

LUIZ DE ARRUDA ROLIM FILHO

**“Proteção Miocárdica Tardia por cloridrato de 6,7-dimetoxi-4-
N-(3’-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina em Corações Isolados
de Ratos”**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do
Farmacêutico – Luiz de Arruda Rolim Filho.*

Campinas, 18 de outubro de 2005/

Kleber Gomes Franchini
Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
- Orientador -

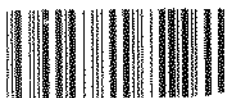
Campinas
2005

LUIZ DE ARRUDA ROLIM FILHO

**“Proteção Miocárdica Tardia por cloridrato de 6,7-dimetoxi-4-
N-(3'-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina em Corações Isolados
de Ratos”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-
graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.*

Orientador: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI



1150067627



FCM

T/UNICAMP R546n



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CAMPINAS
2005

IDADE FCM
CHAMADA 770 UNICAMP
R 646p
EX
MBO BC/ 63623 / FCM/ 3325
DC 16.00013/06
DZ
EÇO 41.00
TA 22/03/06
CPD

b. vol 376085

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R646p

Rolim Filho, Luiz de Arruda

“Proteção miocárdica tardia por cloridrato de 6,7-dimetoxi-4-*N*-(3'-*N*, *N*-dimetilfenil) aminoquinazolina em corações isolados de ratos” /
Luiz de Arruda Rolim Filho. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síntese de Óxido Nítrico. 2. Isquemia Miocárdica. 3. Pré-
Condicionamento Isquêmico. 4. Coração. 5. Óxido Nítrico. I.
Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. II. Título.

(Slp/fcm)



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/10/2005

Dedico este trabalho:
Aos meus familiares e amigos, pelo apoio
irrestrito.
Àqueles que não têm acesso à escola, pelo
apoio compulsório.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio, pela paciência e pelo exemplo de dedicação.

Ao Departamento de Farmacologia, pela acolhida e auxílio prestado.

Ao Cnpq pelo apoio financeiro.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental onde realizei grande parte desse trabalho.

Ao laboratório de Bioenergética do Prof. Dr. Aníbal Vercesi, em especial ao amigo Jesus Velho, pela colaboração.

À Silvana Rocco, Rodrigo Marin, Daniela Crosara, Thais Theizen, Rosana Inoue, Antonio Calixto, Jackeline Lima, Carolina Clemente, Cinira Soledade, Marcos Corat, Márcia Story, Talita Marin, Thais Tornatore, Leandro Bueno, Marcelo Mantovani, Wilson Nadruz, Eloíze Chiarreotto e outros, pela amizade, paciência e imprescindível colaboração.

Ao secretário da Farmacologia, Vanderlei, pelo empenho e colaboração para a realização do nosso objetivo.

A todos os que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado.

O primeiro impulso da alma nobre, no mundo,
é querer consertá-lo de uma só vez.
Mas o tempo mostra-lhe o engano,
e ela passará a consertar a si mesma.

(SÓCRATES)

	PÁG
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	20
OBJETIVOS.....	48
MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	84
CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

·OH	radical hidroxila
12-LO	12-lipoxigenase
ADO	adenosina
ADP	adenosina di-fosfato
AE	átrio esquerdo
AMP 579	[1S-[1a, 2b, 3b, 4a(S*)]]-4-[7-[[2-(3-cloro-2-tienil)-1-metipropil] amino]-3H-imidazo [4,5-b] piridin-3il] ciclopentano carboxiamida
AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfato quinase
BH ₄	anion peróxinitrito
BNTX	7-benzilidenenaltrexone
Ca ²⁺	ion cálcio
canal mitoK _{ATP}	canal mitocondrial de potássio ATP-dependente
CCPA	2-cloro-N ⁶ -ciclopentiladenosina
celecoxib	4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenosulfonamida
CEMIB	Centro Multidisciplinar de investigação Biológica da Unicamp
cGMP	guanosina monofosfato ciclico
CGS 15943	cloro-2-(2-furil)[1,2,4] triazolo [1,5-c] quinazolin-5-amina
CGS21680	2-p-(2-carboxietil)-fenetilamino-5'-etilcarboxiamino-adenosina
COX-2	ciclooxigenase-2
DMA	cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina
DMSO	dimetilsulfóxido
dp/dt	derivada da pressão em relação à derivada do tempo
-dp/dt	módulo da derivada negativa da pressão em relação à derivada do tempo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
GPCRs	receptores acoplados à proteína G (<i>G-protein coupled receptor</i>)

H89	N-[2-(4-bromocinamilamina) etil] 5-isoquinolina
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
IB-MECA	N ⁶ -3-iodobenziladenosina-5'-N-metilcarboxamida
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LD-A	lavendustin A
L-NAME	N ^o -Nitro-L-arginina metil éster
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
Mn-SOD	superóxido desmutase dependente de manganês
MPT	poro de transição de permeabilidade
MRS 1191	3-etil-5-benzil-2-metil-6-pentil-4-feniletinil-1,4-(+/-)-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato (forma reduzida)
NF-κB	fator nuclear κB
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NOS1	óxido nítrico sintase neuronal
NOS2	óxido nítrico sintase induzível
NOS3	óxido nítrico sintase endotelial
NS398	N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida
O ₂ ⁻	anion superóxido
OH ⁻	ânion hidróxido
PBS	solução de salina tamponada com fosfato
PCI	pré-condicionamento isquêmico
PDE5	fosfodiesterase do tipo 5
PI3K	fosfatidil-inositol 3-OH quinase
PKA	proteína A quinase
PKB	proteína B quinase
PKC	proteína C quinase
PKTs	proteínas tirosina quinases
PTX	toxina <i>pertussis</i>

ROS	espécies reativas de oxigênio
Rp-Camp	adenosina 3'5'-monofosforotioato cíclico Rp-isômero
SOD	superóxido dismutase
VDAC	canal aniônico voltagem dependente
VE	ventrículo esquerdo
ZM241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4] triazolo [2,3-a][1,3,5] triazim-5-ilamino] etil) fenol

	PÁG
Figura 01: Representação esquemática das possíveis vias de sinalizações envolvidas no pré-condicionamento isquêmico (PCI).....	25
Figura 02: Vias e enzimas envolvidas no metabolismo de adenosina.....	28
Figura 03: Estrutura química do composto derivado quinazolinico, DMA.....	51
Figura 04: Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda.....	52
Figura 05: Exemplos de registros de pressão do ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos.....	60
Figura 06: Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a pressão diastólica ventricular esquerda em corações isolados de ratos.....	62
Figura 07: Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a pressão diastólica ventricular esquerda em corações isolados de ratos.....	64
Figura 08: Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos.....	65
Figura 09: Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos.....	67
Figura 10: Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a frequência dos batimentos cardíacos de corações isolados de ratos.....	68
Figura 11: Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a frequência dos batimentos cardíacos de corações isolados de ratos.....	69

Figura 12:	Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a $+dp/dt$ de corações isolados de ratos.....	71
Figura 13:	Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a $+dp/dt$ de corações isolados de ratos.....	73
Figura 14:	Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a $-dp/dt$ de corações isolados de ratos.....	74
Figura 15:	Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a $-dp/dt$ de corações isolados de ratos.....	76
Figura 16:	Exemplos de registros de pressão do ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos sob efeito do L-NAME.....	78
Figura 17:	Gráficos representativos do efeito do L-NAME sobre a pressão diastólica do ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos.....	80
Figura 18:	Gráficos representativos do efeito do L-NAME sobre a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos.....	82
Figura 19:	Exemplos de “immunoblot” e gráfico representativo do efeito do DMA sobre a expressão de iNOS de extrato total de corações de ratos.....	83

RESUMO

Fundamentação: O pré-condicionamento isquêmico (PCI) é uma resposta adaptativa, na qual a exposição a breves períodos de isquemia aumenta a capacidade do miocárdio em resistir à isquemia prolongada. Originalmente, o PCI foi descrito como uma adaptação imediata do miocárdio a curtos episódios de isquemia, mas atualmente sabemos que se trata de um fenômeno bifásico. O fenômeno de PCI agudo é mediado por mecanismos de sinalização intracelulares. Diversos hormônios, neurotransmissores e substâncias de liberação local são considerados gatilho desse fenômeno, dentre eles se destaca a adenosina (ADO). Por outro lado, o PCI tardio envolve a transcrição gênica. Evidências indicam que a NOS possui papel importante na geração e manutenção do PCI agudo e tardio do miocárdio. No presente trabalho utilizamos o DMA, um derivado de 4-anilinoquinazolininas e inibidor da atividade tirosina quinases da família de receptores EGF, como um indutor farmacológico de proteção miocárdica contra os danos da isquemia / reperfusão.

OBJETIVO: Os objetivos do presente trabalho são: 1 - avaliar o efeito do composto derivado quinazolinico DMA (Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina) como indutor de proteção tardia na prevenção de danos da isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos; 2 - avaliar a participação de óxido nítrico sintetase (NOS) na proteção tardia induzida pelo DMA em corações isolados de ratos.

RESULTADOS: Os ratos foram tratados com doses únicas de DMA (1,2 mg/Kg, via endovenosa) ou veículo (DMSO) por períodos que variaram de 24 a 72 horas de antecedência ao protocolo de isquemia / reperfusão (I/R) em corações isolados. Esse protocolo foi composto de um registro de 10 minutos para período controle, 30 minutos de isquemia e 35 minutos de reperfusão.

Animais tratados com veículo apresentaram aumento da pressão diastólica no ventrículo esquerdo (VE), enquanto que a pressão sistólica no VE manteve-se nos mesmos níveis do período controle. Sendo assim, a pressão desenvolvida no VE foi reduzida nestes animais. Nos animais tratados com DMA houve aumento da pressão diastólica no VE durante a reperfusão, porém, com menor intensidade que aquele observado em corações de animais tratados com veículo. Como a pressão sistólica no VE atingiu níveis semelhantes aos do período controle, a pressão desenvolvida pelos corações de animais tratados com DMA foi maior que aquela dos corações de animais tratados com veículo, indicando proteção parcial aos efeitos da I/R.

Para avaliar se a proteção conferida pelo DMA é dependente da ação de NO, os animais tomaram L-NAME (30mg/Kg/dia) por 3 dias antes do tratamento com DMA ou veículo, sendo o L-NAME continuamente ingerido através da água até seus corações serem submetidos ao protocolo de I/R em períodos de 24 a 72 horas após o tratamento com DMA ou veículo. Nos corações dos animais tratados com L-NAME + veículo e nos corações dos animais tratados com L-NAME + DMA a recuperação dos batimentos foi acompanhada de aumento da pressão diastólica no VE quando comparado ao período controle. A pressão sistólica no VE atingiu níveis semelhantes àqueles do período controle. Sendo assim, a pressão desenvolvida no VE apresentou-se reduzida nos 35 minutos que se seguiram, indicando a perda da proteção parcial aos efeitos da I/R, outrora conferida pelo DMA.

Para avaliar o efeito do DMA na expressão da NOS, os animais foram tratados com DMA ou veículo 24 e 48 horas antes dos experimentos de *western blot*. Os resultados indicam que 24 horas após o tratamento com DMA ocorreu aumento de cerca de 189% na quantidade de iNOS expressa no miocárdio e que nos corações de ratos tratados

com DMA, com 48 horas de antecedência, ocorreu aumento de cerca de 48% na quantidade de iNOS expressa no miocárdio.

CONCLUSÕES: O composto DMA induziu: 1 - a proteção tardia em corações isolados de ratos; 2 - a maior expressão de óxido nítrico sintetase nos corações de ratos e 3 - esta proteção pode ser dependente de óxido nítrico.

ABSTRACT

Background: —The phenomenon of ischemic preconditioning (IP) is a period of sublethal ischemia that can profoundly protect the cell from infarction during a subsequent ischemic. The cardioprotection has become known “early” and “delayed” ischemic preconditioning. The early cardioprotection provokes the release of several autacoids that trigger protection by occupying cell surface receptors. The delayed cardioprotection confers a new protein synthesis, posttranslational protein modification, and a change in the compartmentalization of existing proteins. Adenosine acts to trigger ischemic preconditioning’s protection. In addition, nitric oxide (NO) has been linked to the trigger and end-effector phases of delayed preconditioning. In the present work, we tested DMA, derived from 4-anilinoquinazolines, described firstly as a tyrosine kinase inhibitor, belonging to EGF receptor family, to test its mechanism of action in the IP.

Objectives: The aims of the present study are: 1 – to evaluate the effect of DMA (4-*N*-(3'-*N,N*-dimethylphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride) in the late delayed IP; 2 – to study the delayed protection of NO synthetase (NOS) induced by DMA.

Results: Wistar rats were once treated with DMA (1,2 mg/Kg, intravenous) or vehicle (DMSO) in the periods of 24 or 72 hours before IP protocols. The IPs were composed by 30 minutes of ischemia and 35 minutes of reperfusion. In the animals treated with vehicle it was observed increasing in the diastolic pressure, and the systolic pressure was maintained in the same level of control. In the animals treated with DMA, it was observed increasing in the diastolic pressure (reperfusion period), but less intense than that observed in the vehicle-treated animals. As the systolic pressure observed in the DMA-treated animals had the same intensity observed in the control period, the developed pressure in the reperfusion period had the same intensity, indicating parcial effect in the IP. To evaluate whether the DMA protection is dependent on NOS, the animals were treated

with L-NAME (30mg/Kg/day, before DMA or vehicle treatment) for 3 days. It was observed in both groups, in the animals treated with L-NAME + vehicle and L-NAME + DMA, that the heart beating recovery was followed by increasing in the diastolic pressure, when compared with the control period. The systolic pressure had the same level observed in the control period, indicating decrease in the partial protection. Finally, to evaluate the effects of DMA in the NOS expression, the animals were treated with DMA or vehicle 24 and 48 hours before western blot assays. In the animals treated 24 hours before DMA administration, it was observed increase (189%) in the iNOS expression. In addition, a 48%-increasing was observed in the animals 48 hours before DMA administration.

Concluding remarks: The effects of DMA observed were: 1 – delayed protection in isolated hearts from rats; 2 – increased expression of iNOS and finally 3 – this protection might be dependent on nitric oxide

INTRODUÇÃO

O suprimento insuficiente de sangue para o miocárdio (isquemia) produz morte celular por necrose (infarto) ou apoptose, ou degeneração associada à disfunção contrátil e instabilidade elétrica dos cardiomiócitos (COX & SUNDT, 1997; FUSTER, 1996). A isquemia do miocárdio, causada por aterosclerose das artérias coronárias, é a principal causa de morbi-mortalidade no mundo ocidental e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, será a maior causa de morte no mundo até o ano 2020 (MURRAY & LOPES, 1997; MYERBURG, 2001).

Em longo-prazo, uma forma efetiva de reduzir a incidência de aterosclerose e suas complicações deve ter base no desenvolvimento de programas de prevenção primária. No entanto, o alcance das medidas de prevenção não atinge os números epidêmicos de portadores de aterosclerose e dos pacientes que sofrem de complicações causadas por esta doença. Portanto, há grande demanda para o desenvolvimento e implementação de formas de tratamento secundário da aterosclerose, bem como das suas conseqüências como o infarto do miocárdio, por exemplo (YELLON & DOWNEY, 2003).

Interferências diretas no processo inflamatório, na função endotelial, na trombogênese e no acúmulo de lípidos na parede das artérias acometidas são as estratégias com possibilidade de sucesso no tratamento da aterosclerose instalada (HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002; SEVER et al., 2003). O tratamento da área que sofre isquemia e infarto tem como meta principal a preservação da viabilidade dos cardiomiócitos isquêmicos. A recuperação do fluxo através de procedimentos invasivos e não invasivos são as alternativas disponíveis para o tratamento de síndromes isquêmicas agudas (YELLON & DOWNEY, 2003). Segundo dados epidemiológicos disponíveis, procedimentos de reperfusão do miocárdio isquêmico

produziram redução de até 50% na mortalidade por infarto agudo do miocárdio, sendo os benefícios estendidos para a morbidade refletida no desenvolvimento de disfunção cardíaca e qualidade de vida após o infarto do miocárdio (BOLLI et al., 2004). Contudo, o sucesso da reperfusão do tecido isquêmico depende da presteza com que é estabelecida após a instalação da isquemia, sendo que, períodos prolongados de isquemia produzem danos irreparáveis ao miocárdio. Além disso, a própria reperfusão produz lesão adicional causada por grande elevação de espécies reativas de oxigênio [e.g., anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila ($\cdot OH$)] devido ao aumento súbito de oxigênio no miocárdio isquêmico, o que também limita a eficácia dos procedimentos de reperfusão (CHAMBERS et al., 1987; CHARLAT et al., 1987; BROW et al., 1998).

Uma estratégia alternativa é a intervenção terapêutica com o objetivo de proteger as células miocárdicas contra os efeitos da isquemia. Dados de estudos experimentais que remontam aos anos 1970 indicam ser possível modificar os danos celulares do miocárdio através de interferências com agentes farmacológicos de diversas naturezas (MAROKO et al., 1971). Posteriormente, verificou-se que as células miocárdicas, como todos os outros tipos celulares do organismo possuem mecanismos endógenos capazes de, uma vez ativados, protegê-las dos efeitos da isquemia, bem como de outros estímulos potencialmente lesivos. No entanto, tentativas de atenuar os danos provocados pela isquemia / reperfusão com agentes farmacológicos têm falhado do ponto de vista de aplicação clínica, apesar do sucesso quando avaliadas experimentalmente (BOLLI et al., 2004). Parte deste insucesso tem sido atribuída à impossibilidade de intervenção ao tempo da instalação da isquemia conseqüente à oclusão das artérias coronárias.

