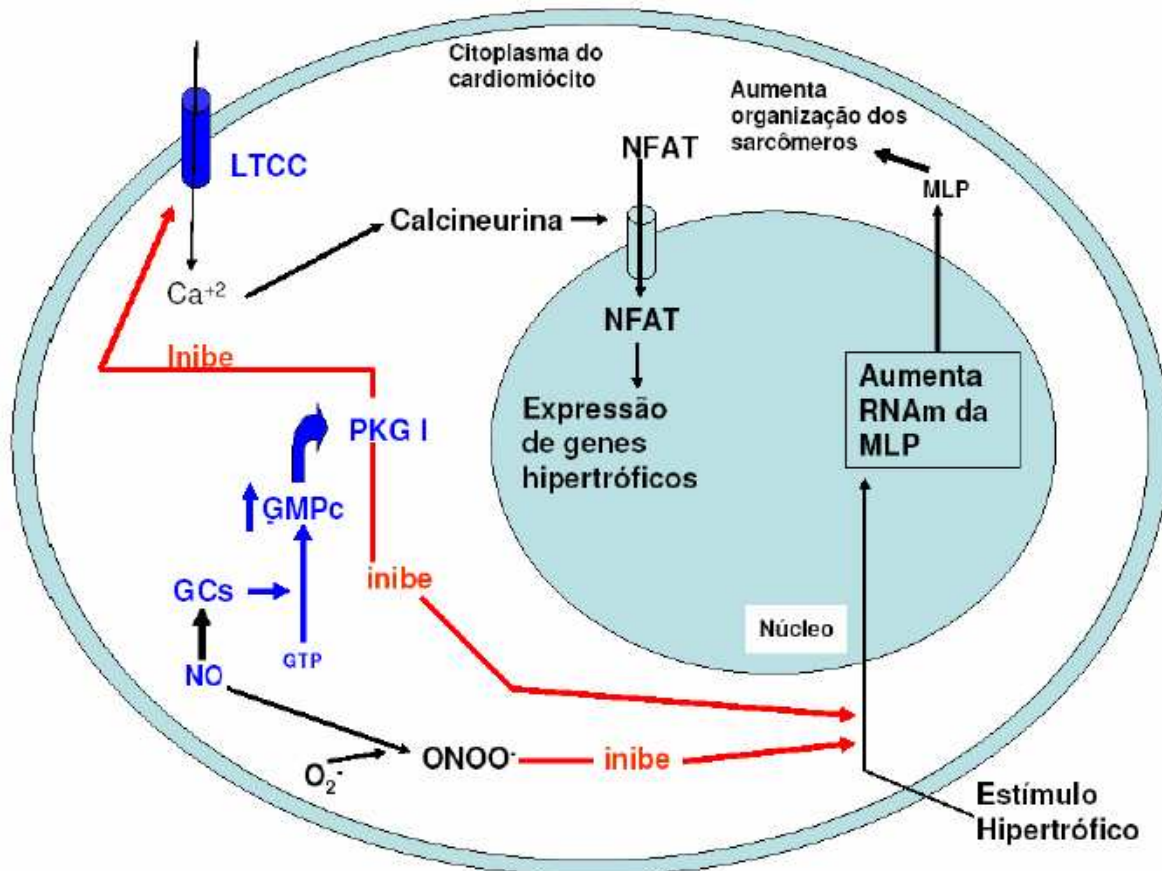


Figura 5 - Papel do GMPc intracelular na rede de sinalização calcineurina – NFAT e MLP, via PKG I na hipertrofia cardíaca segundo Kempf e Wollert (2004).

Em adição a seus efeitos anti-hipertroáficos, o NO apresenta um efeito pró-apoptótico dose-dependente em cardiomiócitos. Assim, baixas concentrações de NO inibem a hipertrofia do cardiomiócito, enquanto altas concentrações de NO são requeridas para induzir à ativação de caspases, fragmentação de DNA e apoptose (Wollert *et al.*, 2002). A apoptose estimulada pelo NO em cardiomiócitos adultos está associada à alteração na expressão dos genes pró-apoptótico da família Bcl-2, o Bax e o Bak, os quais desempenham papel crítico na determinação do destino da célula, em parte por alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Haunstetter e Izumo, 1998).

1.5- Doadores de Óxido Nítrico

Existem diversas classes de compostos que têm potencial de se decompor e doar NO. Entre elas, podem-se citar os nitritos e nitratos orgânicos, os complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *S*-nitrosotióis e *N*-hidroxiguanidinas (Tabela 1).

Dentre os compostos que apresentam grande potencial como doadores de NO encontram-se os *S*-nitrosotióis (RSNOs) de baixo peso molecular. Os RSNOs são espécies endógenas que foram detectados em fluidos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos, onde atuam nos sistemas biológicos como carregadores de NO, na forma de tióis livres ou em proteínas contendo cisteína (Stamler, 1992).

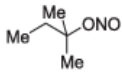

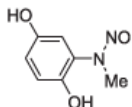
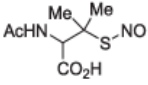
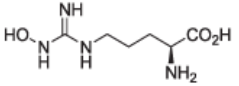
Nome	Composto representativo	Mecanismo de Liberação de NO	
		não-enzimático	enzimático
Nitritos orgânicos		Hidrólise e nitrosação, tióis, luz e aquecimento	Enzimas citossólicas, enzimas microssômicas e xantina oxidase
Nitratos orgânicos		Tióis	Cit-P450, GST e enzimas ligadas à membrana
Complexos NO-metálicos	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Tióis, luz, redutores e nucleófilos	Enzimas ligadas à membrana
<i>N</i> -nitrosaminas		$\cdot\text{OH}$ e luz	Cit-P450
<i>S</i> -nitrosotióis		Espontâneo, tióis, luz e íons metálicos	
<i>N</i> -hidroxiguanidinas		Oxidantes	NOS, Cit-P450

Tabela 1 - Compostos Doadores de NO adaptado de Barreto *et. al.* (2005).

Os RSNOs exógenos são fármacos promissores a serem utilizados no tratamento de doenças que envolvem disfunções na biodisponibilidade de NO (Eiserich, 1998), uma vez que oferecem vantagens sobre as outras drogas existentes porque não induzem à tolerância nas células vasculares (Jaworski *et al.*, 2001) como fazem o do nitrato orgânico e o nitroprussiato de sódio

Estudos clínicos mostraram que os RSNOs podem ser benéficos em uma série de desordens cardiovasculares (Ignarro *et al.*, 2002). Podem também ter acesso ao compartimento intracelular pela ação catalítica da disulfeto isomerase de membrana, associada com uma reação de nitrosilação (Ignarro *et al.*, 2002). Os membros dessa classe de composto incluem: S-nitroso-glutationa (GSN), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), S-nitroso-albumina e o S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC).

Estratégias de formulação do SNAC foram estudadas nos últimos anos com o objetivo de prolongar a meia vida do NO “in vivo” (Shishido e de Oliveira, 2000), sendo que a estratégia de síntese em meio aquoso e matriz de polietileno glicol, usando-se uma mistura reativa de gases (NO/O₂), mostrou-se efetiva para tal objetivo. Em nosso laboratório, o SNAC é sintetizado a partir da dissolução da N-acetilcisteína (NAC) em meio ácido, associada ao nitrito de sódio.

Estudos recentes do grupo de pesquisa liderado pela Dra Marta Krieger mostraram que a administração do SNAC, nitrosotiol doador de NO, apresentou efeito hipotensor em ratos (Ricardo *et al.*, 2002) e preveniu o desenvolvimento da placa aterosclerótica em 55% em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias. Entretanto, o tratamento não reverteu a disfunção endotelial (Krieger *et al.*, 2006). Nas fases iniciais de aterosclerose, os camundongos desenvolveram a HVE. A gênese dessa hipertrofia pode estar associada à ausência do gene do receptor de LDL, à sobrecarga hemodinâmica, à disfunção endotelial, à ativação neurohumoral ou à hipercolesterolemia. Assim, no presente estudo, caracterizamos a HVE em camundongos LDLr^{-/-} sob dieta hipercolesterolêmica e a eficácia do tratamento com SNAC .

II- Objetivos

2-Objetivos.

2.1- Verificar a participação da deleção do gene do receptor de LDL no perfil hemodinâmico e na resposta inotrópica cardíaca em camundongos.

2.2- Caracterizar estruturalmente a hipertrofia ventricular esquerda em camundongos LDLr-/-;

2.3- Determinar a participação das óxido nítrico sintases e da via CD40L no processo hipertrófico

2.4- Avaliar a capacidade do SNAC na prevenção das alterações estruturais e funcionais cardíacas;

2.5- Avaliar se o SNAC promove alteração no perfil hemodinâmico dos camundongos LDLr-/- hipercolesterolêmico;

2.6- Validar o *software* que permite medir, contar células e delimitar áreas de cortes histológicos de maneira rápida e confiável;

III- Capítulos.

3- Capítulos

3.1- S-NITROSO-N-ACETYLCYSTEINE (SNAC) PREVENTS LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN HYPERCHOLESTEROLEMIC LDLr-/- MICE BY ANTI-INFLAMMATORY ACTION

José Antonio Dias Garcia,¹ Leandro dos Santos,¹ André Luis Moura,¹ Kelly Fabiane Santos Ricardo,¹ Amarylis Claudine Bonito Azeredo Wanschel,¹ Silvia Mika Shishido,¹ Regina Célia Spadari-Bratfisch,¹ Heraldo Possolo de Souza,² and Marta Helena Krieger.¹

¹.Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

².Faculdade de Medicina, Laboratório de Emergências Clínicas - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Short title: SNAC prevents left ventricular hypertrophy

Correspondence: Dr. Marta H Krieger Ph.D. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Fax: 55-19-37886185. email: kriegerm@unicamp.br

SUMMARY

1. Recently, the authors showed that S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) attenuated plaque development by 55% in low-density lipoprotein-receptor-deficient (LDLr-/-) mice that were fed a hypercholesterolemic diet for 15 days. The present study was designed to verify whether deletion of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene may affect the hemodynamic profile and inotropic cardiac responses and, in particular, to determine the ability of SNAC to

prevent structural and functional myocardial alterations and hypertension in hypercholesterolemic mice.

2. C57BL6 wild-type (WT, n=29) and LDLr^{-/-} male mice (S, n=30) were fed a standard diet for 15 days. LDLr^{-/-} mice (S) showed an 11% increase in blood pressure, a 62% decrease in left atrial contractility, CD40L overexpression and eNOS underexpression in relation to WT. LDLr^{-/-} mice that were fed a 1.25% cholesterol-enriched diet for 15 days (Chol, n=30), showed significant left ventricular hypertrophy (LVH), as compared to S, which was characterized by: a) a 1.25-fold increase in the LV weight (mg)/body weight (g) ratio (4.17 ± 0.09 vs. 3.34 ± 0.07 mg/g, respectively; $p < 0.05$); b) increased cardiomyocyte diameter (25 ± 0.6 vs. 19 ± 0.7 μm , $p < 0.05$); c) enhanced expression of the constitutive and inducible NOS isoforms and CD40L; d) increased collagen deposit and e) no alteration in the atrial contractile performance or responsiveness to norepinephrine.

3. Administration of SNAC to Chol mice (Chol+SNAC, n=28) (0.51 $\mu\text{mol/kg/day}$, for 15day, i.p.) prevented increases in the left ventricular weight/body weight ratio (3.38 ± 0.23 mg/g), cardiomyocyte diameter (20 ± 0.7 μm), collagen deposit and NOS isoforms and CD40L expression, but had no effect on the increased blood pressure or atrial basal hypocontractility, although it recovered sensitivity to norepinephrine, comparable to the levels seen in WT.

4. In conclusion, the present study demonstrated that the deletion of the LDL receptor gene in mice resulted in hypertension and a marked left atrial contractile deficit. These findings may be related to oxidative stress resulting from inflammation and eNOS underexpression. A high-cholesterol diet promoted LVH in LDLr^{-/-} mice, due to enhance inflammatory and oxidant processes. SNAC prevented LVH by processes that involved anti-inflammatory effects (as

detected by decreased CD40L expression) and NOS overexpression, attenuating the ventricular structural alterations induced by hypercholesterolemia independent of hypertension.

Key Words: blood pressure, CD40L, left ventricular hypertrophy, LDLr -/- mice, nitrosothiol.