Na década de 1980, Murry e Colaboradores identificaram um mecanismo natural de proteção do miocárdio à isquemia, denominado de pré-condicionamento isquêmico. Este mecanismo é uma resposta adaptativa, na qual a exposição a breves períodos de isquemia aumenta a capacidade do miocárdio em resistir à isquemia prolongada (MURRY et al., 1986), sendo este um fenômeno do tipo tudo ou nada, ou seja, se o estímulo for suficiente para dispará-lo, ele se manifestará em sua totalidade, não sendo mais dependente da intensidade do estímulo (LI et al., 1990).

Apesar de ter sido originalmente descrito como uma adaptação imediata do miocárdio a curtos episódios de isquemia (MURRY et al., 1986), o pré-condicionamento isquêmico foi subsequentemente descrito como sendo um fenômeno bifásico. Uma fase precoce de proteção se desenvolve em minutos após os episódios de isquemia transitórios e tem duração de cerca de 2 a 3 horas. A esta fase de proteção inicial, segue-se um período de vulnerabilidade das células à isquemia semelhante àquela do miocárdio não pré-condicionado com duração de 12 a 24 horas, sendo, então, seguida de uma fase tardia de proteção que se estende por 3 a 4 dias após o estímulo condicionante (KUZUYA et al., 1993; MARBER et al., 1993).

O fenômeno de pré-condicionamento isquêmico é mediado por mecanismos de sinalização celular (BOLLI, 2000; DAWN & BOLLI, 2002; YELLON & DOWNEY, 2003; MURPHY, 2004). O pré-condicionamento agudo se inicia por interações entre agonistas e receptores específicos (em geral GPCRs – *G-protein coupled receptors*) com subsequente ativação de mecanismos de sinalização intracelulares (TONG et al., 2004). Por outro lado, o pré-condicionamento tardio envolve a ativação de um complexo processo de sinalização

que culmina com a síntese e ativação de múltiplas enzimas e efetores protéicos (MARBER & YELLON, 1996; BOLLI, 2000).

Conforme apresentado na Figura 1, os eventos de sinalização envolvidos no pré-condicionamento isquêmico (PCI), podem ser divididos em 3 componentes, a saber: 1) os gatilhos, constituídos por mediadores liberados durante a fase do estímulo condicionante, sendo responsável por iniciar a resposta adaptativa junto a receptores na membrana das células; 2) as vias de sinalização intermediárias mobilizadas pelos gatilhos, sendo constituídas por quinases, moléculas adaptadoras e fatores de transcrição e 3) os efetores do pré-condicionamento, que incluem mecanismos e proteínas envolvidas na mobilização de mecanismos celulares de proteção (BOLLI, 2000).

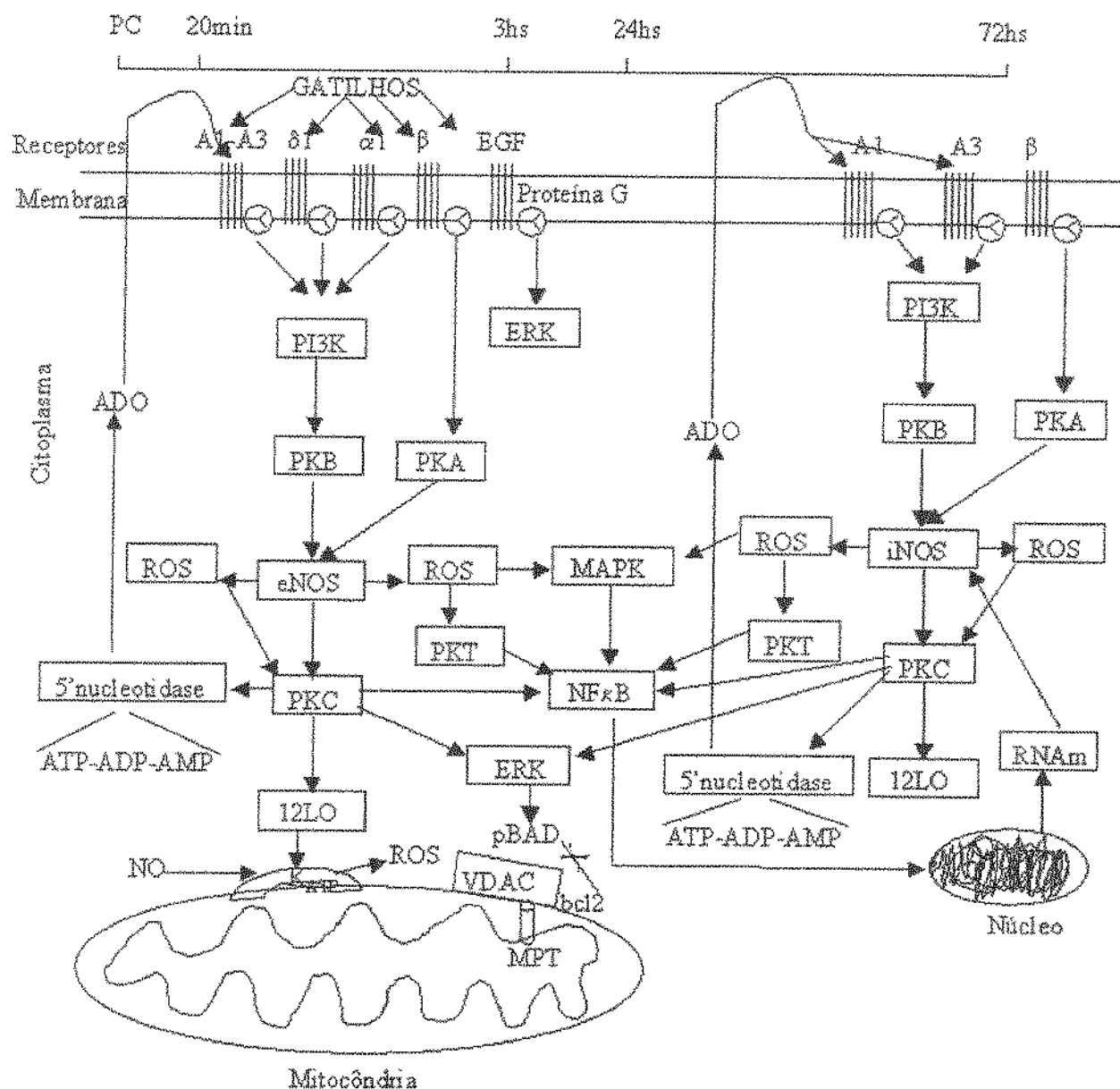


FIGURA 1-Representação esquemática das possíveis vias de sinalizações envolvidas no pré-condicionamento isquêmico (PCI) precoce e tardio. Via de sinalização do PCI precoce: pré-condicionamento disparado pela liberação de ADO, opióides, NO, ROS, norepinefrina, adrenalina, bradicinina e agonistas do fator de crescimento celular (EGF), os quais se associam a GPCRs e iniciam uma cascata de sinalização que envolve a ativação de PI3K, PKB, eNOS, PKC, 12LO, MAPK, PKA, ERK, 5' nucleotidase geração de ROS que interagindo com canais e poros da membrana mitocondrial, levam à proteção do tecido contra injúria por isquemia e, também, a ativação de fator de transcrição gênica (NFκB). A via de sinalização envolvida no PCI tardio: inicia-se com uma maior expressão gênica de proteínas envolvidas no PCI tardio como a iNOS com uma maior produção de NO, reiniciando a mesma via de sinalização do PC clássico.

OS GATILHOS DA PROTEÇÃO MIOCÁRDICA

Diversos hormônios, neurotransmissores e substâncias de liberação local como adenosina (ADO) (LIU et al., 1991), bradicinina (GOTO et al., 1995), opióides endógenos (FRYER et al., 1999), óxido nítrico (NO) (LU et al., 1995; WESELCOUCH et al., 1995; WOOLFSON et al., 1995; NAKANO et al., 2000; POST et al., 2000), espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAINES et al., 1997; TRITO et al., 1997) e norepinefrina (BANERJEE et al., 1993) podem efetuar o gatilho do pré-condicionamento (Figura 1). Por outro lado, a ativação farmacológica dos receptores destes agonistas pode desencadear efeito protetor do miocárdio na ausência de isquemia (BOLLI, 2000; GUO et al., 2000).

Alguns destes fatores (gatilhos) estão envolvidos na ativação de múltiplas vias de sinalização celular, explicando a razão pela qual agentes de diversas naturezas são capazes de desencadear a resposta de proteção (YELLON & DOWNEY, 2003). Em conjunto, os resultados disponíveis indicam que vários receptores associados à proteína G (GPCRs) podem trabalhar em paralelo respondendo ao estímulo do pré-condicionamento, como os de adenosina, norepinefrina, bradicinina e opióides, entre outros (LIU et al., 1991; GOTO et al., 1995; BELL et al., 2000; FRYER et al., 2001; KRIEG et al., 2002). A inibição do sinal gerado por receptores associados à proteína G, pelo tratamento com toxina *pertussis* (PTX) aboliu a proteção por pré-condicionamento isquêmico em coelhos (THOMTON et al., 1993) e em ratos (LIU & DOWNEY, 1993).

Assim, as diversas proteínas de sinalização ativadas por estímulo de receptores associados à proteína G podem estar relacionadas com o fenômeno de proteção do miocárdio, tais como a fosfatidil-inositol 3-OH quinase (PI3K) (NAGA PRASAD et al.,

2001) e a quinase de regulação de sinal extracelular (ERK) (PIERCE et al., 2001). Por outro lado, a importância relativa de cada um dos mediadores no desencadeamento da proteção miocárdica em condições naturais é ainda pouco conhecida, sendo possível que a abundância local e presteza na resposta a estímulos isquêmicos determine o predomínio de um mecanismo sobre outro. Dentre os diversos gatilhos, a adenosina tem recebido atenção especial, não só por sua distribuição generalizada, abundância e participação na regulação local de fenômenos celulares, mas também pela possibilidade de sua utilização ou mesmo de seus agonistas como agentes farmacológicos (GUO et al., 2000; GOMTSYAN & LEE, 2004).

A enzima que catalisa a produção de adenosina, a 5'-nucleotidase que converte AMP em adenosina, é encontrada dentro e fora das células, porém, experimentos com corações isolados de "guinea pigs" mostraram que 92% da produção de adenosina é intracelular assim como o catabolismo, que via adenosina quinase converte adenosina em 5'-AMP e via adenosina deaminase converte adenosina em inosina, também têm suas atividades em maior quantidade no citosol (ARCH and NEWSHOLME, 1978; FISHER and NEWSHOME; 1984; KROLL et al., 1993) como mostra a Figura 2, sendo que o estoque citozólico de adenosina é o 5'-AMP (SCHUTZ et al., 1981; NEWBY et al., 1985; DARVISH et al., 1993) e o S-adenosil-homosisteína (DE LA HABA and CANTONI, 1995; SCHUTZ et al., 1981), toda via, a contribuição dessa última, pela ação da S-adenosil-homosisteína hidrolase, é pequena em relação ao total de adenosina produzida (WAGNER et al., 1994).

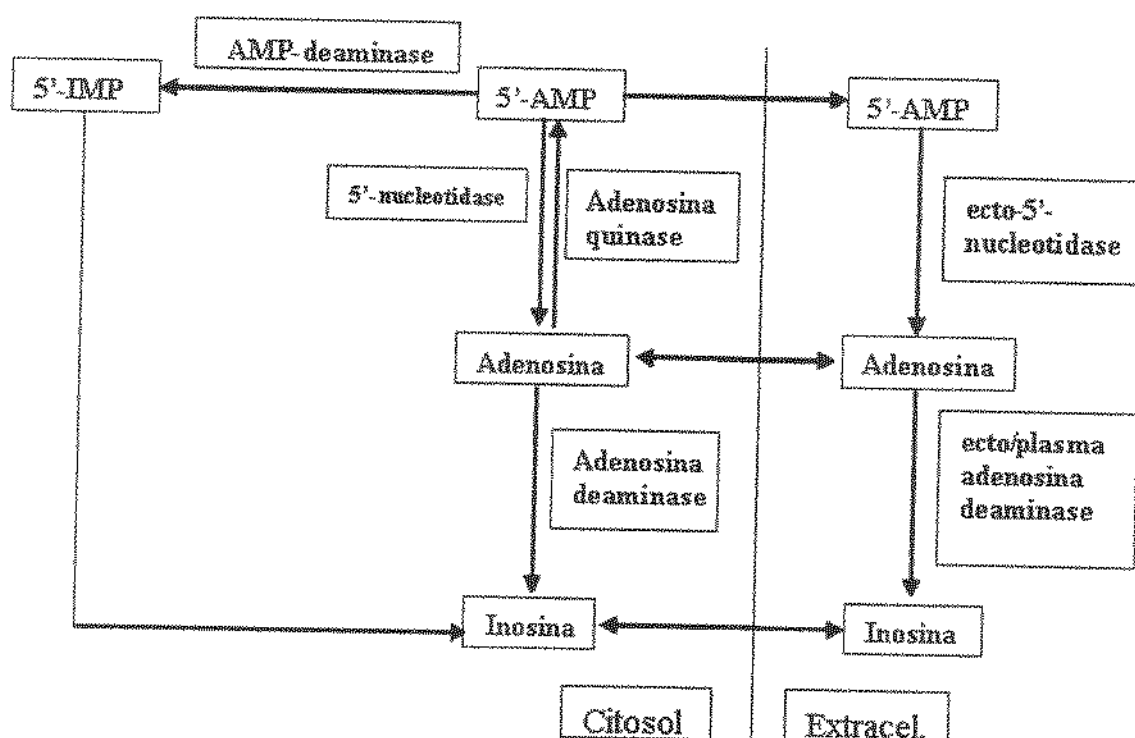


Figura 2-Vias e enzimas envolvidas no metabolismo de adenosina.

Experimentos com imunolocalização mostraram que a 5'-nucleotidase localiza-se principalmente no citosol, lisossomos e membrana plasmática (DARVISH et al., 1993; SALA-NEWBY et al., 1999). Através da quantificação da atividade enzimática de cardiomiócitos de corações de ratos e o efeito da inibição de adenosina deaminase na conversão de adenosina a inosina no coração, verificou-se que sob condições normais de oxigenação o catabolismo de 5'-AMP se dá em maior proporção via AMP-deaminase do que via 5'-nucleotidase (ZOREF-SHANI et al., 1988) porém, com um aumento da degradação de ATP, a desfosforilação de AMP a adenosina, via 5'-nucleotidase, ganha

maior importância (ACHTERBERG et al., 1985; ZOREF-SHANI et al., 1988; DEUSSEN et al., 1989). Um estoque extracelular de adenosina é fornecido pela degradação de 5'AMP por ecto-5'-nucleotidase ativada (FRICK & LOWENSTEIN, 1978; DARVISH et al., 1996).

A atividade de adenosina quinase é restrita ao citosol (SCHUTZ et al., 1981) ao contrário da adenosina-deaminase que é encontrada em atividade associada à membrana plasmática, no líquido intersticial e plasma, além do citosol (SCHRADER et al., 1987, 1994; MARTIN et al., 1995; KOPFF et al., 1997). KROLL e colaboradores usando inibidores específicos da adenosina quinase (iodotubercidina e 5'-amino-5'-desoxiadenosina) e da adenosina-deaminase (eritro-9-hidroxi-mononil-adenina) puderam quantificar a taxa de produção de adenosina além de constatarem que estas são as únicas vias de catabolismo de adenosina (KROLL et al., 1993).

A produção de adenosina durante isquemia total apresentou-se bastante aumentada em corações de ratos devido a um aumento no catabolismo de ATP e conseqüente inibição de adenosina quinase por fosfato inorgânico (MEGHJI et al., 1988; GORMAN et al., 1997), além disso, a adenosina deaminase tem k_m consideravelmente maior do que o da adenosina quinase e, por tanto, esta via encontra-se ativada somente com elevados níveis de adenosina (SCHUTZ et al., 1981). HEADRICK e colaboradores levantaram a hipótese de a produção extracelular de adenosina estar aumentada em condições de hipóxia (HEADRICK et al., 1992).

Os receptores de adenosina apresentam-se em 4 sub-tipos A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 sendo que todos são expressos no miocárdio (AUCHAMPACH & BOLLI, 1999). Em 1991, foi

demonstrado que receptores A1 de adenosina estão envolvidos na mobilização de mecanismos que levam ao pré-condicionamento isquêmico agudo em corações de ratos (LIU et al., 1991). O envolvimento de receptores de adenosina no pré-condicionamento tardio foi demonstrado pela primeira vez em 1994 por BAXTER, YELLON e colaboradores (BAXTER et al., 1994). Eles mostraram ainda a natureza temporal do efeito tardio de agonista de receptor A1 de adenosina, o 2-cloro- N^6 -ciclopentiladenosina (CCPA) (BAXTER & YELLON, 1997) e que este efeito era similar ao observado quando o pré-condicionamento era induzido por isquemia (BAXTER et al., 1997; DANA et al., 2000). O 8-p-fenil-sulfo-teofilina, um antagonista de receptores A1 e A3 de adenosina, anulou a proteção aguda e tardia do miocárdio atribuída ao pré-condicionamento isquêmico (LIU et al., 1991; BAXTER et al., 1994; BAXTER & YELLON, 1997; DANA et al., 1998; AUCHAMPACH et al., 1999; TAKANO et al., 1999).

Camundongos transgênicos, que superexpressam receptor A1 de adenosina no coração, apresentam uma substancial proteção do miocárdio contra a injúria por isquemia / reperusão (MATHERNE et al., 1997; GAUTHIER et al., 1998; YANG et al., 2002). Posteriormente, usando um agonista do receptor A3 de adenosina, o N^6 -3-iodobenziladenosina-5'- N -metilcarboxamida (IB-MECA), também se verificou que os receptores A3 estão envolvidos no disparo do pré-condicionamento isquêmico e que o efeito protetor do IB-MECA foi totalmente abolido com o uso de um antagonista seletivo de receptor A3 de adenosina, o 3-etil-5-benzil-2-metil-6-pentil-4-feniletinil-1,4-(+/-)-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato (MRS 1191) (DOUGHERTY et al., 1998).

GUO e colaboradores apresentaram estudos com camundongos *knock-out* do receptor A3 de adenosina, que exibiram áreas de infarto menores do que aquelas

apresentadas pelos camundongos *wild-type* (GUO et al., 2001). Estes resultados indicaram que os receptores A3 de adenosina também desempenham um importante papel na isquemia aguda do miocárdio destas espécies (TAKANO et al., 2001). Contudo, estas observações não estão em conflito com a idéia de que os receptores A3 de adenosina possam disparar o pré-condicionamento, desde que o papel dos receptores A3 na modulação da injúria durante a isquemia aguda do miocárdio seja distinto daquele que direciona o pré-condicionamento antes da isquemia (TAKANO et al., 2001). No entanto, os resultados obtidos por GUO e colaboradores (GUO et al., 2001) precisam ser confirmados com o uso de antagonista seletivo para os receptores A3 de adenosina, uma vez que o silenciamento da expressão desses receptores pode produzir mudanças compensatórias em outros genes e / ou etapas de sinalização resultantes da proteção da injúria isquêmica (TAKANO et al., 2001; HARRISON et al., 2002).

Em paralelo, outros resultados mostraram que corações isolados de camundongos *knock-out* do receptor A3 de adenosina apresentaram uma melhor recuperação e viabilidade tecidual durante a reperfusão e que a ativação de receptores A3 de adenosina contribui na injúria por reperfusão após a isquemia em corações de roedores, isso devido a uma ação pró-inflamatória desses receptores (CERNIWAY et al., 2001), que estão envolvidos na degranulação de mastócitos (FOZARD et al., 1996; REEVES et al., 1997) e dessa forma, são intermediário dos efeitos deletérios na injúria por isquemia / reperfusão (CERNIWAY et al., 2001).

Resultados obtidos em experimentos com camundongos transgênicos que superexpressam os receptores A1 de adenosina, sugerem que as ações cardioprotetivas da adenosina não são limitadas apenas pela quantidade de adenosina produzida, mas também

pelo número de receptores funcionais expressos no miocárdio (MATHERNE et al., 1997). Entretanto, alguns estudos têm mostrado que a superexpressão dos receptores acoplados à proteína G ou a seus componentes de sinalização podem conduzir à hipertrofia ventricular ou cardiomiopatia dilatada (HUNTER & CHIEN, 1999). BLACK e colaboradores demonstraram que o aumento dos receptores funcionais A3 de adenosina em miócitos de camundongos transgênicos resultou em efeitos benéficos correlacionados à resistência à injúria por isquemia / reperfusão, porém, apresentaram vários efeitos adversos, tais como aumento de massa do coração, bradicardia, hipotensão e disfunção sistólica, mas mantiveram o efeito de redução do tamanho do infarto (BLACK et al., 2002). Estes efeitos adversos podem ser resultados do aumento da abundância dos receptores A3 de adenosina, da magnitude dos efeitos de baixas concentrações de adenosina que estão normalmente presentes no miocárdio e / ou da alteração no equilíbrio estequiométrico entre receptores e proteínas G.

Adenosina e agonistas dos receptores de adenosina têm sido avaliados extensivamente por suas habilidades de atenuar a injúria por isquemia / reperfusão e especificamente limitar o tamanho do infarto (KIS et al., 2003). Estudos recentes têm sido elaborados com o objetivo de investigar o papel dos receptores A2_A de adenosina na proteção do miocárdio usando agonistas e antagonistas tais como o [1S-[1a, 2b, 3b, 4a(S*)]]-4-[7-[[2-(3-cloro-2-tienil)-1-metipropil] amino]-3H-imidazo [4,5-b] piridin-3il] ciclopentano carboxiamida (AMP 579), um agonista de receptor A1 / A2 (SMITS et al., 1998; KIS et al., 2003); o 2-p-(2-carboxietil)-fenetilamino-5'-etilcarboxiamino-adenosina (CGS21680), um agonista seletivo de receptor A2_A (SMITS et al., 1998; KIS et al., 2003; BOUCHER et al., 2004); o 4-(2-[7-amino-2-(2-fúril)[1,2,4] triazolo [2,3-a][1,3,5] triazim-

5-ilamino] etil) fenol (ZM241385), um antagonista específico de receptor A_{2A} (KIS et al., 2003) e o 9-cloro-2-(2-furil)[1,2,4] triazolo [1,5-*c*] quinazolin-5-amina (CGS 15943), um antagonista de receptores A₁ / A₂ (SMITS et al., 1998). Os efeitos de cardioproteção, atribuídos à ativação de receptores A_{2A} de adenosina têm sido relatados em diversos modelos animais, tais como porcos (SMITS et al., 1998; VÄHÄSILTA et al., 2001), coelhos (NORTON et al., 1992; ZHAO et al., 1993; XU et al., 2000, 2001) e cachorros (ZHAO et al., 2001; JORDAN et al., 1997; BUDDE et al., 2000).

Entretanto, as etapas de sinalização molecular que estão envolvidas na proteção do miocárdio disparadas por esses receptores ainda não estão completamente elucidadas (KIS et al., 2003; BOUCHER et al., 2004). BOUCHER e colaboradores atribuem os efeitos de proteção aguda do miocárdio à modulação das atividades das enzimas PI3K e caspase-3. A PI3K é uma enzima que modifica quinases que estão envolvidas no crescimento celular e na síntese de proteínas envolvidas com a sobrevivência celular. Já a caspase-3 é ativada durante a fase inicial da apoptose, contribuindo, desta forma, para a morte celular. Logo, a inibição da caspase-3 durante a reperfusão, contribui para a redução da área do infarto (BOUCHER et al., 2004).

Enquanto que numerosos estudos sustentam a hipótese de que a proteção *in vivo* é mediada via receptor A_{2A} de adenosina, existem poucas evidências para a cardioproteção aguda mediada pelo receptor A_{2B} de adenosina, parcialmente devido à falta de agonistas e / ou antagonistas seletivos e potentes desse receptor (HEADRICK et al., 2003). Dada à baixa afinidade do receptor A_{2B}, é provável que esse somente seja ativado pelas elevações fisiológicas de adenosina. A evidência de que o receptor A_{2B} de adenosina está expresso

em tecido cardiovascular permanece indireta, bem como a sinalização envolvida nas respostas dos receptores A2B de adenosina nesses tecidos. Entretanto, há evidências que os receptores A2B podem regular o remodelamento pós-ísquêmico, via inibição do crescimento de fibroblastos cardíacos, proporcionando um nível de proteção crônica (DUBEY et al., 1997).

Através da ativação e inibição farmacológica de receptores δ_1 -opioides, usando um agonista seletivo de receptores δ_1 -opioides, o TAN-67 e um antagonista seletivo de receptores δ_1 -opioides, o 7-benzilidenenaltrexone (BNTX), demonstrou-se a participação desses receptores no pré-condicionamento isquêmico (SCHULTZ et al., 1998). Situação semelhante foi evidenciada por BANERJEE e colaboradores com relação aos receptores de norepinefrina através de α -receptores em corações de ratos (BANERJEE et al., 1993).

São dignas de nota, as evidências de que existem gatilhos independentes de receptores como aumentos transitórios na concentração de cálcio em perfusatos de corações isolados de rato (MIYAWAKI et al., 1996), hipotermia (YAMASHITA et al., 1998), exercício físico (YAMASHITA et al., 1999) e exposição a etanol (KRENZ et al., 2001).

Óxido nítrico (NO) é um modulador essencial dos sistemas biológicos, incluindo o sistema cardiovascular. Ele é crítico na transdução do sinal da isquemia do miocárdio (MAULIK et al., 1995; DAWN & BOLLI, 2002). A síntese do NO, a partir do substrato L-arginina, é catalisada por três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a neuronal (nNOS ou NOS1), a induzível (iNOS ou NOS2) e a endotelial (eNOS ou NOS3), sendo que as três são encontradas no miocárdio, a eNOS e a nNOS são constitutivas e suas atividades são dependentes da concentração de cálcio e de co-fatores como o tetra-hidrobiopterim (BH_4),

magnésio e NADPH (ANDREW & MAYER, 1999). Por outro lado, a atividade da iNOS é independente da concentração de cálcio e depende de estímulos para sua transcrição gênica (ABU SOUD et al., 2000).

As evidências disponíveis indicam que o NO possui um papel importante na geração e manutenção do pré-condicionamento agudo e tardio do miocárdio. A inibição da enzima NOS pelo antagonista não seletivo L-nitro-arginina (L-NA), aboliu a proteção tardia conferida pelo pré-condicionamento, indicando que o NO gerado durante o pré-condicionamento isquêmico é necessário para disparar este fenômeno de proteção (BOLLI et al., 1997; TAKANO et al., 1998). Por outro lado, o pré-tratamento com inibidores da isoforma induzível da NOS (iNOS), aminoguanidina ou o S-metil lisotioureia, não bloqueou o efeito protetor agudo sobre o órgão, sugerindo que o incremento de NO durante o pré-condicionamento provém das outras isoformas de NOS (XUAN et al., 2000; BOLLI et al., 1997). GUO e colaboradores, através do bloqueio gênico da iNOS, mostraram que esta é um mediador essencial da fase tardia do pré-condicionamento isquêmico (GUO et al., 1999), o que também ficou evidente com o uso de agentes farmacológicos (XI et al., 1999; GUO et al., 2000; ZHAO et al., 2000; SALLOUM et al., 2003).

Em miócitos isolados, o NO é produzido como um resultado do estímulo do receptor δ -opióide (receptor do tipo GPCR) e medeia a cardioproteção induzida por opióides (ZHANG et al., 2002). Outros autores demonstraram que altas doses de morfina induzem uma significativa cardioproteção tardia em camundongos e que a iNOS faz a mediação desse efeito (JIANG et al., 2004). Além disso, a iNOS tem recebido atenção considerável como um disparador e mediador da cardioproteção tardia induzida pelo estímulo patofisiológico ou por agentes farmacológicos. A indução da iNOS tem sido

apontada como desnecessária para o desenvolvimento da proteção tardia em modelos de infarto do miocárdio de coelhos (TAKANO et al., 1998).

Em estudos com animais *knockout* do gene da iNOS, observou-se que o efeito de proteção tardia foi abolido (GUO et al., 1999). Além disso, ficou clara a relação direta entre agonista de receptor A1 de adenosina e a expressão da iNOS na proteção tardia, bem como a falta dessa proteção quando se deletou o gene responsável pela expressão da iNOS (ZHAO et al., 2000).

Em 2001, BELL e YELLON demonstraram, em estudo com corações de camundongos *knockout* para o gene da eNOS, que quatro ciclos de breves períodos de isquemia foram igualmente eficazes para limitar o tamanho do infarto nos corações *knockout* e nos *wild type*, no entanto para um pré-condicionamento menos robusto (dois ou três ciclos) não resultou em proteção dos corações *knockout* da eNOS ao contrário dos corações *wild type* que ficaram protegidos com esse pré-condicionamento (BELL & YELLON, 2001). Os dados sugerem que o NO produzido por atividade da eNOS podem contribuir para disparar / mediar o pré-condicionamento agudo (NAKANO et al., 2000; LU et al., 1995).

De acordo com os resultados disponíveis, propõe-se um modelo regulatório bifásico, no qual a eNOS seria responsável pelo aporte de NO associado à fase aguda e a iNOS o seria durante a fase tardia da proteção. Desse modo, a maior expressão de iNOS, com maior produção de NO, seria a responsável pela manutenção da fase tardia da proteção (BOLLI et al., 1997; 1998; TAKANO et al., 1998; TEOH et al., 2002).

Os mecanismos pelos quais o NO induz a proteção miocárdica são ainda pouco conhecidos. Uma das possibilidades é que a proteção desencadeada pelo NO é mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio. Evidências experimentais indicam que o NO reage rapidamente com O_2^- formando o anion peróxinitrito ($ONOO^-$) o qual é protonado e decomposto, gerando assim, ânion hidróxido (OH^-) ou outros agentes oxidantes igualmente potentes (BECKMAN, et al., 1990; SUN et al., 1993; CROW & BECKMAN, 1995; KODANI et al., 2000), sugerindo que esta via pela qual o NO dispara a resposta protetora, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tem participação na ativação de proteína-C quinase (PKC) (TAKANO et al., 1998; BANERJEE et al., 1999, PING et al., 1999a), de proteínas tirosina quinases (PKTs) (XUAN et al., 2000) e na abertura do canal mitocondrial de potássio ATP dependente (canal mitoK_{ATP}) (KIRSCH et al., 1990; EDWARDS & WESTON, 1994). SUN e colaboradores, usando antioxidantes em porcos provocaram o desaparecimento da proteção e foram os primeiros a propor que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o pré-condicionamento isquêmico é essencial para disparar a proteção (SUM et al., 1996).

OS MEDIADORES INTRACELULARES DA PROTEÇÃO MIOCÁRDICA

O fenômeno de proteção do miocárdio se inicia através da ativação de receptores ligados à proteína G, que leva a uma via de sinalização envolvendo a modulação da atividade de mediadores intracelulares como a fosfatidil-inositol 3-OH quinase (PI3K) (NAGA PRASAD et al., 2000), proteína quinase mitogênica ativada (MAPK), proteína C quinase (PKC) e canais mitocôndrias de potássio ATP dependentes (canal mitoK_{ATP}) (SASAKI et al., 2000).

O estímulo do receptor por agonistas ativa a via de sinalização da PI3-quinase que pode, ainda, ter sua ativação independente de receptores, por ação de ROS (QIN & CHOCK, 2003). Pesquisadores, usando o *wortmannin*, um inibidor de PI3K, constataram que a proteção era atenuada, mas não abolida por completo, evidenciando o comprometimento da PI3K com a via de sinalização do pré-condicionamento (BAINES et al., 1999; TONG et al., 2000; MOCANO et al., 2002).

O principal alvo da PI3-quinase é a proteína quinase B (PKB), que está envolvida na via de sobrevivência celular ou anti-apoptótica. No entanto, a fosforilação da PKB, por si só, não é suficiente para promover a proteção do miocárdio (TONG et al., 2003). Nessa sequência, a NOS é fosforilada pela PKB e PKA (proteína A quinase), em resíduos de serina (BOO & JO, 2003), alterando a biodisponibilidade de óxido nítrico (SCHEID & WOODGETT, 2001). Mecanismos envolvendo a via da PI3K e o aumento nos níveis citoplasmático de cálcio com conseqüente ativação da calmodulina que se liga a NOS fosforilada, promovem o alinhamento dos domínios oxigenase e redutase da NOS para a síntese de NO (CHEN et al., 1999; DIMMELER et al., 1998; FLEMING et al., 2001; FULTON et al., 1999; SIMONCINI et al., 2000; HAYNES et al., 2000; HARRIS et al., 2001; IGARASHI & MICHEL, 2001; MORALES et al., 2001; MICHAEL et al., 2002; LIN et al., 2003). O nicotinamida-adenina dinucleotideo-fosfato na forma reduzida (NADPH) e a L-arginina são os substratos da NOS, o primeiro liga-se à porção C-terminal (domínio redutase) e o último na porção N-terminal (domínio oxidase) da enzima e a reação ocorre, utilizando-se moléculas de oxigênio, formando NO e L-citrulina (GRIFFITH & STUEHR, 1995). Como já vimos, o NO desempenha um importante papel no desenvolvimento e manutenção da proteção, através da produção de ROS e modulação da

abertura do canal mitoK_{ATP} (SASAKI et al., 2000), atuando como gatilho da proteção tardia (BOLLI et al., 1997; TAKANO et al., 1998; HILL et al., 2000).

Na sequência dessa via de sinalização, temos a enzima considerada passo chave, a proteína quinase C (PKC). O NO é responsável pela translocação e ativação da PKC através de uma direta modificação oxidativa por ação de espécies reativas de oxigênio, geradas pelo NO, ou por ativação de fosfolipases que levam à produção dos cofatores lipídicos da PKC (PING et al., 1999a). O papel da PKC é fundamental nessa via de sinalização porque ela ativa a 5'-nucleotidase, que converte adenosina tri-fosfato (ATP), adenosina di-fosfato (ADP) e adenosina mono-fosfato (AMP) em adenosina e dessa forma é considerada a memória do pré-condicionamento (KITAKASE et al., 1994), como mostra a figura 1 (pagina 25).

A PKC também está diretamente envolvida com a ativação do fator de transcrição gênica NF- κ B (BAINES et al., 2001); atua sobre efetores finais da proteção através da formação de complexo com componentes do poro de transição de permeabilidade da mitocôndria (BAINES et al., 2003); participa da ativação da quinases de sinal de regulação extracelular (ERK) (PING et al., 1999a) e, ainda, forma um complexo com 12-lipoxigenase (12-LO) para a modulação da abertura do mitoK_{ATP} (PIOMELLI & GREENGARD, 1990; CHEN et al., 1999).

Outra família de proteínas envolvida nessa via é a das tirosinas quinases (PKT), são enzimas que catalisam a transferência de fosfatos de ATP para resíduos tirosina específicos, ou seja, se auto-fosforilam e / ou fosforilam um substrato (OSHEROV et al., 1994; WARD, 1994). Dois tipos de proteínas tirosina quinases, as Src e as Lck PTKs têm participações no pré-condicionamento comprovadas pela inibição com lavendustin A (LD-A) que aboliu

completamente o pré-condicionamento (IMAGAWA et al., 1997; PING et al., 1999; DAWN et al., 1999). Estudos posteriores demonstraram que Lck PTK é um substrato direto de PKC ϵ demonstrando sua ativação por PKC (BOLLI et al., 1997; SONG et al., 2000).