INTRODUCTION

Cardiac hypertrophy can be induced by hypertension, myocardial diseases, volume or pressure overload, and neurohumoral activation and may involve a variety of molecular mechanisms.¹⁻⁴ Increased stretching of cardiomyocytes is the main factor that induces hypertrophic growth. However, hypertrophic growth of cardiomyocyte and interstitial fibrosis may also be induced by circulating substances, such as endothelin-1 (ET-1),⁴ angiotensin II (Ang II),⁵⁻⁶ insulin⁷ and catecholamines.⁸ Also, superoxide anion overproduction by a dysfunctional endothelium may result in oxidative stress and hypertrophic growth.⁶

Nitric oxide (NO) is produced in the heart and has emerged as an endogenous inhibitor of pathological hypertrophy.⁹ In cardiac tissue, the first evidence of anti-hypertrophic action for NO came from spontaneously hypertensive rats (SHR) chronically treated with L-arginine.¹⁰ In addition, mice overexpressing constitutive endothelial NOS (eNOS) showed attenuated cardiac hypertrophy in response to chronic administration of isoprenaline.²

Recently, the authors showed that the NO donor, S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) attenuated plaque development by 55% in low-density lipoprotein-receptor-deficient (LDLr-/-) mice fed with a hypercholesterolemic diet for 15 days. SNAC, however, did not prevent endothelial-dependent vascular alterations.¹¹ In these animals, early atheroma formation was also followed by the development of left ventricular hypertrophy (LVH). It is unclear whether such hypertrophy was due to either hemodynamic overload or neurohumoral activation. Therefore, the correlation of both pathophysiological conditions with the inflammatory process

allowed for the evaluation of the characteristics of atherosclerosis by analyses of the ventricular CD40 ligand (CD40L) expression. CD40L is a transmembrane protein expressed on the surface of lymphocytes, endothelial cells, smooth muscle cells (SMCs), and macrophages.¹² The CD40L exerts a pro-oxidant effect¹³ upon interaction with its receptor CD40, eliciting inflammatory responses that may favor and accelerate atherosclerotic progression,¹⁴ acute coronary syndromes¹⁵ and heart failure.¹⁶ The present study was designed to verify whether deletion of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene may affect the hemodynamic profile and inotropic cardiac responses and, in particular, to identify the ability of SNAC to prevent cardiovascular dysfunction in hypercholesterolemic mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Protocol

Experiments used 3-month-old (24 ± 3 g, N= 117) male low-density lipoprotein-receptor-deficient (LDLr^{-/-}) mice from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and wild-type mice (strain C57BL/6/uni) obtained from the animal facilities at UNICAMP. The *Ldlr*^{tm1Her} mutant strain was developed by Dr. Robert Hammer and Dr. Joachim Herz at the Howard Hughes Medical Institute Research Laboratories, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas. The 129-derived AB1 ES cell line was used. The strain was backcrossed to C57BL/6J mice for 10 generations. The transgenic mice used here, LDLr^{-/-} and the C57BL/6/Uni strain kept in our unit have been analyzed in order to guarantee its use as a control group. For these purpose, DNA samples from LDLr^{-/-} (stock 002207), C57BL/6/Uni and 129/SvPas (*Steel* substrain derived) mice were analyzed using a panel of microsatellite markers. The results have shown that no differences were observed between C57BL/6/Uni and LDLr^{-/-} congenic strain used in this study, with polymorphic regions identified for 129/SvPas strain. This suggests that the

LDLr^{-/-} strain is congenic with the C57BL/6 background. The experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEA/IB – UNICAMP, protocol no. 521-1), in agreement with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

The mice were randomly allocated to one of the three groups described below and received diet and water *ad libitum*. (1) C57BL/6/Uni used as wild-type group (WT) (daily dose 0.1mL phosphate buffered saline-PBS, i.p.), which received standard diet (Nuvital CR1); (2) LDLr^{-/-} control group (S) (daily dose 0.1 mL PBS, i.p.), which received a standard diet (Nuvital CR1); (3) Hypercholesterolemic LDLr^{-/-} group (Chol) which received a high-cholesterol diet (20% fat, 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid) (daily dose 0.1 mL PBS, i.p.); (4) Similarly handled hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice given SNAC (Chol + SNAC group, daily dose 0.51 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.).^{11, 17} After 15 days, mice were anesthetized with a mixture of xylazine and ketamine (6 mg/kg and 40 mg/kg, respectively, i.p.).

Resting blood pressure and heart rate measurements

Tail-cuff blood pressure and heart rate were measured in conscious mice before the treatment with SNAC between 10 a.m. and 12 a.m., using a computerized tail-cuff Kent Scientific (XBP 1000) system. The first 6 days of measurements were mostly for training purposes. Data collected during these days were not used for calculations, but rather for checking that reliable flow waveforms could be obtained in each mouse. On the day of the recordings, sets of 30 measurements were recorded. On average, 20 to 30 blood pressure value measurements were computed for each mouse.¹⁸

Functional analysis of inotropic responses to norepinephrine *in vitro*

After being anesthetized, each mouse was submitted to euthanasia by cervical dislocation, the heart was removed and the left atrium was isolated. The atria were suspended in 20 mL organ baths containing Krebs-Henseleit solution with the following composition: 115 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM KH₂PO₄, 12.4 mM MgSO₄·7H₂O, 25.0 mM NaHCO₃, 11 mM glucose and 0.11 mM ascorbic acid. This solution was warmed (36.5 ± 0.1°C) and continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. The atria were attached to isometric force transducers (Narco F-60, Narco Biosystem) under a resting tension of 4.9 mN and contractile responses were recorded on a Narco Biosystem polygraph. Left atria were electrically paced at 1 Hz and 5 ms using a voltage stimulus 20% above the threshold.¹⁹⁻²³ The tissues were allowed to stabilize for 60 min and then a length-force curve was determined, and the length of each atrium set to obtain 80% of the resting tension associated with the maximum developed force. Following this, both atria were incubated with phenoxybenzamine (10 μM) for 15 min to block α-adrenoceptors, extraneuronal uptake and muscarinic receptors. This period was followed by 45 min of thorough washing.¹⁹⁻²² After recovery of the basal tension, corticosterone (30 μM) and desipramine (0.1 μM) were added to the bath and maintained throughout the experiment to inhibit extraneuronal uptake²⁰ and neuronal reuptake, respectively.¹⁹ After this treatment, concentration-response curves for norepinephrine (NE) were obtained by the cumulative method. A maximum response was reported when a 0.5 log unit increase in the agonist concentration produced no additional increase in the atrial developed tension.

Sensitivity to norepinephrine was evaluated by determining the concentration that produced 50% of the maximum response (EC₅₀), and was expressed as the negative logarithm of the EC₅₀ (pD₂).

Cardiac measures, collagen deposit, NOS isoforms and CD40L immunohistochemistry

The left ventricle (LV) was weighed and the LV weight per body weight ratio was calculated as the ratio between LV (mg) and body weight (g). Mice were anesthetized and their hearts were perfused in situ with phosphate buffered saline (PBS) followed by 10% PBS buffered formaldehyde. Left ventricles were fixed in 10% formaldehyde for at least 2 days and then washed in 70% alcohol and processed for paraffin inclusion with standard methods; 3- μ m serial cross-sections were cut. Some of the sections were stained with hematoxylin-eosin for cardiomyocyte measurements and morphological analysis and others were stained with picrosirius red for qualitative and quantitative assessment of collagen deposit using normal light.²⁴ Interstitial and perivascular collagens appear as a red deposit with picrosirius red staining.²⁵ Other ventricular sections were used to immunohistochemically evaluate the expression¹¹ of both NOS isoforms and CD40L expression. The LGMC-image vs1.0 software, programmed to recognize colors and distinct shades, was used to highlight pixels of a particular color or specify shades within the field. The software highlighted a particular color within the field (based on the operator's threshold settings) and calculated the amount of area it occupied. The nontissue spaces of the field were recognized (with operator-threshold settings) by the software and subtracted to provide the correct area of total tissue in the field.²⁶ The ratio of immunoreactive NOS and collagen deposit area to total tissue area ($\times 100\%$) was then calculated to provide a measure of percent area. Percent average was represented by the average of 11 fields from each histological section. In another analysis, the myocyte diameter within the field was measured using standard criteria.²⁷ A point-to-point perpendicular line was placed across the longitudinal axis of the myocyte at the level of the nucleus and this diameter was then measured by the computer-imaging software. All longitudinally directed cardiomyocytes with a

distinct cell border (at the level of the nucleus) within the sampling field were measured and averaged to provide the mean cardiomyocyte diameter.²⁷ Transverse or oblique cut cardiomyocytes were excluded. We analyzed 5 different and complete cross transverse cuts per ventricle, which produced 15 to 20 measurements of cardiomyocyte per histological section. The total measurements were of 75 to 100 cardiomyocytes per animal. A single examiner performed all the histological analyses, adopting a double-blind scheme.

Protein Analysis Immunoblotting

Left ventricular tissues from mice were pulverized at -80°C using a stainless steel pestle and mortar and were resuspended in homogenization buffer of the following composition: 0.1 mM Pipes, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X100 (v/v), 20% glycerol (v/v), and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Applied Science). Samples were centrifuged, and the supernatant was collected and assayed for total protein concentration using the Bradford method (Bio-Rad). Equal amounts of protein (200µg/lane) from three left ventricles of each group were resolved by 7.5% (w/v) SDS-polyacrylamide minigels (Mini-Protean III, Bio-Rad) and transferred onto the nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences). The blots were blocked with 5% (w/v) nonfat milk (marvel) in buffer containing 10mM tris-HCl (pH 7.6), 10mM NaCl, and Tween 20 (20%, w/v) and incubated overnight with rabbit antibodies against CD40L and eNOS3 antibodies (1:1000 dilution). Then, appropriate staining controls (GAPDH) were processed. Blots were exposed to horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) and immunoreactivity was visualized using an autoradiograph film.^{11, 28} Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Antibodies, drugs and reagents

Anti-rabbit anti-nNOS, anti-eNOS, anti-iNOS and anti-CD40L polyclonal antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); syrius red from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA); and hematoxylin, eosin and histosec paraffin for histological analyses were from Merck KGaA (Damstadt, Germany). SNAC was synthesized as described by Ricardo *et al.*¹⁷ All other reagent grade chemicals were from Sigma Chemical Co.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM and were compared by Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Tukey test with $p < 0.05$ indicated a statistically significant difference.

RESULTS

Deletion of the LDL receptor gene modified the hemodynamic profile

LDLr^{-/-} mice fed a standard diet (S) exhibited increased systolic arterial pressure compared to their wild-type (WT) counterparts. Such values were similar to those for hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice which were fed the hypercholesterolemic diet (Chol) and were not changed by administration of SNAC (Table 1). The heart rate was lower in S, Chol and Chol +SNAC mice compared to the wild-type mice (Table 1).

SNAC prevented LHV

Chol mice have a significantly increased left ventricular weight/body weight ratio, compared to S mice (4.17 ± 0.09 vs. 3.34 ± 0.07 mg LV weight/g body weight, respectively; $p < 0.05$) (Table 1). SNAC administration prevented this phenomenon in hypercholesterolemic mice (Chol + SNAC), compared to Chol mice (3.38 ± 0.23 vs. 4.17 ± 0.09 mg LV weight/body weight /g body weight ratio, respectively; $p < 0.05$) (Table 1). The LV weight/body weight ratio of WT, S and Chol + SNAC mice were not significantly different from each other (Table 1).

S mice showed no structural alterations in cardiac tissue, when compared to WT mice. The cardiomyocyte diameter increased about 30% in Chol as compared to S mice (25 ± 0.60 vs. $19 \pm 0.7 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.05$). SNAC completely abolished any cardiomyocyte-diameter increase in Chol mice ($20 \pm 0.7 \mu\text{m}$). Cardiomyocyte diameter was not significantly different among S, WT and Chol +SNAC mice (19 ± 0.7 , 18 ± 0.5 and $20 \pm 0.7 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.05$). S mice showed no collagen deposition alterations in the left ventricular tissue when compared to WT mice (interstitial region: $3.1 \pm 0.10\%$ vs. $2.8 \pm 0.3\%$; perivascular region: $1.6 \pm 0.1\%$ vs $1.3 \pm 0.1\%$, respectively; $p < 0.05$). Chol markedly increased collagen deposition in the left ventricle when compared to S mice in both the interstitial ($8.6 \pm 0.47\%$ and $3.1 \pm 0.10\%$) and perivascular ($2.0 \pm 0.05\%$ and $1.3 \pm 0.1\%$, respectively; $p < 0.05$) regions (Figure 1). This deposit was markedly prevented by SNAC in the interstitial ($2.9 \pm 0.32\%$ $p < 0.05$ versus Chol) rather than in the perivascular regions ($1.50 \pm 0.07\%$, $p < 0.05$ versus Chol).

SNAC recovered responsiveness to norepinephrine

Basal tension in the left atria was evaluated as an indicator of the contractile function. The basal tension and the maximal response to norepinephrine of the left atria from LDLr -/- mice (S) were approximately 60% lower than those of WT mice (Table 2). Feeding with a high-cholesterol diet did not modify the atrial contractile performance. The isolated left atria from the S and Chol mice were supersensitive to norepinephrine compared to WT mice. The high-cholesterol diet associated to SNAC treatment (Chol and Chol+SNAC groups) did not alter the basal tension but increased the left atria maximum response to norepinephrine and prevented the supersensitivity to norepinephrine (Table 2).

SNAC prevented alterations in NOS isoform expression

Histological changes in ventricular tissue were associated with increased expression of all three NOS isoforms. WT and S mice have a low basal nNOS expression, as detected by immunohistochemistry (Figure 2A and 2B, Table 3). Feeding a high cholesterol diet to these animals (Chol) induced a marked up-regulation of nNOS, and is mainly scattered on the free ventricular wall and in other perivascular regions (data not showed), such as the epicardium and endomyocardium (Figure 2C), while the administration of SNAC returned nNOS expression to basal values (Figure 2D and Table 3).