A superfamília das proteínas quinases mitogênicas ativadas (MAPK), que incluem três maiores subfamílias: as p44/p42 MAPKs (ou quinases de sinal de regulação extracelular [ERKs]), a p38 MAPKs, e a p46/p54 MAPKs (ou c-jun N-terminal quinase [JNKs]); são outros potenciais alvos dependentes da PKC ativada, envolvidas no pré-condicionamento. (PING et al., 1999b).

A proteína quinase A (PKA) representa outra importante via de sobrevivência celular, o que ficou demonstrado com o uso de inibidores de PKA, o N-[2-(4-bromocinamilamina) etil] 5-isoquinolina (H89) e o adenosina 3'5'-monofosforotioato cíclico Rp-isômero (Rp-cAMP), que reduziram a proteção conferida aos corações de cachorros submetidos ao pré-condicionamento isquêmico (SANADA et al., 2004). Sua ativação, através de β -adrenoceptores (receptores do tipo GPCR), é independente da via da PI3K (LOCHNER et al., 1999; SANADA et al., 2001) e seu papel na proteção miocárdica, além de participar da ativação da NOS (BOO & JO, 2003), e o de inibição momentânea da ativação da Rho-A e Rho-quinase (MANGANELLO et al., 2003), impedindo a formação de fibras de tensão, adesão focal, migração celular e citocineses, sendo que a desativação da polimerização de fibras de tensão é a maior contribuição desse mecanismo na cardioproteção (SHIMOKAWA, 2002).

A ERK é uma importante enzima envolvida com a sobrevivência celular podendo ser ativada via receptores denominados “fator de crescimento celular” (EGF), que também

são do tipo associados à proteína GPCRs (TONG et al., 2003), ou pela PKC (PING et al., 1999a). Ela desempenha um importante papel na modulação da abertura do canal de potássio ATP - dependente da mitocôndria (SATO et al., 1998) e na fosforilação e inativação de BAD, impedindo, assim, que esta sequestre bcl2 (uma proteína anti-apoptótica) (BAINES et al., 2002).

Essas vias de sinalização levam à transcrição gênica e produção de proteínas relacionadas com a fase tardia do pré-condicionamento. O primeiro elemento regulatório transcricional identificado como um componente da resposta tardia do pré-condicionamento foi o fator nuclear kB (NF-kB), considerado um modulador da expressão de genes ligados à produção de iNOS, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e aldose redutase. Resultados revelaram que o pré-condicionamento isquêmico induz uma rápida ativação de NF-kB, a ativação do NF-kB aparece por uma via comum, através da qual múltiplos sinais (NO, ROS, PKC e PTKs) produzidos pelo estresse isquêmico atuam na indução de expressão gênica no coração; e que este evento pode ser mimetizado pela infusão de doadores de NO. A inibição de NF-kB com dietil-ditio-carbamato aboliu completamente a proteção tardia, indicando que NF-kB tem um papel crítico na proteção tardia por pré-condicionamento isquêmico do miocárdio (XUAN et al., 1999).

OS EFETORES FINAIS DA PROTEÇÃO MIOCÁRDICA

Sabe-se pouco sobre os efetores finais da proteção miocárdica induzida seja por pré-condicionamento isquêmico, seja por agentes farmacológicos. Existem algumas hipóteses, dentre as quais a mais antiga foi proposta por MURRAY e colaboradores, que sugerem a

existência um melhor balanço energético no miocárdio submetido ao estímulo condicionante em consequência da inibição da adenosina tri-fosfato quinase (ATPase) mitocondrial (MURRAY et al., 1990). No entanto, evidências mais recentes indicam que o efeito favorável observado no balanço energético no miocárdio pré-condicionado pode não ter a magnitude necessária para suplantiar o déficit inicial causado pela isquemia condicionante (KOLOCASSIDES et al., 1996). Os canais de potássio da membrana mitocondrial (mitoK_{ATP}) são também candidatos a efetores da resposta de proteção miocárdica seja por pré-condicionamento isquêmico, seja por agentes farmacológicos. O diazóxido, um agente farmacológico capaz de abrir canais mitoK_{ATP}, induz proteção miocárdica e o 5-hidroxidecanoato, um inibidor da abertura de canais mitoK_{ATP}, extingue a proteção induzida por diazóxido como também àquela induzida por pré-condicionamento isquêmico (OHNO et al., 1998; BINES et al., 1999; BERNARDO et al., 1999; TAKANO et al., 2000).

Considera-se que os canais mitoK_{ATP} devem abrir durante o período de isquemia em corações pré-condicionados, no entanto a maneira pela qual a abertura dos canais mitoK_{ATP} protege o miocárdio da isquemia ainda não está esclarecida. A abertura dos canais mitoK_{ATP} causa desacoplamento da cadeia respiratória e edema mitocondrial, eventos que poderiam estar associados à proteção miocárdica (GARLID, 2000; FLEURY et al., 2002; MONCADA e ERUSALIMSKY, 2002; UEDA et al., 2002). É possível que a abertura dos canais mitoK_{ATP} previna a abertura dos poros mitocondriais de transição (HAUSENLOY et al., 2002). Por outro lado, a abertura do canal mitoK_{ATP} causa inibição da captação de cálcio pela mitocôndria, já que causa despolarização da membrana interna (HOLMUHAMEDOV et al., 1999). Este efeito poderia impedir a liberação de fatores

mitocondriais pró-apoptóticos já que um aumento na captação de íon cálcio (Ca^{2+}) leva à abertura do poro pro-apoptótico Bax (BASANES et al., 2001; EPAND et al., 2002a, b) e do poro de transição de permeabilidade (MPT) (BAFFY et al., 1993; SZALAI et al., 1999; PU e CHANG, 2001; VANDEN ABEELE et al., 2002).

Recentemente surgiram evidências de que o pré-condicionamento previne a abertura do poro de transição de permeabilidade (MPT). Demonstrou-se que a proteção conferida por agonistas dos receptores de adenosina, poderia ser bloqueada por actractilósida que abre o poro de transição de permeabilidade (HAUSENLOY et al., 2002). O MPT está associado ao canal aniônico voltagem dependente (VDAC) e a abertura desse poro, durante a isquemia, leva a um equilíbrio iônico entre a matriz da mitocôndria e o citosol, o que acarreta uma perda de potencial de membrana, desacoplamento da cadeia respiratória, inchamento osmótico e ruptura da mitocôndria (ZAMZAMI & KROEMER, 2001). A PKC e a ERK impedem a abertura desse canal em corações pré-condicionados (BAINES et al., 2002, 2003).

O canal aniônico voltagem dependente (VDAC) é composto por proteínas abundantes na membrana externa da mitocôndria, ele age em associação com o transportador de nucleotídeos de adenina, transportando ADP, ATP e outros nucleotídeos de adenina para dentro e para fora da mitocôndria. Proteínas anti-apoptóticas do tipo bcl-2 podem inibir a abertura do VDAC (IMAHASHI et al., 2003), e animais transgênicos que superexpressam bcl-2 no coração apresentaram redução de morte de cardiomiócitos depois de isquemia e reperfusão. (CHEN et al., 2001; CHATTERJEE et al., 2002). Este canal (VDAC) estando fechado impede o ATP de deixar a mitocôndria, e a conservação dos níveis de ATP previne o processo apoptótico (IMAHASHI et al., 2003). Já a associação

desse canal com proteínas pró-apoptóticas do tipo BAX promove a liberação de citocromo C, desse modo as bcl-2 se opõem à liberação de citocromo C se ligando e sequestrando proteínas pro-apoptóticas (CHENG et al., 2001) ou se ligando a VDAC e bloqueando, desse modo, a formação ou aberturas de vias de liberação de citocromo C. (SHIMIZU et al., 1999, 2000).

Efetores finais ligados à manutenção da estrutura e maquinaria energética da mitocôndria, tais como o mitoK_{ATP}, o MPT e o VDAC, são comuns a ambas as fases da proteção miocárdica (precoce e tardia) induzida por pré-condicionamento isquêmico ou por agente farmacológico, já sistemas enzimáticos sujeitos a uma maior expressão através da ativação de fatores de transcrição gênica, são mais preponderantes na fase tardia da proteção, apesar de também exercem um papel importante na fase precoce, destacando-se, aqui, os sistemas anti-oxidantes superóxido desmutase (SOD) e ciclooxygenase-2 (COX-2) (YELLON & DOWNEY, 2003).

Os sistemas antioxidantes são grupos de enzimas que também apresentaram aumento de sua transcrição gênica e de atividade induzidas pelo pré-condicionamento isquêmico. No coração elas formam três sistemas de enzimas; as superóxido desmutase (SOD); catalase e glutathione peroxidase (YELLON & DOWNEY, 2003). AS SOD são metaloenzimas responsáveis pela diminuição de O₂⁻. HOSHIDA e colaboradores foram os primeiros que demonstraram um aumento na atividade de manganês super-óxido desmutase (Mn-SOD) em miocárdio pré-condicionado. Este aumento na atividade foi perdido após 3 horas e reapareceu 24 horas após o pré-condicionamento isquêmico. Estudos mostraram que oligonucleotídeos antisense contra MnSOD abolia a proteção, evidenciando o importante papel dessas enzimas na proteção tardia (HOSHIDA et al., 1993; YAMASHITA

et al., 1994, 2000). DANA e colaboradores mostraram que a atividade de MnSOD estava aumentada 24 horas após tratamento com agonista de receptor A1 de adenosina (CCPA) que foi atenuado com pré-tratamento com inibidores de PKC e proteína tirosina quinase (PKT) (DAMA et al., 2000).

Quanto ao sistema antioxidante COX-2, demonstrou-se que vinte quatro horas após o pré-condicionamento isquêmico, em coelhos, houve um aumento na expressão de COX-2. A prévia administração de inibidores de COX-2, o 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenosulfonamida (celecoxib) e o N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida (NS398), aboliu o pré-condicionamento tardio (GUO et al., 2000; SHINMURA et al., 2000). Outros pesquisadores trabalhando com camundongos *knockout* para COX 1 e 2, comprovaram esses resultados (CARMITA et al., 2001). Recentes evidências apontam para uma relação entre iNOS e a modulação da atividade de COX-2 no coração de coelhos (SHINMURA et al., 2002).

Caso o pré-condicionado não possa alterar as forças osmóticas trans-membrana em cardiomiócitos, ocorre uma modificação no citoesqueleto para melhorar a resistência ao inchamento. A teoria de que o citoesqueleto de cardiomiócitos pré-condicionados fica mais resistente à pressão osmótica durante a isquemia, baseia-se na hipótese de que a fosforilação da p38 MAPK causa a fosforilação de proteínas *small heat shock* hsp27, que causa a montagem de novos filamentos de actina no citoesqueleto (GUAY et al., 1997).

DERIVADOS DE ANILINOQUIAZOLINAS

Derivados de 4-anilinoquinazolininas são amplamente descritos na literatura como inibidores potentes e seletivos da atividade tirosina quinases da família de receptores EGF (FRY et al., 1994; LEVITZKI et al., 1999). Além disso, o conhecimento do processo de inibição dessas enzimas parece ser o caminho para a terapia de muitas doenças, tais como câncer, “psoríasis”, diabetes, doenças cardiovasculares, etc. (FRY et al., 1994). A partir dessa evidência, surgiram estudos mais detalhados sobre a função biológica de uma série de derivados dessa classe estrutural (REWCASTLE et al., 1996; BRIDGES et al., 1996; SMAILL, 2000).

Os estudos com derivados de quinazolininas não têm se limitado apenas à investigação da atividade da tirosina quinase da família do receptor EGF (SMAILL et al., 2000). O prazosin é uma quinazolina com propriedades antagonistas de receptores α -adrenérgicos. Este composto tem efeito vasodilatador, sendo utilizado na terapêutica anti-hipertensiva, assim como alguns de seus derivados estruturais como o ciclazosim, que possui uma afinidade maior para os receptores α_1 -adrenérgicos e tem aplicação no tratamento da hiperplasia prostática benigna (MINARINI et al., 1998). Outro bom exemplo é o 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD153035) para uso no tratamento de doenças da pele, tais como “psoríasis” e câncer de pele (McMAHON et al., 1998). Enquanto que outros exemplos de quinazolininas biologicamente ativas são aqueles apresentados como inibidores potentes e específicos para a fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5) (UKITA et al., 2001). Esta enzima é altamente específica na hidrólise do nucleotídeo cíclico guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), que controla funções vasculares (CORBIN et al., 1999). Logo, um inibidor que eleva o nível de cGMP no

interior das células é considerado um fármaco potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, angina e insuficiência cardíaca (UKITA et al., 2001).

A adenosina, através da ativação de receptores específicos de membrana (i.e. A_1 e A_3), ativa mecanismos celulares envolvidos na proteção do miocárdio contra a agressão isquêmica, tanto aguda quanto tardia (Yellon, 2003). Compostos derivados de quinazolininas com propriedade inibidora de adenosina quinase provocam aumento na concentração celular de adenosina (Dados não publicados do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular) e o dimetóxi-amino-quinazolina (DMA), um composto quinazolinico com atividade inibidora de adenosina quinase comprovada foi capaz de induzir a proteção aguda do miocárdio (Marim, 2003).

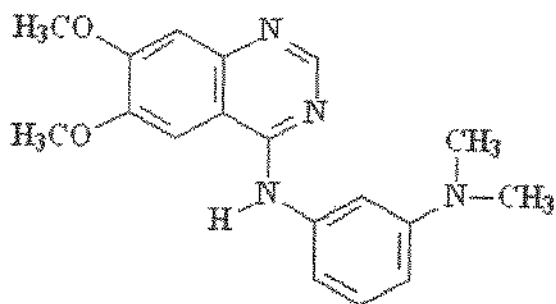
OBJETIVOS

- 1- Avaliar o efeito de composto derivado de anilinoquinazolinas DMA (Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina) com propriedades inibidoras de tirosina quinase, como indutor de proteção tardia contra danos da isquemia sobre corações isolados de ratos.
- 2- Avaliar a participação de óxido nítrico sintase (NOS) na proteção tardia induzida pelo composto DMA em corações isolados de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Composto quinazolinico

O derivado quinazolinico foi sintetizado pela Dra. Silvana Rocco do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Utilizamos o composto DMA – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-*N,N*-dimetilfenil) aminoquinazolina (Figura 2).



DMA

Figura 03-Estrutura química do composto quinazolinico, DMA (Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-*N,N*-dimetilfenil) aminoquinazolina), utilizado.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando de 200 a 250g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

Sistema de perfusão de coração isolado (técnica de Langendorff)

O sistema de perfusão de coração isolado é constituído com um sistema cata-bolhas de vidro e envolvido por jaqueta de água conectada a um termo-circulador de água para aquecimento do tampão de perfusão a 37°C, como indicado no esquema da Figura 03.

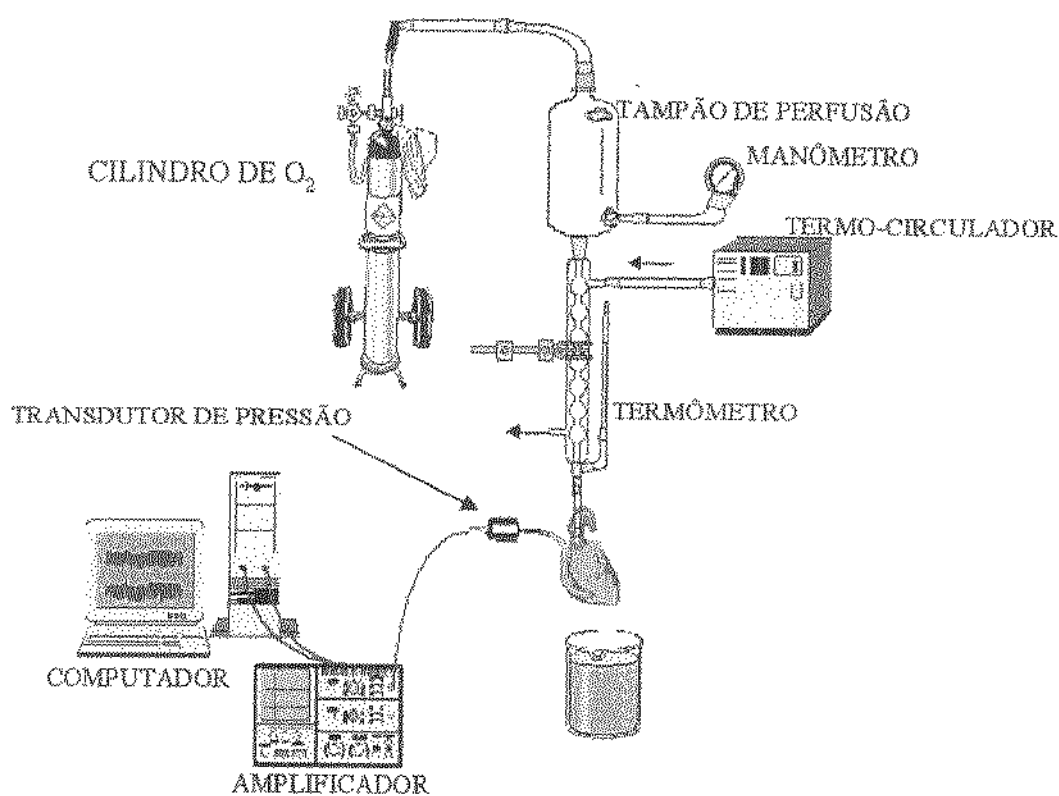


Figura 04- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.

A extremidade superior do cata-bolhas é conectada a um reservatório constituído de um frasco de Mariotti contendo a solução tampão de perfusão. Neste reservatório, o tampão é oxigenado com O₂ a 100% com fluxo controlado de forma a manter a pressão no frasco próxima a 70 mmHg. A extremidade inferior do cata-bolhas é conectada a uma cânula de vidro que por sua vez, é conectada à artéria aorta em sua porção ascendente para perfusão retrógrada das artérias coronárias. No ventrículo esquerdo é introduzido um pequeno balão de látex preenchido com salina e conectado a uma seringa para controle de seu volume e também a um transdutor de pressão para registro contínuo da pressão intraventricular.

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Pentobarbital Sódico (80 mg/kg) e receberam injeção intraperitoneal de heparina sódica (1000 UI). Os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C, intubados por via orotraqueal com tubo plástico de Gelco^R e submetidos à ventilação controlada com ventilador Harvard e ar enriquecido com oxigênio a 100%. A temperatura corpórea e a ventilação permaneceram controladas durante o período de retirada do coração da cavidade torácica.

A cavidade torácica foi aberta através de secção sagital do esterno; a aorta ascendente foi identificada, seccionada e conectada ao sistema de perfusão, onde foi fixada com fio de algodão 3.0, sendo iniciada imediatamente a perfusão com solução tampão de HEPES: Tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) 20 mM, NaCl 137 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,5 mM e glicose 6 mM, com pH 7,4, acrescentando insulina (100 UI), xilocaína (1000 UI) e heparina (1000 UI), enriquecido com 100% de oxigênio a uma pressão hidrostática de 70 mmHg e temperatura a 37°C.

Sistema de registro e monitoração da pressão intraventricular

A monitoração da pressão intraventricular esquerda foi realizada com balão de látex, inserido no ventrículo esquerdo (VE) através do átrio esquerdo (AE). Este cateter foi conectado a um transdutor de pressão (COBE, ARVADA, USA) para registro contínuo de pressão intraventricular. Para tanto, utilizou-se sistema de registro Dataq (USA) com programa de aquisição e análise Windaq PRO.

O sinal da onda de pulso da pressão foi amplificado em amplificador GP4A Steamtech, USA, convertido em sinal digital (frequência de amostragem de 300 Hz) em uma placa analógico-digital e gravado em computador para análise posterior. A onda de pressão ventricular foi analisada quanto ao pico máximo (Pressão Sistólica), nadir (Pressão Diastólica), derivado da pressão pela derivada do tempo ($\pm dP/dT$) e frequência cardíaca.

Protocolos

Protocolo 1: Avaliação do efeito tardio do DMA no miocárdio submetido à isquemia e reperfusão.

Os corações foram isolados, conectados ao sistema de perfusão com a pressão diastólica ajustada por volta de 5 mmHg e submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Após um período de 15 minutos de estabilização registramos 10 minutos de período controle, seguido de um período de 30 minutos de isquemia provocada por interrupção do fluxo coronário. Depois de terminado este período, o coração foi reperfundido e a pressão ventricular esquerda, registrada por mais 35 minutos. Para avaliar os efeitos do composto DMA na proteção tardia contra os danos da isquemia / reperfusão

no miocárdio, realizamos experimentos tardios em 24, 48 e 72 horas depois da infusão de DMA na dose de 1,2 mg/kg de peso do rato, preparada a partir de uma “solução mãe” 5 mM de DMA em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,4; em quantidade suficiente para 1 mL, que foi infundida em 1 hora através da veia jugular previamente canulada ou DMSO em quantidades relativas às dos grupos tratados com DMA, diluído em solução de tampão de fosfato (PBS), pH 7,4, para os grupos controles. Os parâmetros analisados foram a pressão diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo, frequência dos batimentos cardíacos e derivada da pressão pela derivada do tempo ($\pm dP/dT$).

Protocolo 2: Inibição de Óxido Nítrico Sintase por N ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster

Administramos cloridrato de N ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) na dose de 30 mg/kg de peso do animal, na água diária dos ratos, por três dias, após os quais os ratos foram canulados na veia jugular e infundidos com DMSO diluído em PBS pH 7,4 para os controles ou com DMA na dose de 1,2 mg/kg de peso do animal, em DMSO e diluído em PBS pH 7,4, continuaram tomando L-NAME por 24 ou 48 horas. Após esse período, os corações foram retirados e submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão. Os parâmetros analisados foram: pressão ventricular esquerda, frequência cardíaca e $\pm dP/dT$.

Protocolo 3: Avaliação do efeito do DMA sobre a expressão de Óxido Nítrico Sintase (NOS).

Para avaliar os efeitos do composto DMA na expressão de NOS, realizamos experimentos com DMA na dose de 1,2 mg/kg, preparada a partir de uma “solução mãe” 5 mM de DMA em DMSO e diluídas em PBS pH 7,4 (e seus respectivos controles), em quantidade suficiente para 1 mL que foi infundida em 1 hora através da veia jugular previamente canulada. Os corações foram retirados, homogeneizados e seus extratos totais foram obtidos em solução de extração composta de Trisma base (hidroximetil amino metano) 100 mM, pH 7,5; EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; fluoreto de sódio 100mM; ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) 2 mM (diluído em álcool etílico); Triton X100 1%; aprotinina 1,1 mg/mL. Avaliamos a expressão de NOS por immunoblotting, em tempos de 24 e 48 horas depois do tratamento.

Análise de proteína por immunoblotting.

Os extratos totais foram tratados com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e sódio-dodecil-sulfato 10%), acrescido de ditiotreitol 100 mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Após este procedimento, ambos os extratos foram submetidos a eletroforese em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida a 10% e 12%, em aparelho de eletroforese da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories), a 30 V até passar o gel de empacotamento e depois aumentando gradativamente até 120 V. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho

da Bio-Rad. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução de 10 mM Tris, 150 mM de NaCl, e 0.02% de Tween 20, acrescida de 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente, de modo a reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários à membrana. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com a mesma solução por 10 minutos cada, e incubadas com 10 µg de anticorpos primários específicos (anti-NOS2 da Santa Cruz), diluídos em solução Tris, contendo 3% de leite em pó desnatado, por 12 horas a 4°C sob agitação. Após lavagem por 30 minutos em solução basal (três vezes por 10 minutos), às membranas foi adicionado bride, que é uma ponte para o anticorpo secundário com peroxidase (da KPL), em solução de leite 3% em basal à temperatura ambiente por duas horas. As membranas foram lavadas novamente por três vezes de 10 minutos com solução de leite desnatado a 3%, foi adicionado o anticorpo secundário com peroxidase por uma hora e trinta minutos e novamente repetimos a lavagem com leite desnatado. Adicionamos as soluções do kit de quimiluminescência, uma contendo o peróxido de hidrogênio e a outra o luminol, onde a reação com a peroxidase do anticorpo formou um produto oxidado com liberação de energia luminosa que foi detectada por auto-radiografias em filmes Kodak XAR, com intensificadores Cronex Lightening Plus, a -80°C por 12-48 horas. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria óptica, utilizando um scanner (HP3400) e o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA).

Análise Estatística

O InStat (GraphPad Software) foi utilizado para as análises estatísticas. Diferenças entre valores médios foram testadas com ANOVA de duas vias, sendo o teste pós “hoc” o de Bonferroni e teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

Efeito do DMA sobre corações isolados submetidos à isquemia e reperfusão.

No presente estudo, avaliamos se o DMA, um composto quinazolinico com atividade inibidora de adenosina quinase comprovada e indutor de proteção aguda do miocárdio (Marim, 2003) é também capaz de induzir proteção tardia à agressão isquêmica do miocárdio. Assim, ratos foram tratados com doses únicas de DMA (1,2 mg/kg) ou veículo (DMSO), via endovenosa, e após períodos que variaram entre 24 e 72 horas seus corações foram isolados e submetidos a protocolo de isquemia / reperfusão.

Na Figura 5 estão representados exemplos típicos de registros de pressão do ventrículo esquerdo dos corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Nos corações de ratos tratados com veículo a isquemia provocou a parada e com a reperfusão houve recuperação dos batimentos, com aumento significativo da pressão diastólica do ventrículo esquerdo relativo àquela do período controle, enquanto que a pressão sistólica atingiu níveis semelhantes àqueles do período controle. Sendo assim, a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo apresentou-se bastante reduzida nos 35 minutos que se seguiram (reperfusão), nos corações de ratos tratados com veículo. Nos corações de ratos tratados com DMA, a reperfusão também foi acompanhada de aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo, no entanto, com menor intensidade que aquele observado em corações de ratos tratados com veículo. Como a pressão sistólica atingiu níveis semelhantes aos do período controle, a pressão desenvolvida pelos corações de ratos tratados com DMA foi maior que aquela dos corações de ratos tratados com veículo, indicando proteção parcial aos efeitos da isquemia / reperfusão.

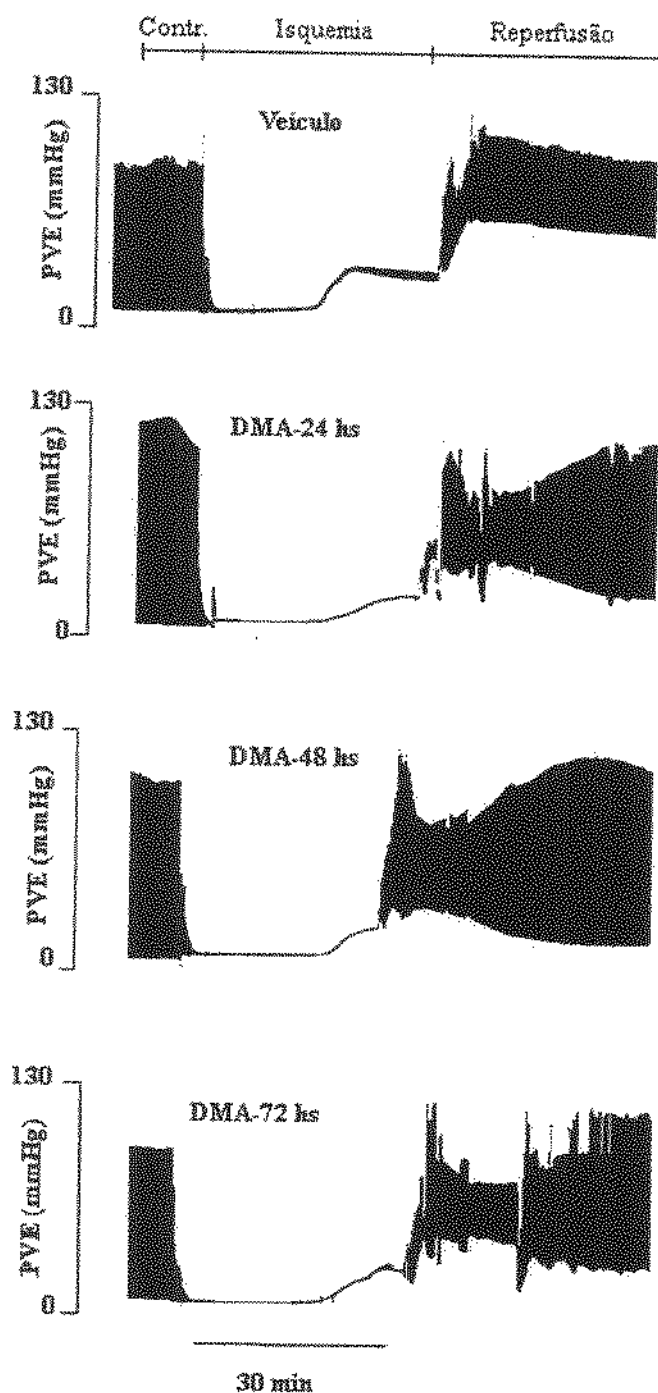


Figura 5 -Exemplos de registros de pressão do ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos tratados com veículo ou DMA (1,2 mg/kg) 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

Na Figura 6 estão representados os valores médios de pressão diastólica do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo 24; 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Ao final do período de 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24, 48 e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão apresentaram uma diminuição na pressão diastólica do ventrículo esquerdo, respectivamente de 55% (23 vs 42 mmHg), 33% (16 vs 49 mmHg) e 61% (34 vs 56 mmHg), relativa às pressões diastólicas registradas nos animais tratados com veículo no mesmo período que os animais tratados com DMA.

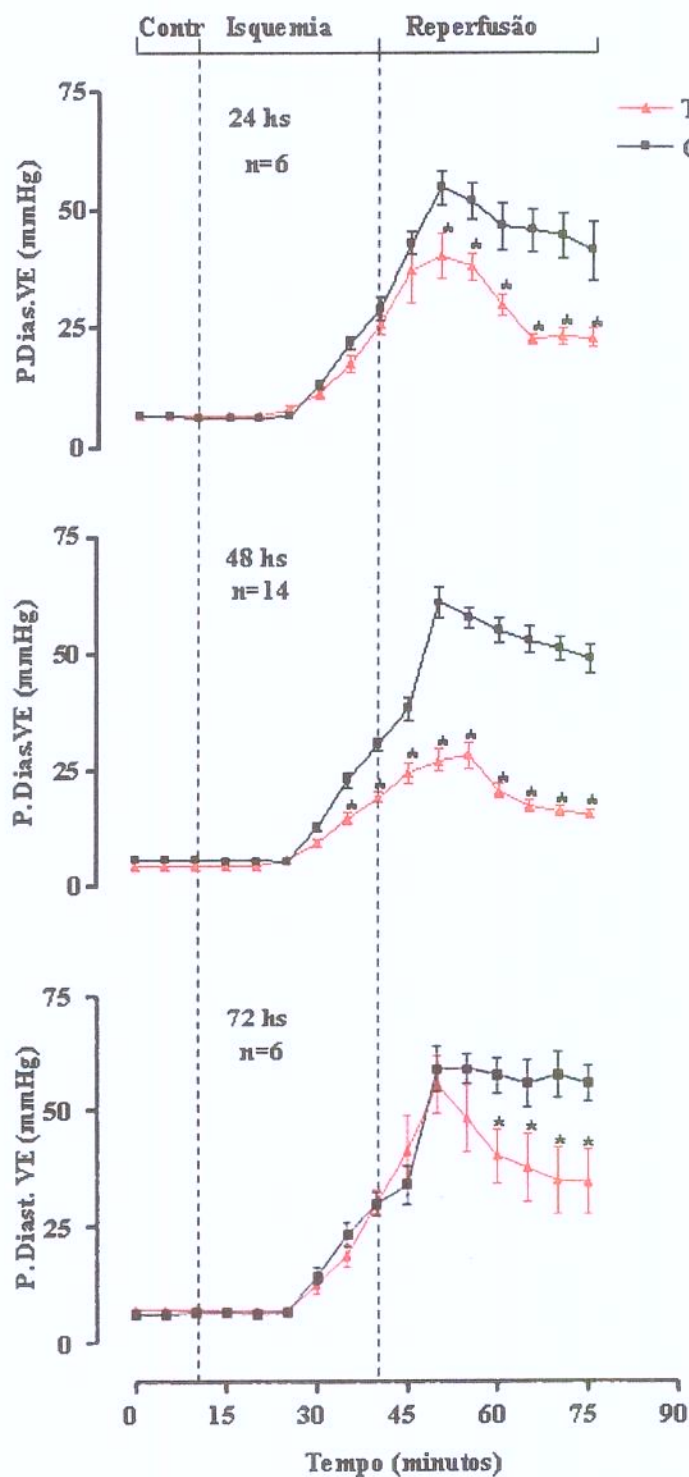


Figura 6-Gráficos representativos (tempos individuais) do efeito do DMA sobre a pressão diastólica ventricular esquerda em corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão. Os dados são representados como médias $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparados a valores controle.

Para a comparação entre os grupos (i.e. tratamento com DMA ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de experimentos de isquemia / reperfusão), os resultados das alterações da pressão diastólica ocorridas durante o protocolo de isquemia / reperfusão foram reunidos em um só gráfico que é apresentado na Figura 7. Observa-se que após 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, não apresentaram diferenças significativas entre si na pressão diastólica, enquanto os corações avaliados após 72 hs do tratamento apresentaram pressão diastólica de cerca de 112% (34 vs 16 mmHg) maiores que os corações avaliados após 48 hs do tratamento. Não houve diferença significativa entre as pressões diastólicas dos corações de ratos tratados 24 e 72 hs antes do experimento. Notavelmente, a pressão diastólica atingida ao final do período de reperfusão pelos corações de ratos tratados com DMA 48 hs antes foi de apenas 16 mmHg, enquanto os corações de ratos tratados com veículo a pressão diastólica atingiu 49 mmHg. Resultados não apresentados demonstraram que não houve diferenças significativas, quanto à pressão diastólica do ventrículo esquerdo, entre os corações de ratos tratados com veículo 24, 48 e 72hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

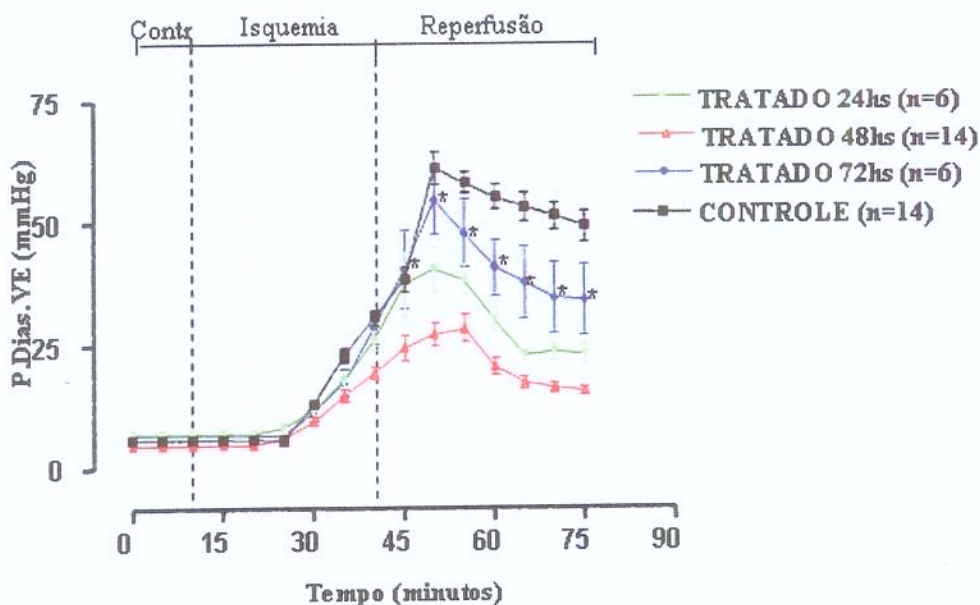


Figura 7- Gráfico representativo (todos os tempos) do efeito do DMA sobre a pressão diastólica ventricular esquerda em corações isolados de ratos tratados DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M., para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores do grupo tratado 48 hs antes.