As expected, iNOS expression was virtually absent in WT mice (Figure 2E). LDLr gene deletion did not affect iNOS expression (Figure 2F and table 3), however a high cholesterol diet induced iNOS expression, mainly in perivascular tissues (data not showed) and other endomyocardium areas (Figure 2G and table 3). SNAC treatment proved to be effective in returning iNOS expression to reduced levels (Table 3 and Figure 2H).

Expression of eNOS follows a distinct profile, as detected by immunohistochemistry (IHC) and immunoblot analysis. A high basal expression was observed in WT mice, particularly in the interstitium and scattered throughout the myocardial vascular system (Figure 2I). Interestingly, eNOS expression was lower in S mice (Figure 2J and figure 3A), suggesting that LDLr gene deletion may affect eNOS gene expression. Feeding a high cholesterol diet to these mice (Chol) induced an increase in eNOS expression, detected by immunohistochemistry (IHC) (Table 3 and Figure 2K) and immunoblot analysis (Figure 3A) compared to S mice. SNAC treatment returned eNOS expression to values observed in WT animals (Table 3, Figure 2L and Figure 3A).

SNAC prevented alterations of CD40L expression

In order to determine whether inflammation could be influenced by our experimental treatments, we analyzed CD40L expression, since this signaling pathway is to be important in vascular diseases.

Basal CD40L expression is low in WT mice, as detected by IHC (Figure 2M) and immunoblot analysis (Figure 3B). Increased expression was detected in S mice, mainly in the endocardium interstitium, myocardium (Figure 2N) and coronary vascular wall (data not showed). CD40L expression was further enhanced by a high cholesterol diet (Figure 2O and figure 3B), maintaining the same pattern. SNAC treatment blocked this effect, returning CD40L expression to values observed in S mice (Figure 2P and Figure 3 B).

DISCUSSION

The results of the present study showed that: (a) LDLr gene deletion, by itself, induces hemodynamic changes (increased blood pressure and decreased heart rate) irrespective of the diet, which were not affected by SNAC; (b) a high-cholesterol diet in these knockout mice promoted LVH and induced increased interstitial and perivascular collagen deposition, an effect prevented by SNAC treatment; (c) the NOS isoform expression profiles in heart and vascular tissues are dependent on genetic (LDLr gene expression) and environmental (diet and SNAC administration) factors and (d) LDLr $-/-$ mice present an increased inflammatory response, detected by higher CD40L expression, in heart and vascular tissues, which is enhanced by a high cholesterol diet and corrected by SNAC administration.

The hypertensive phenotype in male LDLr $-/-$ mice receiving a standard diet (S) compared to their wild-type counterparts (WT) was observed. Although investigating the mechanisms responsible for this finding was not our objective, we can speculate a role for oxidative stress in this phenomenon. Other authors demonstrated a decreased antioxidant capacity in mitochondria from these mice²⁹, which led to increased oxidative stress in vascular

tissues, a condition related to hypertension. This hypothesis is supported by a recent report in a murine transgenic model, which showed that uncoupling of mitochondrial respiratory chain, and therefore an increased release of free radicals from mitochondria, leads to increased blood pressure and atherosclerosis.³⁰

Besides hemodynamic effects, we observed an impairment in myocardial contractility. Deletion of the LDL receptor gene (LDLr^{-/-}-mice) induced a contractile deficits and left atria hypersensitivity to the inotropic effect of norepinephrine. This phenomenon may be due to a redox imbalance in the intracellular environment, resulting in a mishandling of calcium homeostasis. Oxidative stress is known to interfere with calcium transport in cellular compartments^{31,32} and increased ROS generation has been described in LDLr^{-/-} mice^{11, 29}. Therefore, oxidative stress may be responsible for triggering the changes in the contractile responsiveness of atria observed in our study.

Interestingly, the inotropic effect of norepinephrine was not altered by the high cholesterol diet but was abolished by SNAC treatment. This effect of SNAC might be a consequence of the S-nitrosothiol inhibition of cardiomyocytes Ca²⁺ channels that attenuate the effects of NE.³³

Besides the functional abnormalities, structural changes in heart tissue were also evaluated. Several studies have demonstrated that hypercholesterolemia induces left ventricular hypertrophy by different mechanisms^{4,34,35}. Various high-fat/ high-cholesterol diets can accelerate atherogenesis in murine models (e.g. ApoE and LDLr^{-/-} knockout mice). However, most models of diet-induced atherosclerosis are not associated with occlusive coronary artery disease and cardiac dysfunction. In the present study, we demonstrated that administration of a high-cholesterol diet to LDLr^{-/-} mice (Chol) was associated with concentric left ventricular hypertrophy and increased interstitial and perivascular collagen deposition, as compared to S

and WT mice. Some of these findings, particularly hypertrophy, may be ascribed to the oxidative stress described in these LDLr^{-/-} mice. ROS overproduction has been described as a potent stimulus to cardiomyocyte growth³⁶ and may be, at least in part, responsible for structural changes observed.

Taking into account that nNOS and eNOS deficient mice spontaneously develop cardiac hypertrophy³⁷ and that double nNOS and eNOS deficient mice lead to even more pronounced hypertrophy³⁸, we investigated the cardiac NOS isoforms expression in LDLr^{-/-} mice. We observed an increased expression of inducible and constitutive NOS when mice were fed a high cholesterol diet and developed left ventricular hypertrophy. Hypercholesterolemia and modified forms of LDL are known to have numerous biological effects on endothelial function such as increasing superoxide anion generation, which may lead to peroxynitrite production and consequently, decreased NO bioavailability. Therefore, increased eNOS expression may be a compensatory response to NO bioavailability impairment, induced by hypercholesterolemia. In this context, the transient increase in the expression of the NOS isoforms restricted to the period of rapid hypertrophic growth (15 days) might suggest that the LVH in Chol LDLr^{-/-} mice is related to the increased amount of myocardial superoxide, rather than to increase in NO production. This assumption is consistent with studies on LVH demonstrating that the expression of NOS isoforms was transiently upregulated in the pressure-overload myocardium³⁹, and the demonstration that eNOS uncoupling occurs in myocardial tissue exposed to chronic pressure load⁴⁰. The eNOS uncoupled serves as a major source for myocardial ROS, which is linked to dilative hypertrophy remodeling, as well as data from our previous studies showing that the local vascular levels of superoxide increased in Chol LDLr^{-/-} mice are closely related to overexpression levels of constitutive NOS¹¹.

On the other hand, the eNOS expression profile is much more complex. There is a marked decrease in eNOS expression in LDLr^{-/-} mice receiving a standard diet compared to WT animals, suggesting that LDLr gene deletion may affect eNOS gene transcription.. How it occurs is still not understood.

We demonstrated that hypercholesterolemia might be the factor leading to inflammation and induction of the NOS expression proteins. Furthermore, these findings correlate better with the inflammatory process, as described below, than with any mechanism involved in cardiac hypertrophy.

Inflammation may be a point of convergence for our findings. Cardiac and vascular inflammation was evaluated by CD40L expression. CD40 engagement by CD40L leads to expression of proteins involved in inflammation and healing, including metalloproteinase, cyclooxygenase 2 and secretion of substances related to signaling, like cytokines, NO and ROS.¹² CD40-CD40L seems to be controlled at the transcriptional level, therefore, CD40L expression correlates with the inflammatory process severity⁴¹. In our experimental model, we could observe an increased expression of CD40L in LDLr^{-/-} mice, compared to WT mice, while a high cholesterol diet further enhanced CD40L expression. We speculate that increased ROS generation and oxidative stress in inflammatory sites may follow increased CD40-CD40L signaling activity, although no direct measurement was performed in our model.

An intriguing feature was that SNAC was able to prevent LVH development, but caused no change in the elevated blood pressure, suggesting that the hypertrophic phenotype in Chol mice bears no association with the hemodynamic overload *per se*. Previous studies have shown

that SNAC treatment corrected acute hypertension in conscious L-NAME treated rats.¹⁷ Regarding LDLr^{-/-} mice, we described SNAC hypotensive effects in another experimental protocol. This effect corresponded to a 32±3 mmHg decrease in the MAP and did not last more than 9±2 min. Interestingly, in the present study, we observed the possible hypotensive effect after 15 days of treatment and no hypotensive effect was observed in the Chol +SNAC mice. This result is comparable, in terms of the chronic hypertension condition to that found in adult SHR (spontaneously hypertensive rats), which are less sensitive to hypotensive effects of SNAP (S-nitroso N-acetyl-DL-Penicillamine)⁴².

The main effect of SNAC treatment on the abnormalities detected in our experimental model was the prevention of LVH. The following mechanisms of action might be involved in the SNAC anti-hypertrophic effects: (1) direct donation of NO (exogenous donor) inhibits a growth factor release, a process mediated in part by cGMP⁴³, which is compatible with the negative feed-back in the expression of constitutive NOS in the present study; (2) an anti-inflammatory effect, detected as a decrease in CD40L overexpression as well as fibrosis because decreasing CD40-CD40L activity could lead to less severe vascular inflammation, which by its turn, would lead to less fibrosis and cardiac derangements; (3) antioxidant activity and consequent decrease in oxidative stress, which resulted in anti-inflammatory effects (as detected by decreasing of CD40L overexpression) and a return to homeostasis. This last hypothesis is supported by findings from Krieger et al.¹¹, showing that SNAC treatment decreased superoxide production in aorta from Chol mice.

In conclusion, the present study demonstrated that the deletion of the LDL receptor gene in mice results in hypertension and a marked left atrial contractile deficit. These findings may be related to oxidative stress that results from inflammation and eNOS underexpression. A high-cholesterol diet promoted LVH in LDLr^{-/-} mice, due to enhanced inflammatory and oxidant

processes. SNAC prevented LVH by processes that involved anti-inflammatory effects (as detected by decreased CD40L expression) and NOS overexpression, attenuating the ventricular structural alterations induced by hypercholesterolemia independent of hypertension.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors are thankful to Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos from Genetic Quality Control Laboratory CEMIB/UNICAMP São Paulo, Brazil for scientific advising and helping with the DNA analysis from LDLr^{-/-}, C57BL/6/Uni and 129/SvPas mice. We also thank Daniel Kiatkowski for technical assistance and Dr. Stephen Hyslop UNICAMP, São Paulo, Brazil for the English revision. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, No. 03/04201-9).

REFERENCES

1. Molkenin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 467-75.
2. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ. J.* 2002; **66**: 851-856.
3. Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Disruption of inducible nitric oxide synthase improves β -adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Circ. Res.* 2002; **90**: 959-965.
4. Lee TM, Lin MS, Chou TF, Chang NC. Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; **288**: H1352–H1358.
5. Nakagami H, Takemoto M, Liao J. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003; **35**: 851-859.

6. [Lang](#) D, [Mosfer](#) SI, [Shakesby](#) A, [Donaldson](#) F, [Lewis](#) MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ. Res.* 2000; **86**: 463-469.
7. Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc. Pathol.* 2004; **13**: 11-19.
8. Dash R, Schmidt AG, Pathak A, Gerst MJ, Biniakiewicz D, Kadambi VJ, Hoit BD, Abraham WT, Kranias EG. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2003; **57**: 704-714.
9. Barouch LA, Cappola TP, Harrison RW, Crone JK, Rodriguez ER, Burnett AL, Hare JM. Combined loss of neuronal and endothelial nitric oxide synthase causes premature mortality and age-related hypertrophic cardiac remodeling in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003; **35**: 637-644.
10. [Matsuoka](#) H, [Nakata](#) M, [Kohno](#) K, [Koga](#) Y, [Nomura](#) G, [Toshima](#) H, [Imaizumi](#) T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1996; **27**: 14-18.
11. Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FRM. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide.* 2006; **14**: 12-20.
12. Schoenbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2001; **58**: 4-43.

13. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*. 2002; **106**: 981–986.
14. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002; **106**: 896–899.
15. [Vishnevetsky D](#), [Kiyani VA](#), [Gandhi PJ](#). CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann. Pharmacother*. 2004; **38**: 1500-1508.
16. Ueland T, Aukrust P, Yndestad A, Otterdal K, Froland SS, Dickstein K, Kjekshus J, Gullestad L, Damas JK. Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J*. 2005; **26**: 1101-1017.
17. [Ricardo KF](#), [Shishido SM](#), [de Oliveira MG](#), [Krieger MH](#). Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide*. 2002; **7**: 57-66.
18. Krege JH, Hodgin JB, Hagan JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail cuff system for measuring pressure in mice. *Hypertension*. 1995; **25**: 1111-1115.
19. Besse JC, Furchgott RF. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1976; **197**: 66-78.
20. Salt PJ. Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol*. 1972; **20**: 329-340.
21. Iversen LL, Salt PJ. Inhibition of catecholamine uptake₂ by steroids in the isolated rat heart. *Br. J. pharmacol*. 1970; **40**: 528-530.
22. Furchgott RF, Bursztyn P. Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists on parasympathetic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1967; **144**: 882-889

23. Haddad GE, Coleman BR, Zhao A, Blackwell KN. Regulation of atrial contraction by PKA and PKC during development and regression of eccentric cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; **288**: 695-704.
24. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 1979; **11** : 447-455.
25. Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J. Am. Coll. Card.* 2000; **35**: 36-44.
26. Garcia JAD, Tornatore TF, Krieger MH, Franchini KG. Digital image analysis software for morphometric quantitation in tissues and cells, *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 2006.
27. Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. [*J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; **32**: 704-710.](#)
28. Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PDC, Moreno H, Saad MJA, Franchini KG. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats. *Hypertension.* 2000; **37**: 1423-1428.
29. Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *Faseb. J.* 2004; **19**: 278-280.
30. Bernal-Mizrachi C, Gates AC, Weng S, Imamura T, Knutsen RH, DeSantis P, Coleman T, Townsend RR, Muglia LJ, Semenkovich CF. Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nature.* 2005; **26**: 502-506.