Na Figura 8 estão representados os valores médios da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo e submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Após 35 min de reperfusão corações de ratos tratados com DMA 24, 48 e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, apresentaram níveis de pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo cerca de 73% (90 vs 52 mmHg), 240% (92 vs 27 mmHg) e 129% (64 vs 28 mmHg) maiores que aqueles apresentados, no mesmo período, pelos seus respectivos controles tratados com veículo.

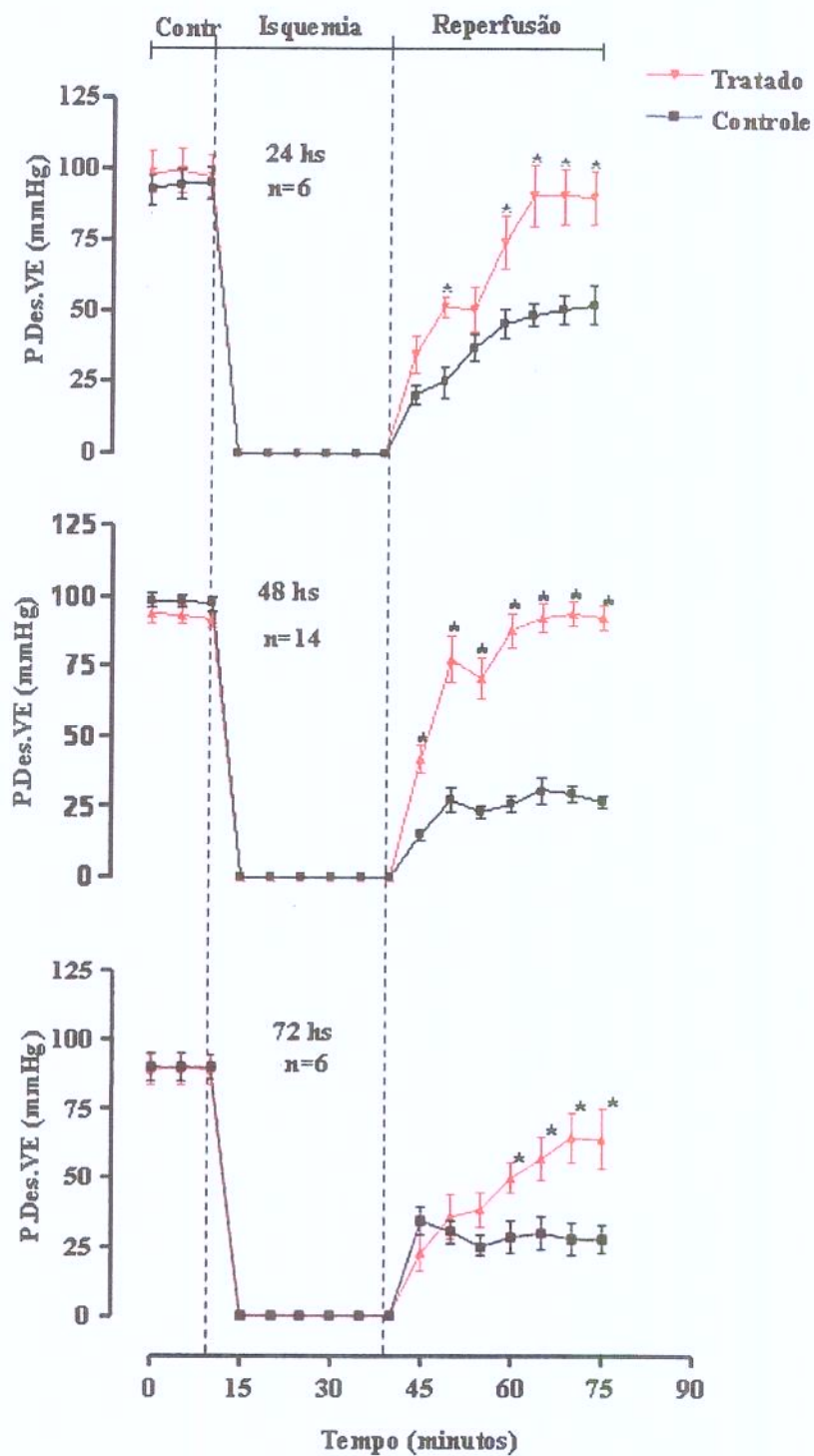


Figura 8 -Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores controles.

Para a comparação entre os grupos (i.e. tratamento com DMA ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de experimentos de isquemia / reperfusão), os resultados das alterações da pressão desenvolvida ocorridas durante o protocolo de isquemia / reperfusão foram reunidos em um só gráfico que é apresentado na Figura 9. Observa-se que após 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, não apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto os corações avaliados após 72 hs do tratamento apresentaram pressão desenvolvida cerca de 41% (90 vs 64 mmHg) e 44% (92 vs 64 mmHg) menores que os corações avaliados após 24 e 48 hs do tratamento, respectivamente. Notavelmente, nos corações de ratos tratados 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, a pressão desenvolvida após 35 min de reperfusão foi semelhante àquela verificada no período controle, enquanto que nos corações de ratos tratados com veículo os valores atingidos foram de apenas 25% (25 vs 100 mmHg) daqueles do seu respectivo período controle. Resultados não apresentados demonstraram que não houve diferenças significativas, quanto à pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, entre os corações de ratos tratados com veículo 24, 48 e 72hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

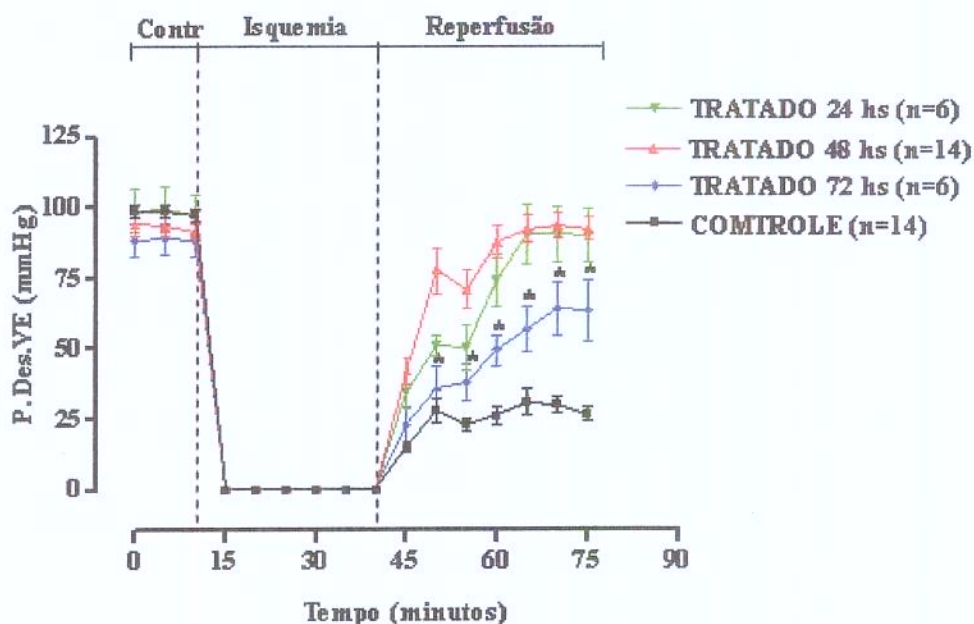


Figura 9- Gráfico representativo do efeito do DMA sobre a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores do grupo tratado com DMA 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão.

Na Figura 10 estão representados os valores médios de frequência cardíaca (FC) de corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo e submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão. No período de reperusão, corações isolados de ratos tratados com DMA 24, 48 e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperusão não apresentaram diferenças significativas quanto à frequência cardíaca em relação aos seus respectivos controles tratados com veículo.

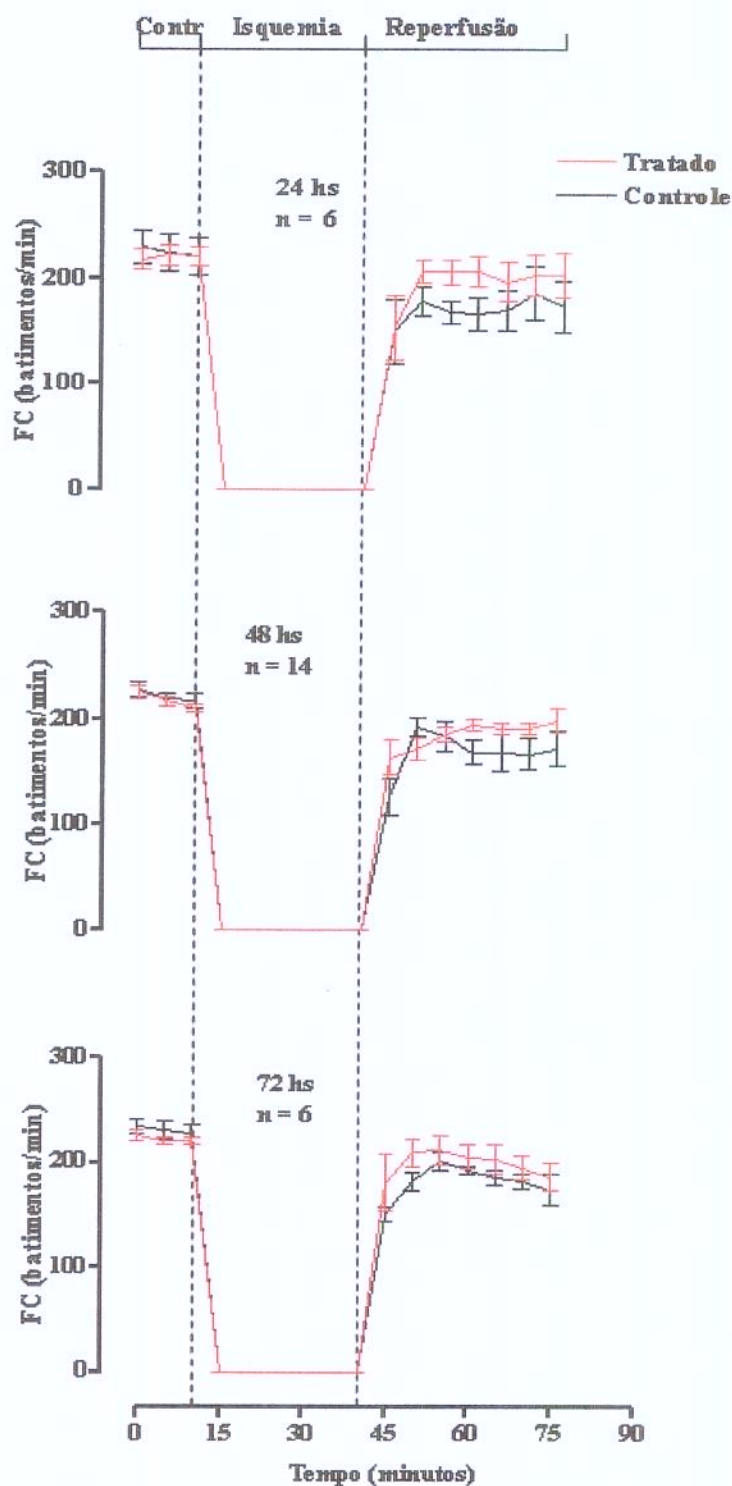


Figura 10 -Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a frequência cardíaca (FC) de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores controles.

Para a comparação entre os grupos (i.e. tratamento com DMA ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de experimentos de isquemia / reperfusão), os resultados de frequência cardíaca de corações isolados de ratos durante o protocolo de isquemia / reperfusão foram reunidos em um só gráfico que é apresentado na Figura 11. Observa-se que após 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24, 48 hs e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, não apresentaram diferenças significativas entre si. Resultados não apresentados demonstraram que não houve diferenças significativas, quanto à frequência cardíaca, entre os corações de ratos tratados com veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

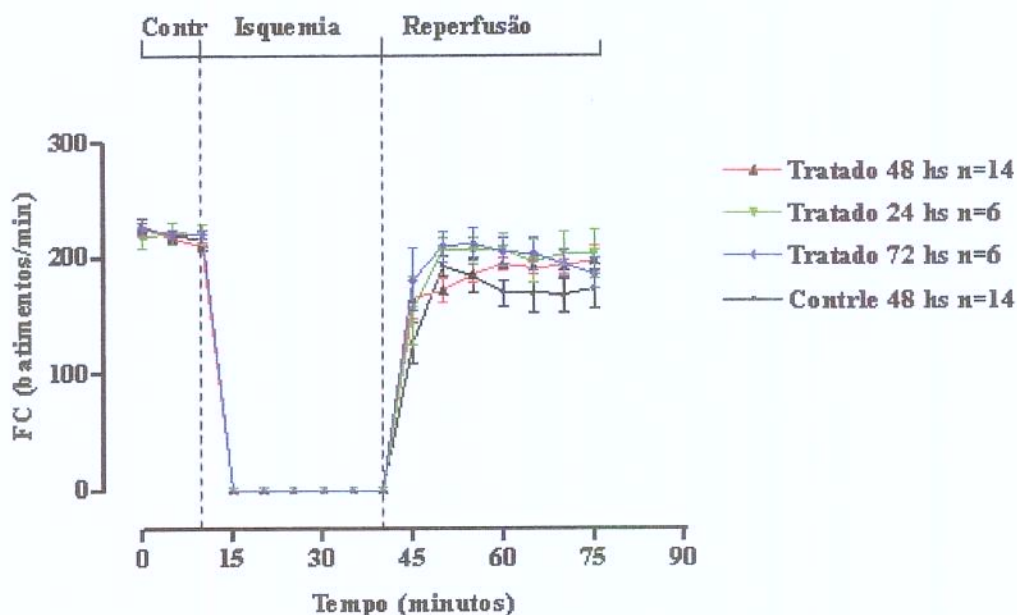


Figura 11- Gráfico representativo do efeito do DMA sobre a frequência cardíaca (FC) de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores do grupo tratado com DMA 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

Na Figura 12 estão representados os valores médios da derivada positiva da pressão em relação à derivada do tempo ($+dp/dt$) que é uma medida da taxa de contração do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo e submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Após 35 min de reperfusão corações de ratos tratados com DMA 24, 48 e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão apresentaram, respectivamente, níveis de $+dp/dt$ no ventrículo esquerdo de 122% (1530 vs 690), 444% (1704 vs 313) e 155% (996 vs 391) maiores que aqueles apresentados, no mesmo período, pelos seus respectivos controles tratados com veículo.

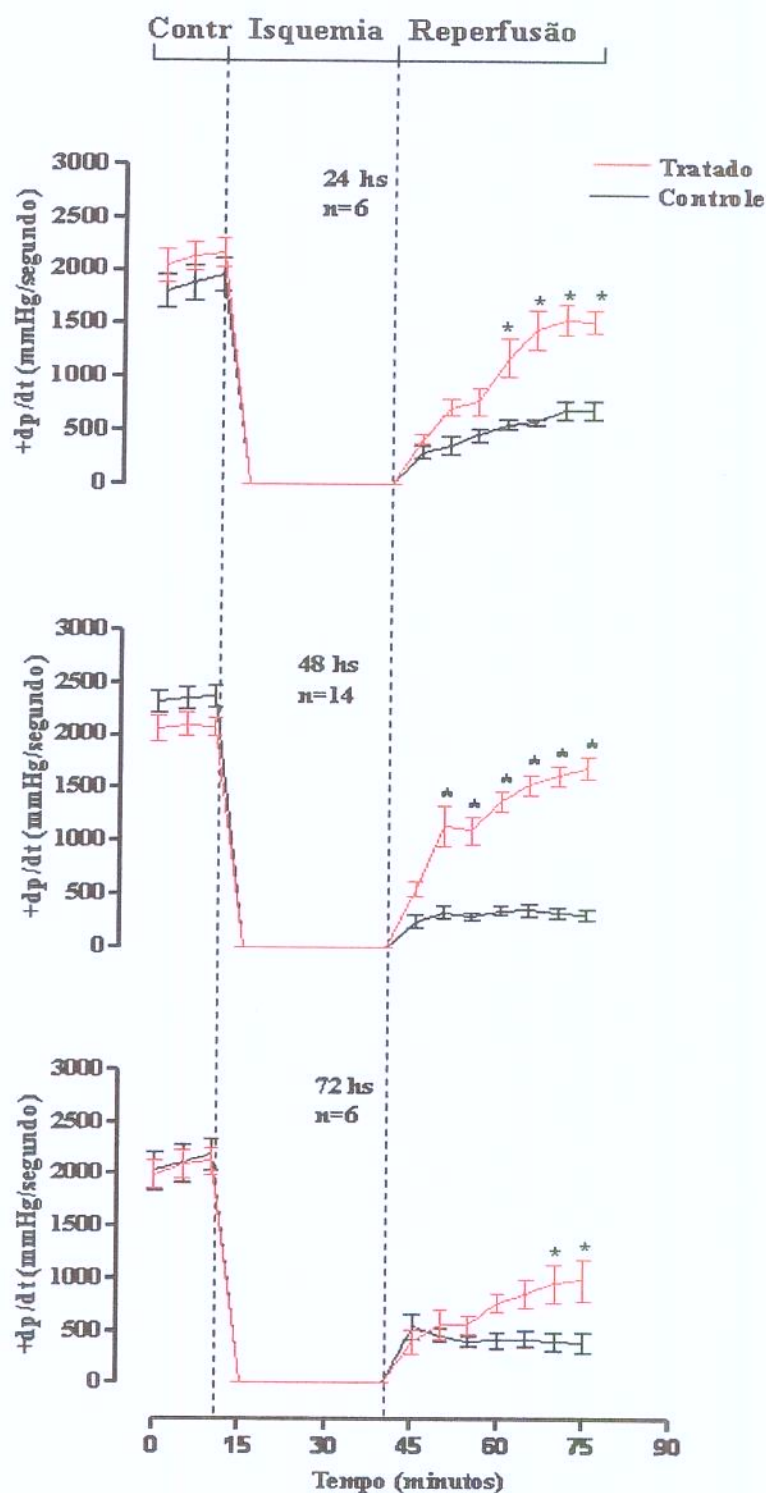


Figura 12 -Gráficos representativos do efeito do DMA sobre a $+dp/dt$ de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p<0,05$ comparado a valores controles.

Para a comparação entre os grupos (i.e. tratamento com DMA ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de experimentos de isquemia / reperfusão), os resultados das alterações na $+dp/dt$ ocorridas durante o protocolo de isquemia / reperfusão foram reunidos em um só gráfico que é apresentado na Figura 13. Observa-se que após 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, não apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto os corações avaliados após 72 hs do tratamento apresentaram $+dp/dt$ cerca de 71% (996 vs 1704) menores que os corações avaliados após 48 hs do tratamento. Notavelmente, nos corações de ratos tratados 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, os valores de $+dp/dt$ após 35 min de reperfusão foram semelhantes àqueles verificados nos períodos-controle, enquanto que nos corações de ratos tratados com veículo os valores atingidos foram de apenas 13% (313 vs 2378) daqueles dos seus respectivos períodos-controle. Resultados não apresentados demonstraram que não houve diferenças significativas, quanto à $+dp/dt$ no ventrículo esquerdo, entre os corações de ratos tratados com veículo 24, 48 e 72hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

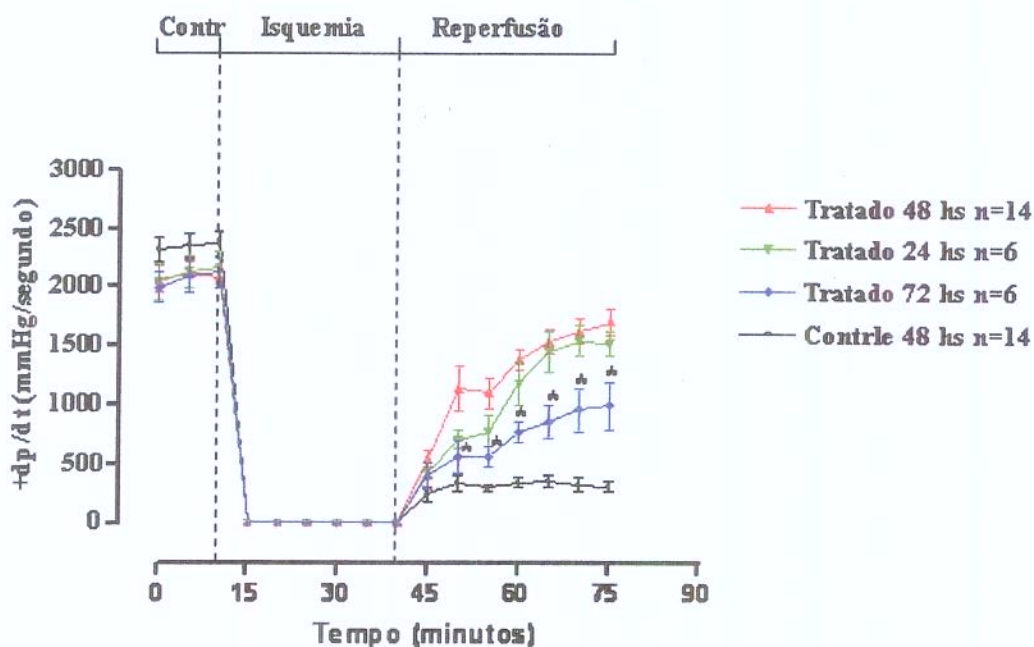


Figura 13- Gráfico representativo do efeito do DMA sobre a $+dp/dt$ de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores do grupo tratado com DMA 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

Na Figura 14 estão representados os valores absolutos médios da derivada negativa da pressão em relação à derivada do tempo ($|-dp/dt|$), que é uma medida da taxa de diminuição da pressão no ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos tratados com DMA ou veículo e submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Após 35 min de reperfusão, corações de ratos tratados com DMA 24, 48 e 72 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão apresentaram, respectivamente, níveis de $|-dp/dt|$ no ventrículo esquerdo de 87% (1057 vs 566), 260% (1112 vs 309) e 123% (652 vs 292) maiores do que aqueles apresentados, no mesmo período, pelos seus respectivos controles tratados com veículo.

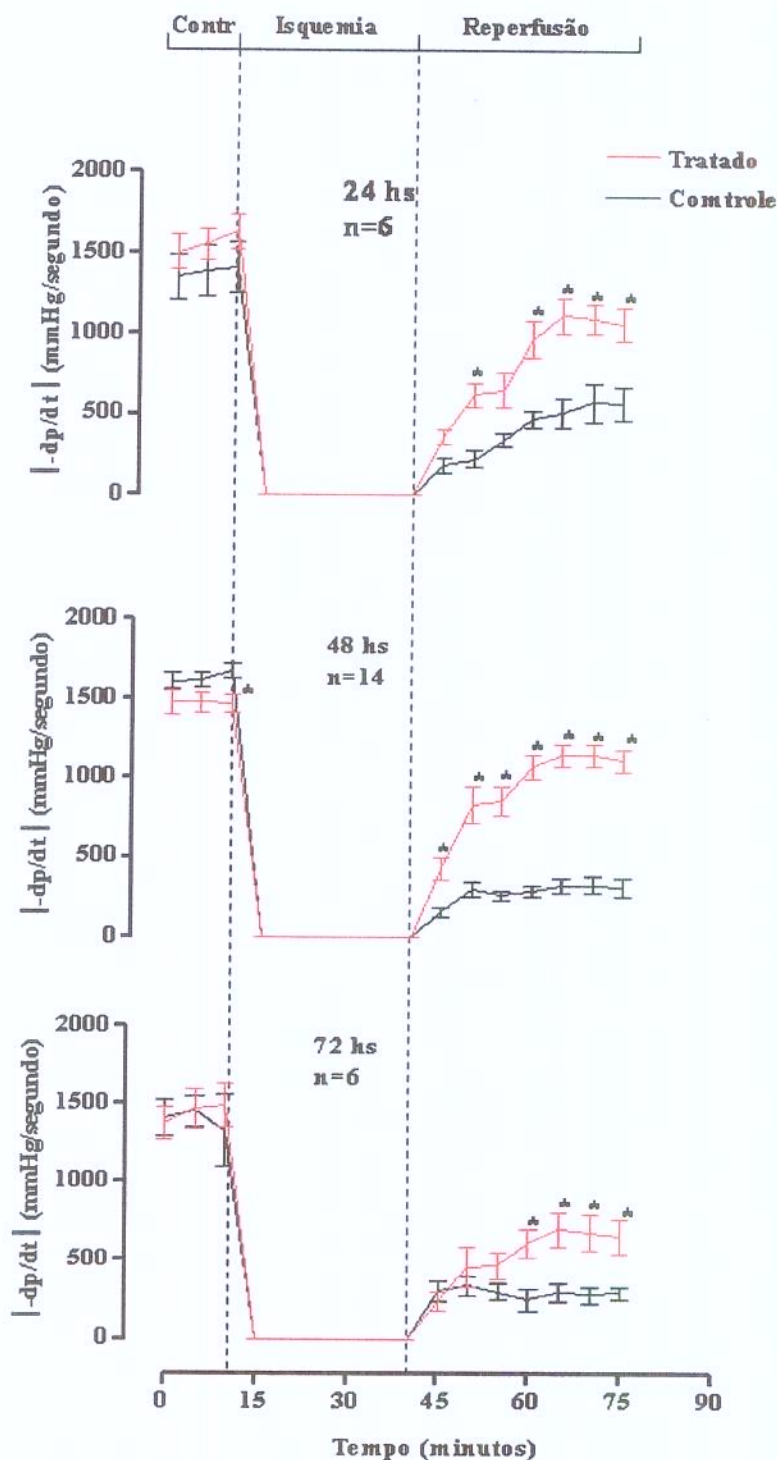


Figura 14 -Gráficos representativos do efeito do DMA sobre o $|\text{-dp/dt}|$ de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores controles.

Para a comparação entre os grupos (i.e. tratamento com DMA ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de experimentos de isquemia / reperfusão), os resultados das alterações na $-\text{dp}/\text{dt}$ ocorridas durante o protocolo de isquemia / reperfusão foram reunidos em um só gráfico que é apresentado, em valores absolutos, na Figura 15. Observa-se que após 35 min de reperfusão, os corações de ratos tratados com DMA 24 e 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, não apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto os corações avaliados após 72 hs do tratamento apresentaram valores de $|\text{-dp}/\text{dt}|$ cerca de 58% (652 vs 1112) menores que os corações avaliados após 48 hs do tratamento. Notavelmente, nos corações de ratos tratados 48 hs antes do experimento de isquemia / reperfusão, os valores de $|\text{-dp}/\text{dt}|$ após 35 min de reperfusão foi de 75% (1112 vs 1475) daqueles verificados em seus respectivos períodos-controle, enquanto que nos corações de ratos tratados com veículo os valores atingidos foram de apenas 22% (360 vs 1637) daqueles dos seus respectivos períodos-controle. Resultados não apresentados demonstraram que não houve diferenças significativas, quanto aos valores absolutos de $-\text{dp}/\text{dt}$ do ventrículo esquerdo, entre os corações de ratos tratados com veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

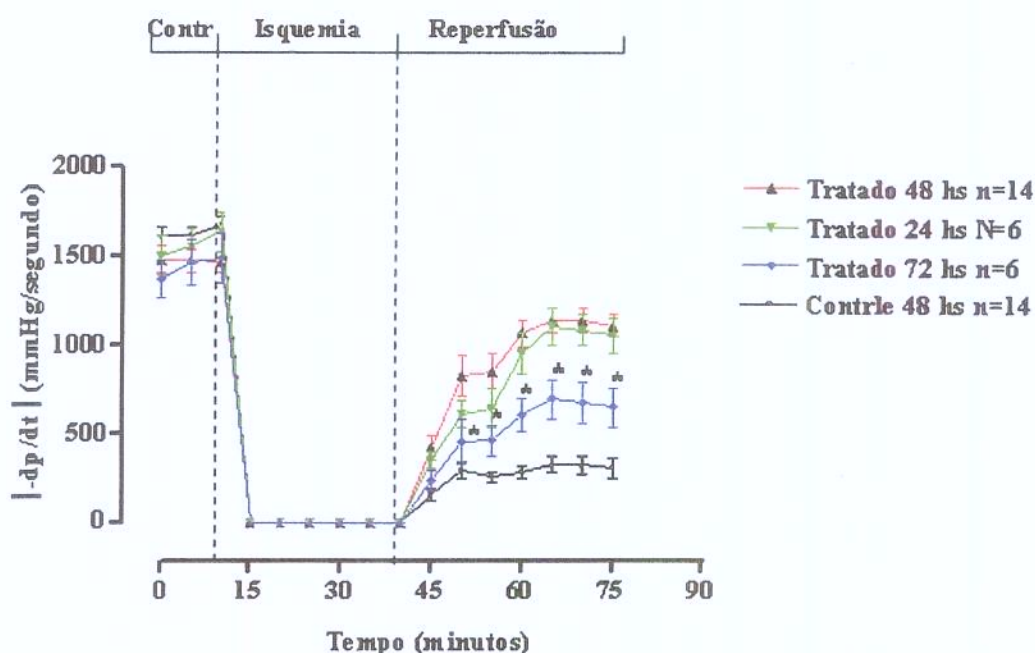


Figura 15- Gráfico representativo do efeito do DMA sobre o $|\text{-dp/dt}|$ de corações isolados de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo 24, 48 e 72 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a valores do grupo tratado com DMA 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

Efeito do bloqueador da Óxido Nítrico Sintase (NOS) *N*^w-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) na proteção tardia induzida por DMA.

Várias evidências indicam a participação do óxido nítrico na ativação dos mecanismos de proteção tardia do miocárdio. Estudos mais recentes demonstraram que além de ativador, o óxido também pode participar dos mecanismos de proteção tardia como mediador da resposta. Assim, existem evidências de que o miocárdio submetido a episódio de isquemia sub-letal apresenta aumento da produção de óxido nítrico, sendo este

BOLLI et al., 1997). GUO e colaboradores, através do bloqueio gênico da iNOS, mostraram que esta é um mediador essencial da fase tardia do pré-condicionamento isquêmico (GUO et al., 1999), o que também ficou evidente com o uso de agentes farmacológicos (XI et al., 1999; GUO et al., 2000; ZHAO et al., 2000; SALLOUM et al., 2003). Portanto, no presente estudo realizamos experimentos para avaliar se existe envolvimento do sistema óxido nítrico-NOS nos mecanismos de proteção tardia do miocárdio induzida por compostos quinazolínicos. Como primeira abordagem, avaliamos o efeito do bloqueador inespecífico de NOS, L-NAME sobre parâmetros de pressão do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos tratados previamente com DMA ou veículo.

Na Figura 16 estão representados exemplos típicos de registros de pressão do ventrículo esquerdo de corações de ratos tratados com veículo ou que após 3 dias tomando L-NAME (30 mg/kg na água de beber), foram tratados com DMA (1,2 mg/kg, via endovenosa) ou veículo (DMSO) e após períodos de 24 e 48 hs seus corações foram isolados e submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. Após a isquemia, tanto nos corações de ratos tratados com L-NAME + veículo quanto nos tratados com L-NAME + DMA a recuperação dos batimentos foi acompanhada de aumento intenso da pressão diastólica do ventrículo esquerdo relativa àquela do período controle, enquanto que a pressão sistólica atingiu níveis semelhantes àqueles do período controle. Sendo assim, a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo apresentou-se bastante reduzida nos 35 min que se seguiram (reperfusão), indicando a perda da proteção parcial, conferida pelo DMA, aos efeitos da isquemia/ reperfusão.

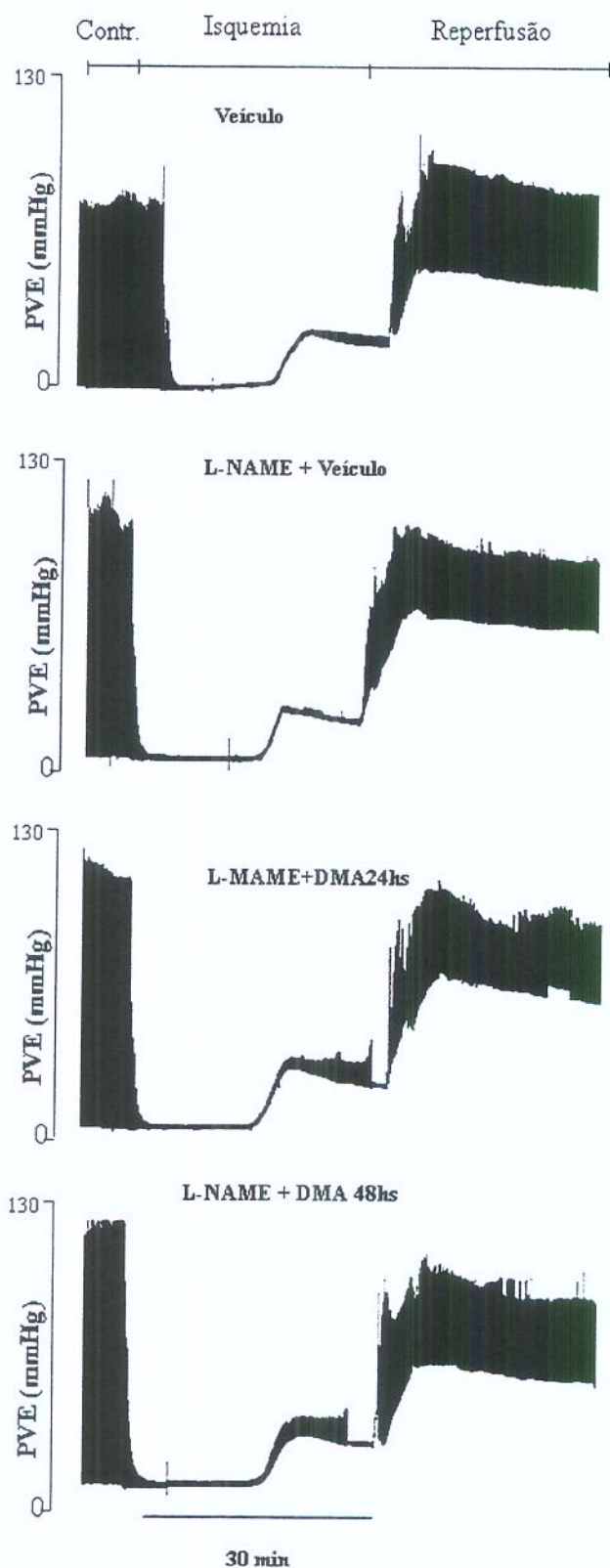


Figura 16-Exemplos de registros de pressão do ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperusão em corações isolados de ratos tratados com veículo e L-NAME + veículo ou L-NAME + DMA, 24 e 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão.