31. [Luo J](#), [Xuan YT](#), [Gu Y](#), [Prabhu SD](#). Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force-frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006; **40**: 64-75.
32. Fang CX, Dong F, Ren BH, Epstein PN, Ren J. Metallothionein alleviates cardiac contractile dysfunction induced by insulin resistance: role of Akt phosphorylation, PTB1B, PPAR γ and c-Jun. *Diabetologia.* 2005; **48**: 2412–2421.
33. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1998; **101**: 812–818.
34. Sundström J, Lind L, Vessby B, Andrén B, Aro A, Lithell H. Dyslipidemia and an Unfavorable Fatty Acid Profile Predict Left Ventricular Hypertrophy 20 Years Later. *Circulation.* 2001; **103**: 836-841.
35. Genda S, Miura T, Miki T, Ichikawa Y, Shimamoto K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; **40**: 1339-1346.
36. Touyz RM, Mercure C, He Y, Javeshghani D, Yao G, Callera GE, Yogi A, Lochard N, Reudelhuber TL. Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. *Hypertension.* 2005; **45**: 530-537.
37. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000; **190**: 244-254.
38. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz D.E., Hare J.M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002; **416**: 337–339.

39. Nadruz W.Jr, Lagosta VJ, Moreno H J, Coelho OR, Franchini KG. Simvastatin prevents load-induced protein tyrosine nitration in overloaded-induced hearts Hypertension.2004; **43**: 1060-1066.
40. Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodríguez ER, Tavazzi B, Lazzarini G, Paolucci N, Kass DA, Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. J Clin Invest 2005; 115(5):1221-31.
41. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998; **391**: 591-594.
42. Stys T, Stys A, Paczwa P, Szczepanska-Sadowska E, Lipkowski AW. Decreased hypotensive responsiveness to nitric oxide donor S-nitroso N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) in spontaneously hypertensive (SHR) rats. J. Physiol. Pharmacol. 1998; **49**: 37-49.
43. Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. Bioessays. 2004; **6**: 608-615.

TABLES AND FIGURES

Table 1- Systolic Arterial Pressure (SAP), Heart Rate (HR) and Left ventricular weight (mg) per body weight (g) ratio [LVW (mg)/ BW (g)] values from wild-type mice (WT), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC). *p < 0.05 compared to WT mice; # p<0.05 compared to S mice (ANOVA + Tukey test). Data are means ± S.E.M.

Group	SAP (mmHg)	HR (beats/min)	LVW/BW (mg/g)
WT (n=5)	127±2.3	579±9.9	3.08±0.04
S (n=6)	140±2.7*	520±8.1*	3.34 ± 0.07
Chol (n=7)	142±1.9*	516±9.1*	4.17 ± 0.09 [#]
Chol+ SNAC (n=5)	145±1.8*	517±11.1*	3.38 ± 0.23

Table 2- Basal tension (mN/mg wet tissue, BT), maximum response (mN/mg wet tissue, Rmax), and EC₅₀ negative logarithm (pD₂) values for norepinephrine (NE) in the left atrium from wild-type mice (WT), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC). *p < 0.05 compared to WT mice (ANOVA + Tukey test). Data are means ± S.E.M.

Group	BT	Rmax (NE)	pD ₂ (NE)
WT (n=6)	62.2 ± 10.90	32.7 ± 6.27	7.72 ± 0.02
S (n=6)	25.2 ± 6.70*	20.8 ± 2.18*	8.38 ± 0.17*
Chol (n=5)	24.7 ± 4.42*	25.9 ± 3.58*	8.10 ± 0.18*
Chol+SNAC (n=5)	22.1 ± 2.33*	32.8 ± 5.82	8.01 ± 0.13

Table 3- Immunoreactive area (%) of nitric oxide synthases expression (nNOS, iNOS and eNOS) in the left ventricle from wild-type mice (WT), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC). *p<0.05 compared to S mice, # p<0.05 compared to Chol mice (ANOVA + Tukey test). Data are means ± S.E.M.

Group	nNOS	iNOS	eNOS
WT (n=6)	1.8±0.3	0.0±0.0	4.0±0.4
S (n=6)	2.6±0.3	0.0±0.0	2.7±0.2
Chol (n=6)	7.2±0.4*	6.5±0.3*	9.0±1.0*
Chol+SNAC (n=6)	2.0±0.4	0.7±0.1 [#]	4.3±0.2 [#]

Figure 1- Left ventricular collagen deposit perivascular regions from wild-type mice (WT, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol, n=6) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC, n=6). All sections were stained with picosirius red.

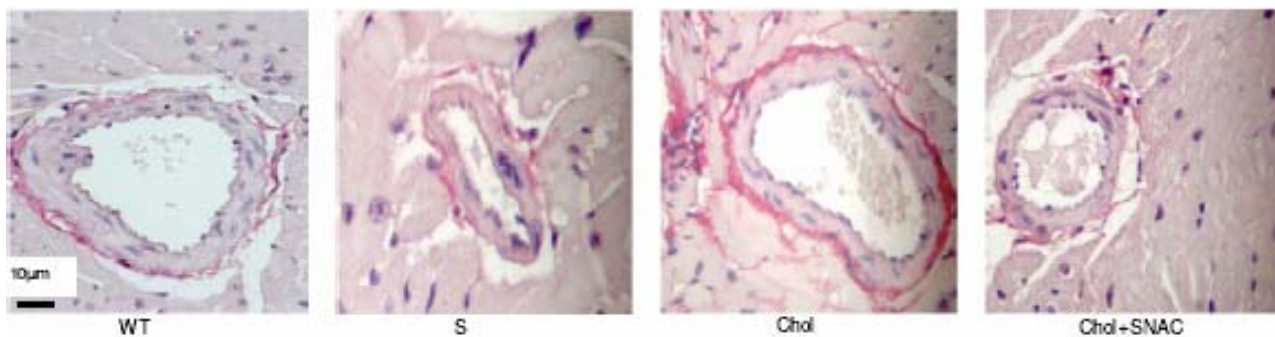


Figure 2- Immunohistochemical peroxidase staining with anti-neuronal NOS (A-D panels) and anti-inducible NOS (E-H panels) in the left ventricular endomyocardial regions, and anti-endothelial NOS (I-L panels) in the perivascular regions and anti CD40 ligand (CD40L) antibodies (M-P panels) in the left ventricular myocardial regions from wild-type mice (WT, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol, n=6) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC, n=6).

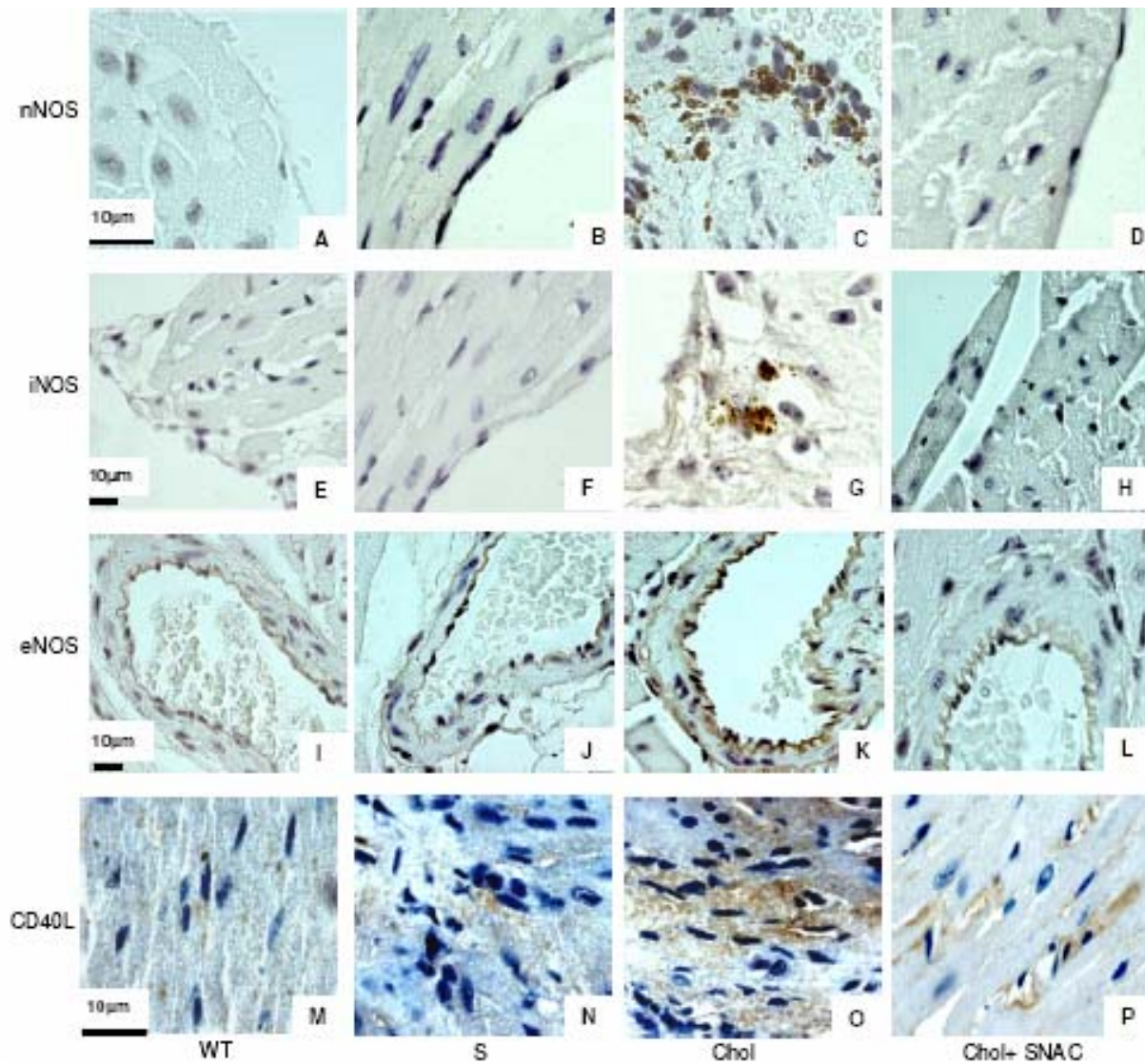
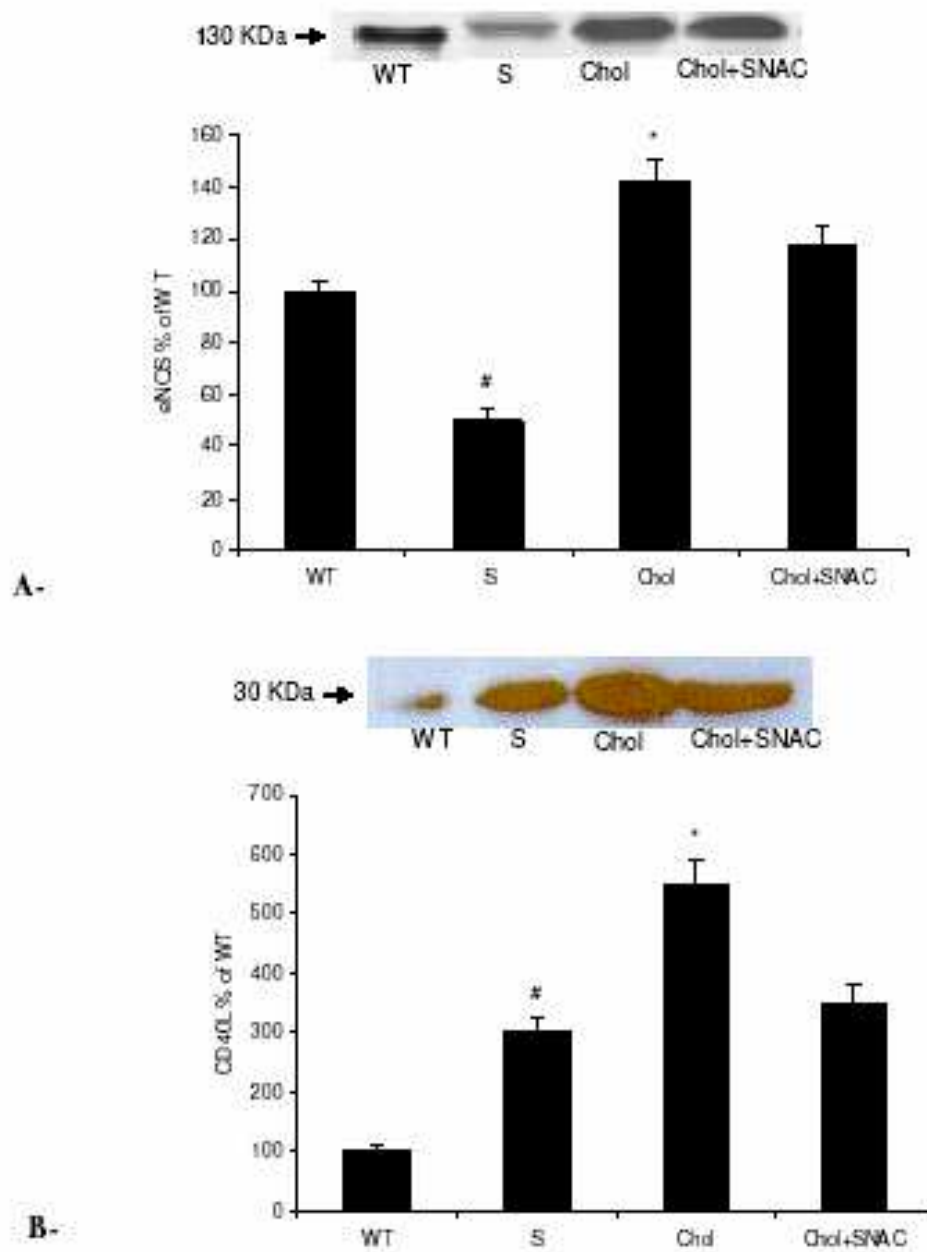


Figure 3- Western analysis of endothelial NOS (A) and CD40 ligand (CD40L) protein expression (B) in the left ventricular from wild-type mice (WT, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a standard diet (S, n=6), LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet (Chol, n=6) and LDLr^{-/-} mice fed on a hypercholesterolemic diet treated with SNAC (Chol+SNAC, n=6). *p < 0.05 compared to S mice and # p < 0.05 compared to WT mice (ANOVA + Tukey test). Data are means ± S.E.M.



3.2- DIGITAL IMAGE ANALYSIS SOFTWARE FOR MORPHOMETRIC QUANTITATION IN TISSUES AND CELLS

José Antonio Dias Garcia¹, Thais Franchini Tornatore², Marta Helena Krieger¹ and Kleber Gomes Franchini²

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Running title: Computerized image analysis.

Correspondence to: Dr. Marta H. Krieger

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil. Fax: (55) (19) 3788-6185. E-mail: kriegerm@unicamp.br

ABSTRACT

Image analysis combined with optical microscopy and staining procedures offers a large potential for investigation in all areas of biology. As manual counting used for morphometry is labour intensive and subject to intra and inter-personal variation, we developed an interactive software for image analysis of cytological and histological samples. The software is designed to

allow a user-oriented change of a chosen RGB value in a standardized color that can be used to calculate the fractional area occupied by an object in the image. RGB attributes of the chosen pixel are extracted and then a matrix is generated based on an error defined by the user. This matrix is loaded in the memory for a systematic comparative analysis of the entire set of remaining pixels of the picture. Any pixel coincident with the values of the reference matrix will be considered true and has its color changed to a pre-defined standardized color. To evaluate the method, we compared computerized with manual analysis of images with 100 X magnification. The results generated by both methods correlated well and did not show any significant differences, except for the intra and inter-personal variability that was higher with manual counting than with the software-counting procedure. Thus, the method allows efficient, reliable and reproducible processing of tissue sections that is less time-consuming than conventional methods and can be performed with a standard microscope and computer.

Key words: Image analysis, immunohistochemistry, histology, protein expression

INTRODUCTION

Structural and functional analysis of tissues and cells is common in a number of research fields in biology. Optical microscopy has become increasingly essential to an integrated approach to modern biomedical research. Among various possibilities, morphological approaches not only allow us to differentiate between the different cellular and interstitial elements found in an organ or tissue, but also, when associated with specific staining with antibodies and oligonucleotide probes, allow us to evaluate functional aspects which include changes in gene expression and protein location in specific cell types. Tissue images are complex, often with a bewildering variety of overlapping cells and gross structures. However, some success has been reported in the literature on the computer- based image analysis of samples from the lung [1], bone marrow [2], kidney [3], muscle [4], and nerve tissue [5].

Among the methods available for the quantification of area in histological sections is planimetry. Conventional methods of planimetry include linear integration, counting of points and the use of a polar planimeter [6]. Counting of points is a classical planimetric method for analysis of tissue sections. Counting of points requires a test system or grid (manual counting), which is composed of an assemblage of points whose arrangement can be regular or random, and which is superimposed on the image [7]. The grid permits the determination of the proportion of the volume or area of a histological section that is taken up by a given structure, by counting the points that touch the structure [8]. Although this method has been widely used, it demands specialized personnel to perform tissue countings and also the frequent need for counting repetition causes intra and inter-observer variability [9].

According to Castleman [10], tissue sections have a spatial component and can exhibit hundreds of different colors depending on the staining method used. In digitization of a histological section, a computer produces an image composed of pixels. All of them in the figure become a bitmap image. In this image, each pixel has a specific color that can be used for analysis. This distinction allows the program to recognize contiguous pixels and to group them in regions.

Advances in technology have led to improvements in analysis of histological sections, via improvements in classical techniques and development of new methods of image analysis. As an example, the NIH-Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), one of the most popular non-commercial digital image analysis softwares, need the acquired digital image to be converted into binary images (8-bit), with an intensity scale of 256 shades of gray, ranging from 0 (black) to 255 (white).

The aim of the present study was to develop reliable software that allowed a user-oriented change of a chosen RGB (red, green and blue) value in a standardized color, which

could be used to calculate the fractional area occupied by an object in the image of stained tissue or cell structures. This study provides the application of image analysis techniques to tissue sections in relation to data transformation in order to prepare the image for subsequent analysis, segmentation to divide the image into component regions and calculation of interesting fractional areas.

MATERIAL AND METHODS

Software

The software (LGMC-IMAGE vs 1.0) is written in Object Pascal using the Delphi 6 compiler and processes images saved as BMP, JPEG and TIFF 6.0 formats, and exports in WMF format. The program consists of a single working panel divided into four “virtual instruments” called 1. viewer space, 2. fast functions control, 3. results space and 4. adjust controls. The last one activates two hidden panels with more advanced commands which allow adjustments and changes in calibration parameters, which are measured in micron (Fig.1). Tests and developments were done on a 450-MHz Pentium III computer. The software can run on a slower hardware supporting Windows platform, but this is not recommended because a significant loss in display performance and computation speed may occur. The layout of controls and graphs is optimized for display on a color monitor supporting 1152 x 864 resolutions, with 16 bit color deep, at minimum. The basic functional compiled code with embedded libraries occupies only 1.23 MB of disk space and requires 498 kb of system memory to execute.

The software algorithm is depicted in figure 2. The image is loaded in a matrix of pixels on RAM which warrants the processing speed and security by preserving the original image file. An orientation matrix is generated to create an image manipulation reference and each element

of this matrix is determined by a pixel. The software is designed to allow a user-oriented change of a chosen RGB (red, green and blue) value in a standardized color, which can be used to calculate the fractional area occupied by a color object in the image. RGB attributes of the chosen pixel are extracted and then a tonal color matrix (digital spectrum) is generated based on an error defined by the user. This matrix is loaded in the memory for a systematic comparative analysis of the entire set of remaining pixels of the picture (Fig. 2A and 2B). This segmentation is defined by the software that subdivides an image into its constituent parts or objects of interest. Any pixel coincident with the values of the reference matrix will be considered true and has its color changed to a pre-defined standardized color. The sum of all pixels valued as true is computed and transformed into absolute (micron) or fractional (%) areas by the software (Fig. 2A and 2C).

The software runs on Windows 95, 98, Me, XP, 2000 (not tested on NT) and requires at least a Pentium 233 MHz processor, 32 MRAM, 800 x 600 monitor resolution at 16 bits color deep. However, a Pentium III 850 MHz processor, 256 MRAM and 1152 x 864 monitor resolution at 32 bits color deep is recommended.

The general scheme of LGMC-IMAGE consists of a main panel (Fig. 2) from which the user can choose different tasks to perform. The main menu screen shows the major functions that can be used to change a chosen color and its nuances to a pre-defined standardized color that can be counted as fractional (%) and/or absolute (micron) area. More command buttons showing on drawing panel can be used to retouch areas (Fig. 3B and 3C) and measure distances between points or specific areas (Fig.3D). The self-explanatory icons allow the user to alter and save the attributes used by each function in the analysis.

Histological samples

The validation of LGMC-IMAGE software was performed in 1) samples obtained from endomyocardial biopsies obtained during cardiac surgery for geometric reconstruction of left ventricle after myocardial infarction and stained with Masson trichrome, and 2) samples from LDL receptor knockout mice aorta prepared for immunohistochemistry with antibody against nitric oxide synthase 1 (NOS1). Procedures for immunohistochemistry were performed as described by Krieger *et al.* [11] and Tambascia *et al.* [12]. Images were captured by a calibrated high-resolution videocamera (Leica DC 300F) connected to a light microscope (Leica DMLB) using an oil-immersion lens with final amplification of all samples of 1440 X. The digital images were then transferred to a personal microcomputer and saved for posterior analysis as BITMAP, characterized by the width and height of the image in pixels and the number of bits per pixel, which determines the number of colors it can represent.

Data analysis and Statistics

The samples were examined in three different occasions by 2 observers unaware of each other's analysis. Both observers analyzed the images either with LGMC-IMAGE or with grid-driven manual counting. The analysis was performed in 60 random microscopic fields of Masson trichrome and of immunohistochemical stained samples, and a linear regression analysis was performed to assess the ability of computerized analysis to reproduce data generated by manual counting. The comparison of intra- and inter-personal variation between the two methods was performed using the paired *t*-test, with the level of significance set at 5%.

RESULTS

Comparison of manual and software-aided counts

To validate the ability of software-aided analysis to produce reliable counting of image structures, we first compared the results obtained by manual counts with those of software-aided counting for stromal tissue of human myocardial samples (Fig. 4) obtained from intra-operative

biopsis stained with Masson trichrome. A comparison of manual and software-aided counts revealed a good correlation between both methods ($R^2=0.96$). Software aided counts give comparable numbers with those obtained by manual counting but with much lower variation. As the human myocardial tissue samples used in the present study showed a relatively high fractional area of stained stromal tissue, we next analyzed samples of aorta obtained from LDL receptor knockout mice fed with hypercholesterolemic diet and prepared for immunohistochemistry with anti-NOS1 antibody. These experiments characteristically generated a more discrete staining pattern, located in a specific region of mouse aorta, such as sub-intimal space and media layer. As shown in figure 5, the software-aided counting of immunohistochemical staining also revealed a good correlation with manual counts of areas specifically stained with anti-NOS1 antibody ($R^2=0.87$).

Reproducibility of software-aided and manual counting

The reproducibility of the fractional area counting using the software-aided and manual counting were assessed using images recorded from 15 different histological sections of LDL receptor knockout mice aorta. The fractional area stained with anti-NOS1 antibody was counted in 30 different images by two analysts, each image in triplicate. The intra- and inter-person variation is given in table 1. The same analysts also quantified the fractional area in the same sections using the computer program. Although the results of these methods correlated well, there was a much larger variation when the fractional area was analyzed by manual counting (Table1).

DISCUSSION

The versatile software shown here was primarily designed for the quantification of changes in tissue components of stained histological samples. However, the validation procedures performed by comparison with the standard morphometric methods demonstrated

the reproducibility and reliability of LGMC-IMAGE software applied to image analysis of histological sections as well as to immunohistochemical samples.

The interpretation of the results depends on the magnitude of the variables that are being analyzed [13]. A comparison of manual and software-aided counts produced similar results; these two methods can be considered to have a good similarity. This indicates they are reliable alternative methods for quantitative analysis of histological sections. The manual counting method allows analysis of images visualized directly under the microscope, in cases where a computer or appropriate software is not available. On the other hand, the software-aided counts allow an efficient, reliable and reproducible processing of tissue sections that is less time-consuming than conventional methods and can be performed with a standard microscope and computer. However, some variables must be taken into account for the segmentation of the image by the use of the software, i. e. the illumination and focus of the microscope in image capturing.

LGMC-IMAGE has several features that may allow it to have particularly broad utility in image analysis. Firstly, an important feature is the possibility of a user-defined adjustment of color tones included in the counts of a specific stained area by simple adjustments of the error of a chosen color. This has the advantage of eliminating the influence of the elevated variability of tones of stained tissue structures commonly observed in preparations used for histology [5] and immunohistochemistry [1]. This also eliminates one of the problems that would make RGB analysis worse than analysis based on HIS attributes of colors. A second advantageous feature of the LGMC-IMAGE software is its ability to allow a user-defined retouch and elimination of undesired stained areas from the final counting, the use of this function eliminates errors caused by unspecific staining of a sample. A third advantage of LGMC-IMAGE is that it runs well on a fairly basic personal computer. Some commercially available softwares for image analysis,

besides being expensive, require more sophisticated computer resources that are not always readily available in areas where many end users are located. Moreover, image analysis may be performed from saved images in the commonly used extensions and also from other sources such as scanned images, for example. Finally, it is also important to say that the LGMC-IMAGE software is useful for personnel with relatively limited background in image analysis or computer training. The help screen and intuitive layout of the LGMC-IMAGE software encourage both exploration and learning.

In the current manuscript we have shown a software primarily designed for quantitative analysis of stained histological samples, but also used for immunohistochemical samples, which is particularly useful because it performs rapid and reliable analysis and does not require major expertise in computer or image analysis. Further developments of this software might allow its use in the quantification of gels, arrays and in situ-hybridization experiments and also in automated image analysis with a broad spectrum of use in biological research.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 98/11403-7 from Franchini, K G and Proc. 03/04201-9 from Krieger, M H) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 521098/97-1 from Franchini, K G and Proc. 303030/03-8 from Krieger, M H).

REFERENCES

1. Marszalek A, Daa T, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S (2001) Quantitative immunohistochemical analysis of the expression of CD31 during lung development in the rat. *Cells Tissues Organs*. **169**, 49-54.
2. Garbay G, Brugal G, Choquet C (1981) Application of colored image analysis to bone marrow cell recognition. *Analyt. Quantit. Cytol.* **4**, 272-280.

3. Yamada Y, Merritt C, Kasvand T (1988) Recognition of kidney glomerulus by dynamic programming matching method. *IEEE Trans Pattern Anal Machine Intelligence*. **5**, 731-737.
4. Jain AK, Smith SP, Backer E (1980) Segmentation of muscle cell pictures: a preliminary study. *IEEE Trans Pattern Anal Machine Intelligence*. **3**, 232-242.
5. Brenner JF, Lester JM, Selles WD (1981) Scene segmentation in automated histopathology: techniques evolved from cytology automation. *Pattern. Recogn.* **1**, 65-74.
6. Mandarim-de-Lacerda C (1995) Quantitatives methods in morphology. *EDUERJ, Rio de Janeiro*, 60-69.
7. Amenábar JM, Hugo FN, Fossati AMC, Padilha DMP (2003) The use of stereology as a method in histological research. *Ver. Fac. Odontol. Porto Alegre*. **44**, 62-65.
8. Dickson JM, Weavers HM, Mitchell N, Winter EM, Wilkinson ID, Vanbeek EJ, Griffiths PD (2003) Choice of cross size in stereology a cautionary note. *Neuroradiology*. **45**, 896-899.
9. Barry JD, Sharkey FE (1985) Observers reproducibility during computer-assisted planimetric measurements of nuclear features. *Hum. Pathol.* **16**, 225-227.
10. Castleman KR (1996) *Digital image processing*. Prentice-Hall: New Jersey.
11. Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FRM (2006) Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. **14**, 12-20.
12. Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PDC, Moreno H, Saad MJA, Franchini KG (2000) Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats. *Hypertension*. **37**, 1423-1428.
13. Bland JM, Altman DG (1995) Comparing Methods of measurement: why plotting difference against standart method is misleading. *Lancet*. **346**, 1085-1087.

TABLES AND FIGURES

Table1. Intra- and inter-personal variation obtained with the software-aided and manual quantification of the anti-NOS1 immunoreactive area from aorta.

	Manual	Software
Intra-personal (%)	4.6	1
Inter-personal (%)	9.8	1.8

Figure 1. Panel of Calibration: To activate the calibration panel click in the second icon of the Panel (blue circle) and with the open panel inserts the relative data to the size of the image in micron (Blue rectangle) and finishes the operation saving the measures in the button To save (red rectangle).

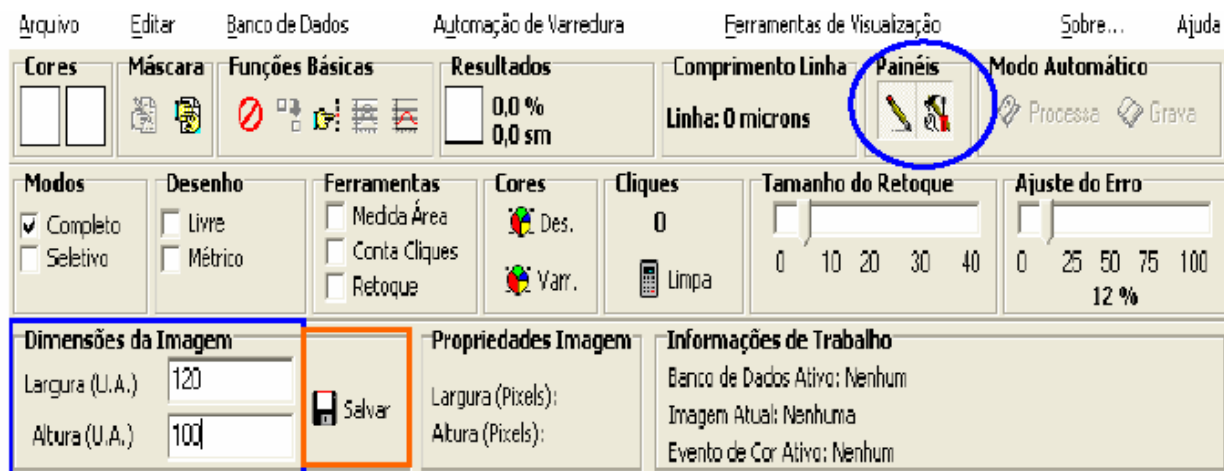


Figure 2. (A) General scheme of LGMC-IMAGE; (B) histological image of endomyocardial: collagen fibers represented by blue area marked in the icon “cores” showed by yellow circle in figure 2A; (C) new image created by software: collagen fibers represented by green area using software to segment the image showed by red circle and the software calculates fractional areas occupied by the green color showed by black and blue circle in figure 2A.

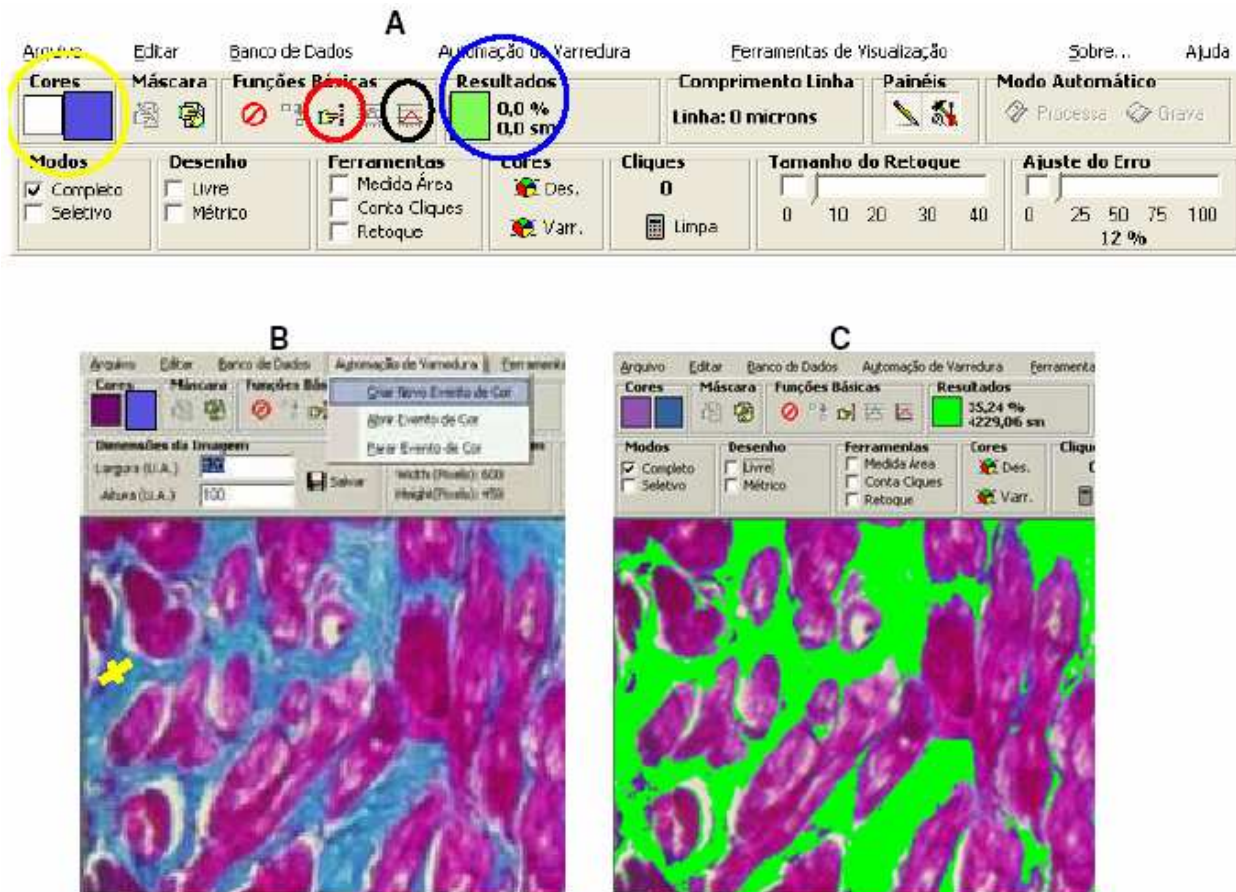


Figure 3. General scheme of LGMC-IMAGE where more command buttons; **(A)** showing on drawing panel; **(B and C)** retouch areas in yellow in the histological image aorta prepared for immunohistochemistry showed by red circle ; **(D)** measures distances between points or specific areas showed by blue circle.

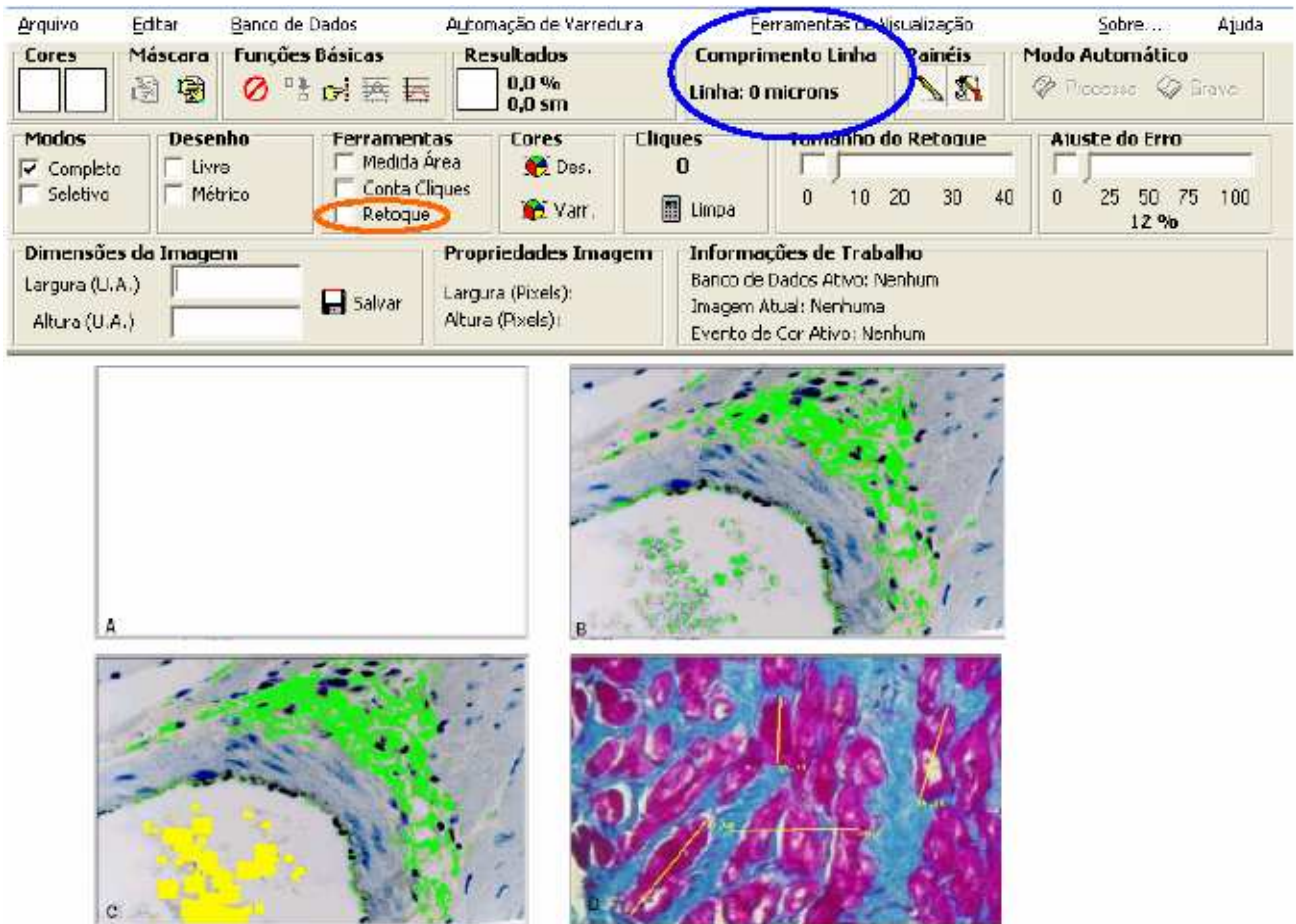


Figure 4. (A) Linear regression analysis revealed a good correlation between software-aided and manual counting of collagen area; (B) microscopic field of endomyocardial stained with Masson trichome; (C) microscopic fields of endomyocardial with the fractional area (stromal tissue) using the software-aided.

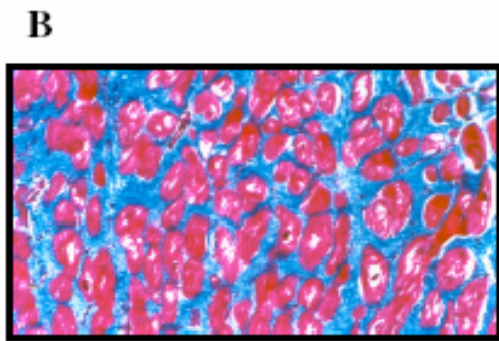
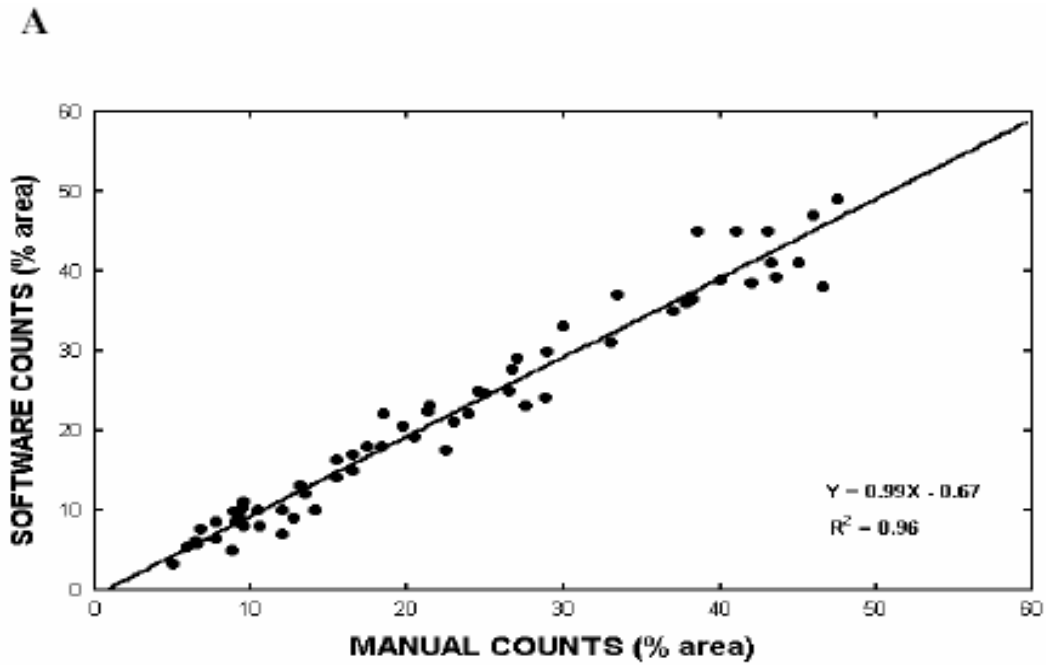
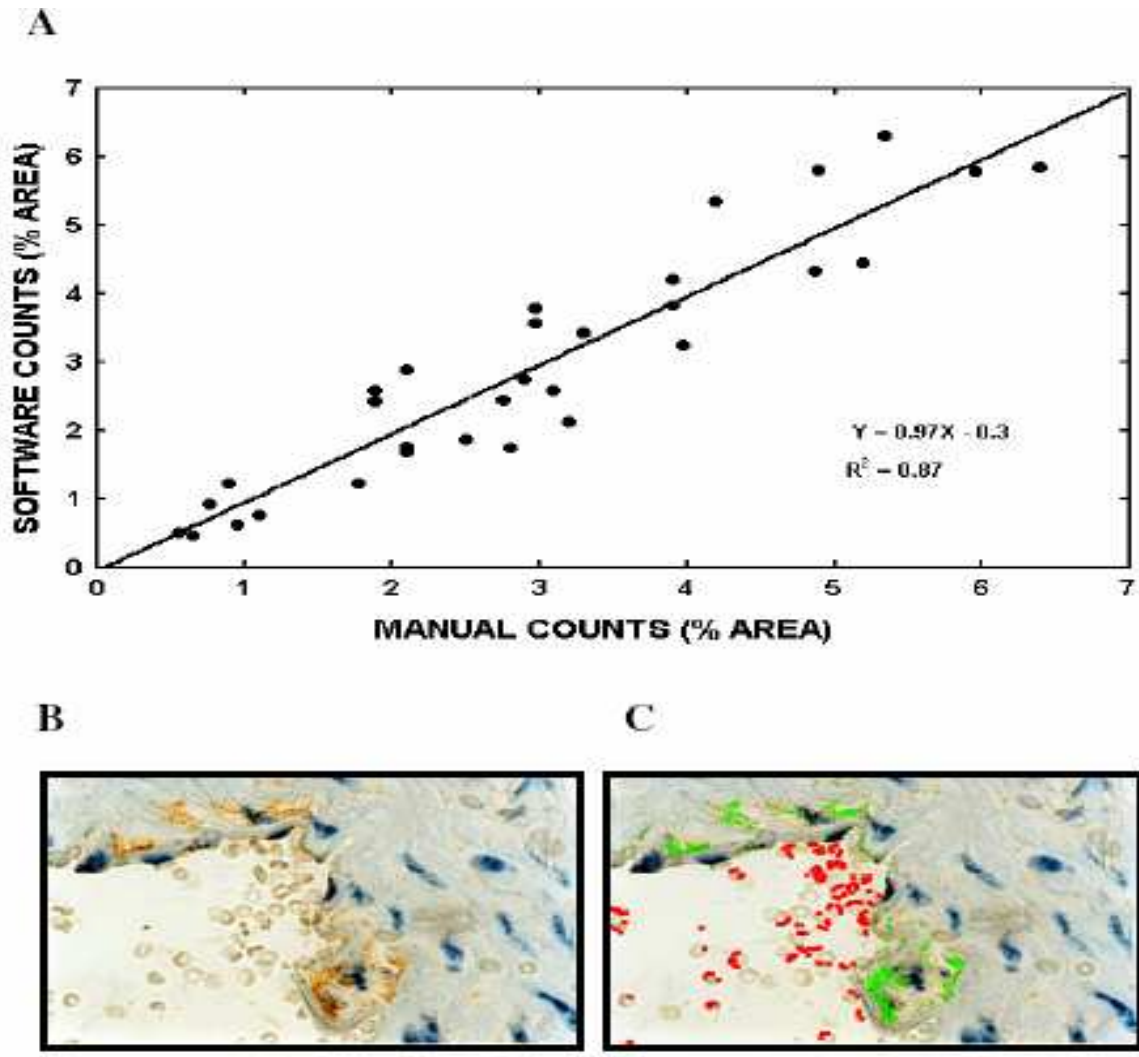


Figure 5. (A) Linear regression analysis revealed a good correlation between software-aided and manual counting in a more discrete staining pattern (immunohistochemistry analyses in aorta); (B) microscopic field of mouse aorta stained with anti-NOS1 antibody; (C) microscopic fields of the fractional area (immunoreactivity area for expression NOS1 in the sub-intimal space e media layer) counting using the software-aided.



IV- Conclusão

4- Conclusão

Os resultados desse estudo mostraram que:

4.1- A deleção do gene do receptor de LDL em camundongos (S) induziu alterações hemodinâmicas caracterizadas por hipertensão e redução da frequência cardíaca, além de déficit contrátil do miocárdio. Essas alterações foram correlacionadas ao estresse oxidativo, resultado do processo inflamatório e hipoexpressão da NOSe, mostrando que o fenótipo hipertensivo e o déficit contrátil nesse modelo animal pode ser considerado como uma resposta adaptativa à deleção gênica.

4.2- A dieta hipercolesterolêmica, por um período de 15 dias, promoveu em camundongos LDLr-/- (Chol) o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda com incremento no depósito de colágeno. Esse efeito deletério provido pela ingestão da dieta foi relacionado ao aumento dos processos inflamatório e oxidativo, caracterizados por aumento nas expressões do CD40L nos tecidos cardíaco e vascular. O tratamento com SNAC (Chol+SNAC) preveniu todas as alterações estruturais induzidas pela dieta hipercolesterolêmica.

4.3- A expressão das isoformas das NOS no coração e no tecido vascular ocorreram dependentemente dos fatores genéticos (expressão do gene do receptor de LDL), bem como dos fatores ambientais (administração da dieta e tratamento com SNAC).

4.4- O SNAC impediu o desenvolvimento da HVE por processos que envolveram efeito antiinflamatório (detectado pela diminuição na expressão do CD40L) e decréscimo na expressão das NOS, independentemente da hipertensão.

4.5- O *software* (LGMC-IMAGE vs 1.0) mostrou resultados fidedignos, e seu uso pode ser particularmente útil para executar de maneira rápida e confiável as medidas morfométricas.

V- Referências Bibliográficas

5- Referências Bibliográficas

- Adamopoulos S, Parissis J, Kremastinos D Th. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. **Eur J Heart Fail.** 3:517-526, 2001.
- Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Biochem Biophys Res Commun.** 289; 901-907, 2001.
- André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. **Circulation.** 106: 896 –899, 2002.
- Andrew P.J., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res.** 43(3): 521-31, 1999.
- Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelia constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. **Circ Res.** 82:195–203, 1998.
- Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokinemediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. **Circ Res.** 85: 829-840, 1999.
- Aubin MC, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Perrault LP. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. **J Cardiovasc Pharmacol.** 47(5): 702-710, 2006.
- Baker KM, Chernin MI, Wixson SL, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. **Am J Physiol.** 259: H324–H332, 1990.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **J Biol Chem.** 270: 14582–14586, 1995.

- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. . Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**. 416: 337–339, 2002.
- Barouch LA, Cappola TP, Harrison RW, Crone JK, Rodriguez ER, Burnett AL, Hare JM. Combined loss of neuronal and endothelial nitric oxide synthase causes premature mortality and age-related hypertrophic cardiac remodeling in mice. **J Mol Cell Cardiol**. 35: 637–644, 2003.
- Barreto RL , Correia CRD, Muscará M N. Óxido Nítrico: Propriedades E Potenciais Usos Terapêuticos. **Quim. Nova**. 28 (6) 1046-1054, 2005.
- Biecker E, Sägesser H, Reichen J. Vasodilatador mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. **European Journal of Clinical Investigation** 34: 283-9, 2004.
- Borger RH, Sydow K, Borlak J Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells. **Circ Res**. 87: 99-105, 2000.
- Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem Pharmacol**. 59: 13–23, 2000.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 12: 463– 519, 1996.
- Bush PK, Bartkova J, Strom CC, Wulf-Andersen L, Hinrichsen R, Christoffersen TE, Latella L, Bartek J, Haunso S, Sheikh SP . Involvement of cyclin D activity in left ventricle hypertrophy in vivo and in vitro. **Cardiovasc Res**. 56: 64–75, 2002.

- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res.** 87: 840-844, 2000.
- Campos LA, Iliescu R, Fontes M, Schlegel WP, Bader M, Baltatu OC. Enhanced isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006, Epub ahead of print
- Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. **Circulation.** 105: 1983-1988, 2002.
- Cooke JP, Okada RK. Atherogenesis and the arginine hypothesis. **Curr Atheroscler Rep.** 3: 252-259, 2001.
- Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. **J Clin Invest.** 101:1530-1537, 1998.
- Cotran RS, Collins T, Robbins SL, Kumar R. **Robbins Pathologic Basis of Disease.** 6^a Edition. Philadelphia: Editora WB Saunders, 1999.
- Da Luz PL, Laurindo FRM., Chagas ACP. **Endotélio: Doenças Cardiovasculares.** São Paulo: Atheneu Editora, 2003.
- Dash R, Schmidt AG, Pathak A, Gerst MJ, Biniakiewicz D, Kadambi VJ, Hoit BD, Abraham WT, Kranias EG. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy, **Cardiovasc Res,** 57: 704-714, 2003.
- Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg.** 82: 1598-1610, 1995.
- Deschepper CF, Olson JL, Otis M, Gallo-Payet N. Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. **J Appl Physiol.** 97: 369-76, 2004.

- Deten A, Holz A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. **J Mol Cell Cardiol.** 33:1191–1207, 2001.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 82: 125-140, 2002.
- Dzau VJ, Krieger JE. Molecular Biology of Hypertension. In: **Molecular biology of the cardiovascular system.** CAMBRIDGE: Blackwell Scientific Publishing, 325-353, 1993.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnel VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reaction and modification of biomolecules. **Mol Aspects Med.** 19: 221-357, 1998
- Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ. Inhibition of Na(p)-H(p) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. **Circ Res.** 90: 814–819,2002.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in b1-adrenergic receptor transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci.** 96 (12): 7059–7064, 1999.
- Espey MG, Miranda KM, Thomas DD Xavier S, Citrin D, Vitek MP, Wink DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. **Ann N Y Acad Sci.** 962: 195-206, 2002.
- Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(17): 11363-11368, 2002
- Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res.** 63(3): 450-457, 2004.

- Filho BG. **Bogliolo, Patologia Geral.** 3^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- Fleming I, Busse R. NO:the primary EDRF. **J Mol Cell Cardiol.** 31: 5-14, 1999.
- Franchini KG. Mecanismos moleculares na hipertrofia cardíaca, estímulos hipertróficos. **Hipertensão.** 5: 112-117, 2002.
- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MIA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res.** 87: 558–565, 2000.
- Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese GP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats, **Cardiovasc Pathol.** 13: 11-19, 2004.
- Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Disruption of inducible nitric oxide synthase improves β -adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy, **Circ Res.** 90: 959-965, 2002.
- Gallo MP, Ghigo D, Bosia A, Alloatti G, Costamagna C, Penna C, Levi RC. Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. **J Physiol.** 506 (3): 639-651, 1998.
- Gelbmann CM, Leeb SN, Vogl D, Maendel M, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W, Rogler G. Inducible CD40 expression mediates NF κ B activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. **Gut.** 52(10): 1448-56. 2003.
- Genda S, Miura T, Miki T, Ichikawa Y, Shimamoto K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.** 40(7): 1339-1346, 2002.

- Goligorski MS, Brodsk S, Chen J. Relationship between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. **Am J Physiol Renal Physiol.** 283: F1-10, 2002.
- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol.** 280: 193-206, 2001.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res,** 74:1141-8, 1994.
- Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthases by interacting with the heme prosthetic group. **J Biol Chem.** 269:21644-21649, 1994.
- Han X, Kubota I, Feron O, Opel DJ, Arstall MA, Zhao YY, Huang P, Fishman MC, Michel T, Kelly RA. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I_{Ca-L} is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95: 6510–6515, 1998.
- Hansson GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med.** 352: 1685-695, 2005
- Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. **Circulation.** 97: 1952–1959, 1998.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **J Clin Invest.** 100: 2153-7, 1997.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circ Res.** 82(11): 1111-1129, 1998.

- Heineke J, Kempf T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel RJ, Caroni P, Lohmann SM, Drexler H, Wollert KC Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. **Circulation.** 107: 1424–1432, 2003.
- Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6 related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. **Proc Natl Acad Sci.** 92: 4862–4866, 1995.
- Hunter JJ, Chien KR. Signaling Pathways for Cardiac Hypertrophy and Failure. **N Engl J Med,** 341: 1276–1283,1999.
- Ignarro J, Napoli C, Loscalzo J. Nitric Oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. **Cir res.** 90:21-28, 2002
- Izumo S, Sadoshima J. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu Rev Physiol,** 59: 551–571, 1997.
- Janicki JS. Myocardial Collagen remodeling and left ventricular diastolic function. **Braz J Med Biol Res.** 25: 975-82, 1992.
- Jaworski K, Kinard F, Goldstein D, Holvoet P, Trouet A, Schneider YJ, Remacle C. S-nitrosothiols do not induce oxidative stress, contrary to other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol.** 425(1): 11-19, 2001.
- Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. **Hypertens Res.** 28(6): 483-490, 2005.
- Kannel WB. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. **Am J Med.** 3: 4–11, 1983.

- Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. **Circ Res.** 81:187-195,1997.
- Keaney Jr. JF. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. **Molecular Aspects of Medicine.** 21: 99-166, 2000.
- Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy, **Bioessays.** 6: 608-615, 2004.
- Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM. . Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. **Circ Res.** 92:1322–1329, 2003.
- Klimaschewski L, Kummer W, Mayer B, Couraud JY, Preissler U, Philippin B, Heym C. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. **Circ Res.** 71: 1533– 1537, 1992.
- Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. Noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension.** 25: 1111-1115, 1995.
- Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FRM. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide.** 14: 12-20, 2006.
- Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II, **Circ Res.** 86: 463-469, 2000.

- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation.** 95: 588-93, 1997.
- Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **J Physiol.** 540: 457–467, 2002.
- Lee TM, Lin MS, Chou TF, Tasai CH, Chang NC. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial K_{ATP} channels in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis.** 176: 273 – 278, 2004.
- Lee TM, Lin SM, Chou TF, Chang NC. Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits, **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 288: H1352–H1358, 2005.
- Leite PF, Danilovic A, Moriel P, et al. Sustained superoxide dismutase down regulation contributes to constrictive remodeling after vascular injury in rabbits. **Circulation.** 106: 42-50, 2002.
- Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 287: R1014-R1030, 2004.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation.** 105: 1135-1143, 2002.
- Lin F, Owens WA, Chen S, Stevens ME, Kesteven S, Arthur JF, Woodcock EA, Feneley MP, Graham RM. Targeted α_1 -adrenergic receptor overexpression induces enhanced cardiac contractility but not hypertrophy. **Circ Res.** 89: 343–350, 2001
- Lorell BH, Carabello BA. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. **Circulation.** 102: 470–479, 2000.

- Machida S, Kariya F, Kobayashi K, Narusawa M. Lack of effect of running training at two intensities on cardiac myosin isoenzyme composition in rats. **Jpn J Physiol.** 50: 577-583, 2000.
- Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. **J Card Fail.** 8(6): S379-386, 2002.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. **Circ Res.** 93(5):388-398, 2003.
- Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats, **Hypertension.** 27: 14-18, 1996.
- Michel, T. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why. **J Clin Invest.** 100: 2146-2152, 1997.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial receptor function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. **Science.** 264: 582-586, 1994.
- Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs, **Cardiovasc Res.** 63: 467-75. 2004
- Molkentin JD, Dorn II GW. Cytoplasmic Signaling Pathways That Regulate Cardiac Hypertrophy. **Annu Rev Physiol.** 63: 391-426, 2001.
- Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua BHL, Russo LA, Peterson CI, Mcdermott PJ, Watson PA. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. **Ann Rev Physiol.** 49: 533-543, 1987.
- Nakagami H, Takemoto M, Liao JK. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol.** 7:851-859, 2003.

- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. **Nitric Oxide.** (2) 88-97, 2001.
- Nian M, Lee P, Klaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res.** 94:1543-1553, 2004.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J Clin Invest.** 91: 2546–2551, 1993.
- Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria, **Faseb J.** 19: 278-280, 2004.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion, **Circ J.** 66 : 851-856, 2002.
- Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. **Proc Natl Acad Sci.** 97: 931–936, 2000.
- Pardo JV, Siciliano JD, Craig SW. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. **J Cell Biol.** 97: 1081–1088, 1983.
- Paton JF, Kasparov S, Paterson DJ. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. **Trends Neurosci.** 25: 626–631, 2002
- Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. **Circ Res.** 91:1119–1126,2002.

- Pereira FEL. Hipertrofia cardíac: aspectos morfológicos e patogenéticos. **In Contratilidade miocárdica**. Aspectos básicos e clínicos. Editores Vassale Dv, e Lima EG (eds). São Paulo, BYK, 13-28, 1993.
- Pritchard Jr KA, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**. 276: 17621-24, 2001.
- Rao S, Verkman AS Analysis of organ physiology in transgenic mice. **Am J Physiol Cell Physiol**. 279: 1-18, 2000.
- Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zats R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**. 20: 298-303, 1992.
- Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. **Nitric Oxide**. 7: 57-66, 2002.
- Russell B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. **J Appl Physiol**. 88: 1127-1132, 2000.
- Sabri A, Pak E, Alcott SA, Wilson BA, Steinberg SF. Coupling function of endogenous α 1- and β -adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes. **Circ Res**. 86: 1047–1053, 2000.
- Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, Dorn Gw I I. Decompensation of pressure overload hypertrophy in *Gαq* overexpressing mice. **Circulation**. 97:1488–1495, 1998.
- Samuelsson AM, Bollano E, Mobini R, Larsson BM, Omerovic E, Fu M, Waagstein F, Holmang A. Hyperinsulinemia: Effect on Cardiac Mass/Function, Angiotensin II Receptor Expression, and Insulin Signaling Pathways. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 291:H787-796, 2006.

- Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, Sorge R, Violi F. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. **J AM Coll Cardiol.** 45: 35-42, 2005.
- Sase K, Michel T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Trends Cardiovasc Med.** 7: 28-37, 1997.
- Sato K, Komaru T, Shioiri H, Takeda S, Takahashi K, Kanatsuka H, Nakayama M, Shirato K. Hypercholesterolemia impairs transduction of vasodilator signals derived from ischemic myocardium: myocardium-microvessel cross-talk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 24 (11): 2034-2039, 2004
- Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: a meta analysis of randomized double-blind studies. **JAMA.** 275: 1507–1513, 1996.
- Schönbeck U, Libby P. CD40 Signaling and Plaque Instability. **Circ Res.** 89: 1092-103, 2001.
- Schulz R, Smith JA, Lewis MJ, Moncada S. Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. **Br J Pharmacol.** 104: 21–24, 1991.
- Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during *in vivo* pressure overload. **J Clin Invest.** 106: R25–R29, 2000.
- Shiojima L, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. **Circ Res.** 90:1243-1250, 2002 .
- Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death, **J Am Coll Card,** 35: 36-44, 2002.

- Shishido SM, de Oliveira MG. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. **Photochem Photobiol.** 71:273-80, 2000.
- Shubeita HE, Martinson EA, Van Bilsen M, Chien KR, Brow JH. Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.** 89: 1305-1309, 1992.
- Silva GJJ, Krieger JEK. Hipertrofia ventricular esquerda na hipertensão arterial. **Hipertensão,** 3: 156-160, 2000.
- Simpson P, Mcgrath A. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha1 adrenergic response. **J Clin Invest.** 72: 732–738, 1983.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 89:444-8, 1992.
- Stokes KY, Granger DN. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? **J Physiol.** 562.3: 647-653, 2005.
- Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **J Biol Chem.** 276:14533-6, 2001.
- Sugden P.H. Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocytes and their role in the myocardial pathologies. **J Crad Fail.** 8 (6): S359-S369, 2002.
- Sundström J, Lind L, Vessby B, Andrén B, Aro A, Lithell H. Dyslipidemia and an Unfavorable Fatty Acid Profile Predict Left Ventricular Hypertrophy 20 Years Later, **Circulation.** 103: 836-841, 2001.

- Sussman A, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the Titanic: Biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circ Res.** 91: 888-898, 2002.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolocci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load, **J Clin Invest.** 15(5): 1221-31, 2005.
- Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PDC, Moreno H, Saad MJA, Franchini KG. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats, **Hypertension.** 37: 1423-1428, 2000.
- Tandon R, Sinha MK, Garg H, Khanna R, Khanna HD. Oxidative stress in patients with essential hypertension. **Natl Med J India.** 18: 297-299, 2005.
- Torsoni AS, Bôer-Lima PA, Franchini KG. Pulsatile stretch rapidly activates focal adhesion kinase (Fak) in cultured cardiac myocytes. **Faseb J.** 15: A905-A905, 2001.
- Ueland T, Aukrust P, Yndestad A, Otterdal K, Froland SS, Dickstein K, Kjekshus J, Gullestad J, Damas JK. Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure. **Eur Heart J.** 26(11): 1101-1017, 2005.
- Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, Kuzuya T, Takeda H, Hori M. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.** 34: 2120-2125, 1999.
- Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. **Curr Vasc Pharmacol.** 3: 221-229, 2005.

- Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. **Circulation.** 106: 981–986, 2002.
- Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. **J Hypertens Suppl.** 14: 83-93, 1996.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95: 9220– 51, 1998.
- Vellaichamy E, Sommana NK, Pandey KN. Reduced cGMP signaling activates NF-kappaB in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. **Biochem Biophys Res Commun.** 327(1): 106-111, 2005.
- Vishnevetsky D, Kiyani VA, Gandhi PJ. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. **Ann Pharmacother.** 38(9): 1500-1508, 2004.
- Von Harsdorf R, Kang RE, Fullerton M, Woodcock EA. Myocardial stretch stimulates phosphatidyl-inositol turnover. **Circ Res.** 65: 494–501, 1989.
- Wang YR, Yen CH, Sun YF, Laun YT. Gender-dependent response in blood pressure changes following the inhibition of nitric oxide synthase. **Chin J Physiol.** 46: 91-4, 2003.
- Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T *et al.* Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy: assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/ leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. **J Biol Chem.** 271:9535–9545, 1996.
- Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis, **Heart Fail Rev.** 7: 317-325, 2002.

- Wollert KC, Fiedler B, Gambaryan S, Smolenski A, Heineke J, Butt E, Trautwein C, Lohmann SM, Drexler H. Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. **Hypertension**. 39:87–92, 2002.
- Wong GKT, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrol Dial transplant**. 11: 215-20, 1996.
- Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. **Curr Pharm Biotechnol**. 7: 101-108, 2006.
- Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. **Circulation**. 95(5): 1247-1252, 1997.
- Yugar-Toledo JC, Tanus-Santos JE, Sabha M, Sousa MG, Cittadino M, Tacito LHB. Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. **American College of Chest Physicians**. 125(3): 823-830, 2004.
- Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RI, Koch WJ, Lakatta EG. Coupling of b2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. **Circ Res**. 84: 43–52, 1999.
- Xu KY, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. **J Biol Chem**. 278(43): 41798-41803, 2003.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Brecht DS, Becker LC. Nitric oxide synthases in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96 (2): 657-662, 1999.

Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability. Role of Arginine Metabolism and Oxidative Stress. **Hypertension**. 2006 [Epub a head of print].

Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses β -adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. **Circulation**. 104: 2961–2966, 2001.

Ziolo MT, Bers DM. The real estate of NOS signaling: location, location, location. **Circ Res**. 92:1279–1281, 2003.