Na Figura 17 são representados os valores médios de pressão diastólica do ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos tratados com L-NAME + DMA, L-NAME + veículo, DMA ou veículo, 24 e 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. No período pós-isquêmico, nos corações dos ratos tratados com L-NAME + veículo e nos corações dos ratos tratados com L-NAME + DMA os registro de pressão diastólica do ventrículo esquerdo apresentaram aumento significativo em relação aos que receberam apenas DMA. Não houve diferenças significativas entre as pressões diastólicas dos corações de ratos tratados com L-NAME + veículo e daqueles tratados com L-NAME + DMA.

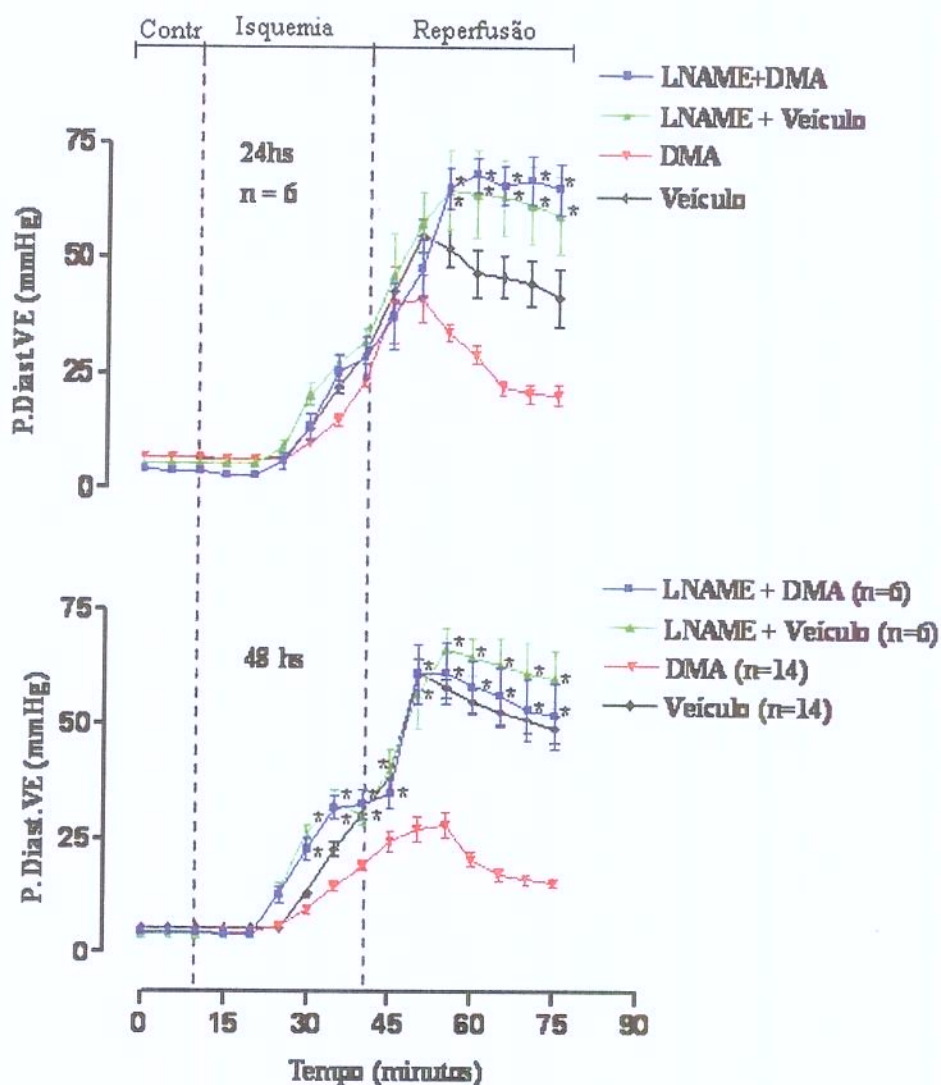


Figura 17-Gráficos representativos do efeito do L-NAME sobre a pressão diastólica do ventrículo esquerdo em corações de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo, 24 e 48 hs antes de serem isolados e submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão, no que se refere à pressão diastólica ventricular esquerda. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparados a valores do grupo tratado com DMA 24 ou 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão.

Na Figura 18 são representados os valores médios de pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo de experimentos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos tratados com L-NAME + DMA, L-NAME + veículo, DMA ou veículo, 24 e 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão. No período pós-isquêmico, nos ratos tratados com L-NAME + veículo e nos tratados com L-NAME + DMA houve decréscimos significativos de pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo em relação aos que receberam apenas DMA; entre os ratos que foram tratados com L-NAME + veículo, L-NAME + DMA e os que receberam apenas o veículo, não houve diferenças significativas.

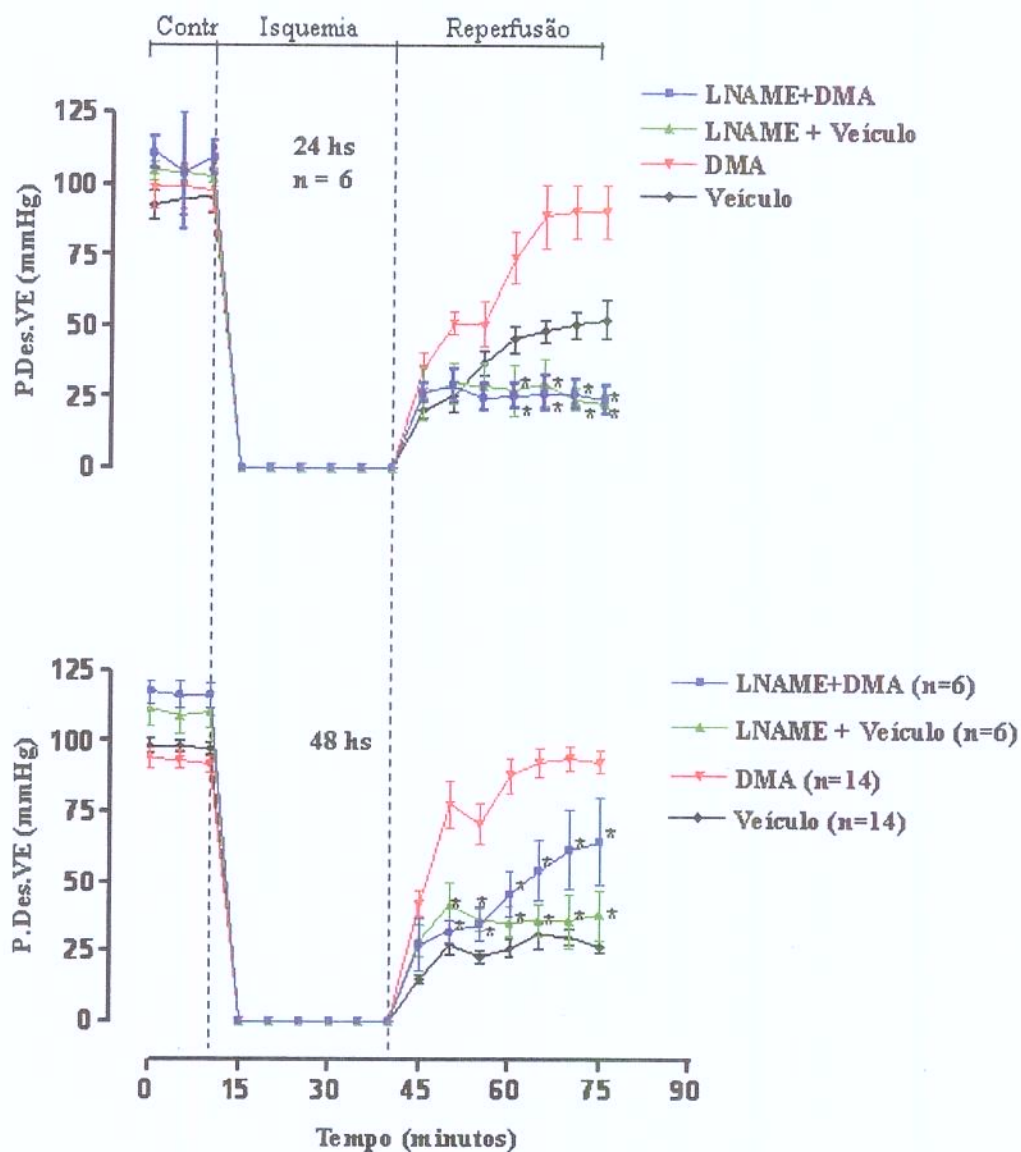


Figura 18-Gráficos representativos do efeito do L-NAME sobre pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em corações de ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg) ou veículo, 24 e 48 hs antes de serem isolados e submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão, no que se refere à pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 6 a 14 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparados a valores do grupo tratado com DMA 24 ou 48 hs antes de serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperusão.

Efeito do DMA sobre a expressão de NOS

Na Figura 19 estão representados exemplos de “immunoblots” realizados com anticorpos anti-iNOS e extratos de corações de ratos-controle e ratos tratados com DMA (1,2 mg/kg), 24 e 48 hs antes do experimento. O gráfico representa resultados da análise da leitura densitométrica dos “immunoblots” (n=6) e são apresentados como variação percentual em relação à leitura das bandas de corações-controle. Os resultados indicam que ocorreram aumentos na expressão de iNOS no miocárdio de ratos tratados com DMA de cerca de 189% e 48% respectivamente aos grupos tratados com antecedência de 24 e 48 hs em relação aos corações de ratos-controle tratados com veículo nos mesmos períodos.

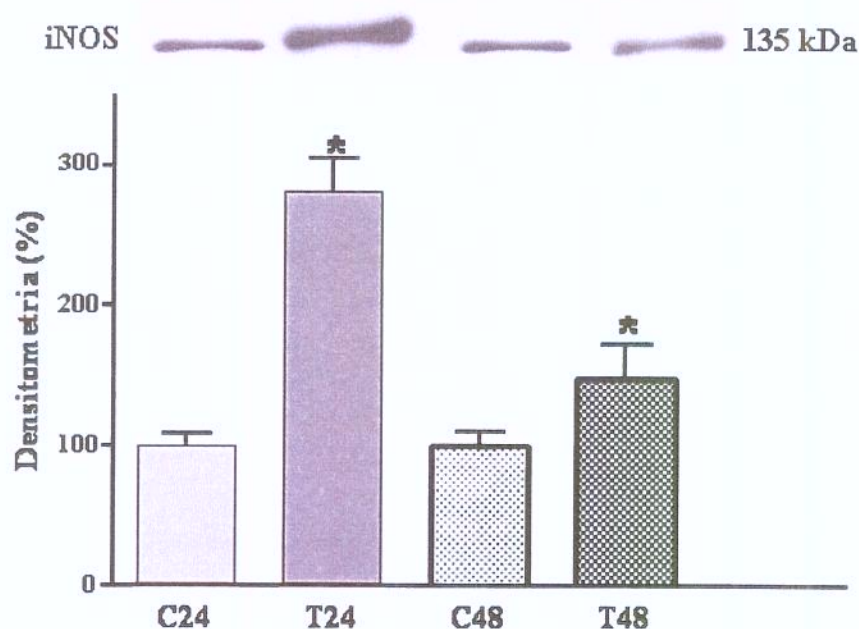


Figura 19-Exemplos de “immunoblot” e gráfico representativo do efeito do DMA sobre a expressão de iNOS de extrato total de corações de ratos tratados com veículo ou DMA 24 e 48 hs antes de serem obtidos os extratos totais ventriculares para análise por “immunoblotting”. Os dados são representados como média ±E.P.M. para os experimentos. *p<0,05 comparados a valores dos grupos tratados com veículo, com n=6 ratos por grupo.

Discussão

No presente estudo avaliamos a ação de um composto derivado de quinazolina nos efeitos de isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos. Os resultados demonstraram que: 1) O tratamento com DMA, 24 a 72 hs antes de episódios de isquemia / reperfusão, induziu a proteção de corações isolados de ratos, e 2) A ação do DMA depende da atividade da NOS, indicado pelo aumento na expressão de NOS induzido pelo DMA, bem como pelo bloqueio do efeito protetor do DMA pelo tratamento com L-NAME.

Efeito do DMA em corações isolados de ratos

BAXTER et al. (1994) demonstraram que a adenosina induz proteção à agressão isquêmica, sendo que este efeito é similar ao observado no pré-condicionamento induzido por isquemia (BAXTER et al., 1997; DANA et al., 2000). Adenosina e agonistas dos receptores de adenosina têm sido avaliados extensivamente quanto a sua capacidade de atenuar a lesão por isquemia / reperfusão e, especificamente, limitar o tamanho do infarto (KIS et al., 2003).

Existem várias evidências de que a isquemia do miocárdio induz um aumento de adenosina intracelular (DEUSSEN, et al., 1988; DECKING, et al., 1997) e também um aumento de adenosina extracelular (HEADRICK et al., 1992). Há demonstrações indicando que este efeito ocorre pela inibição de adenosina quinase por fosfato inorgânico proveniente do catabolismo de nucleotídeos de adenina (GORMAN et al., 1997). HEADRICK e colaboradores demonstraram que a inibição de adenosina quinase por iodotubercidina produz proteção contra os danos da isquemia / reperfusão em corações isolados de ratos (HEADRICK et al., 2003). Nesse contexto é importante ressaltar que a adenosina quinase contribui de maneira importante para a biodisponibilidade de adenosina, já que juntamente

com a adenosina deaminase constituem as duas principais vias de degradação da adenosina nas células (SCHRADER & GERLACH, 1976; HEADRICK et al., 2003). De maneira geral, nossos resultados demonstram que o composto químico DMA, administrado com antecedência de 24 a 72 horas, tem efeito semelhante aos indutores de proteção tardia do miocárdio em corações isolados de ratos. Este efeito pode ser comparado com o da adenosina. Além disso, estes dados estão de acordo com estudos ainda não publicados pelo nosso laboratório que demonstraram que o DMA é um inibidor de adenosina quinase e provoca um aumento na biodisponibilidade de adenosina. Desta forma, por bloquear a adenosina quinase, o DMA aumentaria a biodisponibilidade de adenosina no miocárdio, produzindo proteção aguda (MARIN, 2003) e tardia.

A proteção aguda é disparada pela liberação de substâncias que, interagindo com seus respectivos receptores de membrana, vão desencadear eventos de sinalização intracelulares que culminam na ativação dos efetores finais da proteção e na transcrições gênicas para novas sínteses de proteínas envolvidas na proteção tardia (BOLLI, 2000; MARBER & YELLON, 1996). O óxido nítrico (NO) tem um importante papel tanto como gatilho quanto como mediador da segunda janela de proteção, sendo considerado mediador das ações da adenosina (BOLLI, 2000). Quando os corações são previamente tratados com um inibidor inespecífico de NOS, o L-NAME, a proteção tardia à agressão por isquemia / reperfusão desaparece (BELL et al., 2002; NAKANO et al., 2000). Da mesma forma, nossos resultados indicam que a proteção tardia proporcionada pelo DMA pode ser dependente de NO, como indicado pelo aumento na expressão de NOS e pela supressão dos efeitos de proteção do DMA quando os ratos foram tratados com o inibidor inespecífico de NOS, o L-NAME. É interessante notar que, nos ratos tratados com o veículo ao invés de DMA, o L-NAME não produz qualquer alteração no desempenho durante a reperfusão em

relação aos corações de ratos controle que não receberam L-NAME nem DMA evidenciando assim, que o tratamento com o L-NAME por si só, não causa efeito sobre corações isolados de ratos submetidos à isquemia / reperfusão.

Conclusão

No presente trabalho conclui-se que o composto derivado quinazolinico usado, DMA, foi capaz de induzir proteção tardia em corações isolados de ratos. Os corações de ratos tratados com DMA se apresentaram protegidos dos danos da isquemia e reperfusão 24 a 72 hs após o tratamento, sendo que a proteção mais intensa foi verificada nos ratos tratados 48 hs antes de seus corações serem submetidos ao protocolo de isquemia / reperfusão.

Os resultados ainda indicam que a proteção miocárdica induzida pelo composto usado (DMA) pode ser dependente de óxido nítrico e que o DMA induziu uma maior expressão de óxido nítrico sintase nos corações isolados de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU SOUD, H. M.; ICHIMORI, K.; PRESTA, A.; STUEHR, D. J. Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, 275: 17349-17357, 2000.
- ACHTERBERG, P. W.; HARMSSEN, E.; JONG, J. W. Adenosine deaminase inhibition and myocardial purine release during normoxia and ischemia. **Cardiovasc Res**, 19: 593-598, 1985.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, 43: 521-531, 1999.
- ARCH, J. R.; NEWSHOME, E. A. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. **Biochem J**, 174: 965-977, 1978.
- AUCHAMPACH, J. A.; BOLLI, R. Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges. **Am J Physiol**, 276: H1113-H1116, 1999.
- AUCHAMPACH, J. A.; TAKANO, H.; YANG, Z.; TANG, X. L.; BOLLI, R. Activation of A₃ adenosine receptors induces late preconditioning against myocardial infarction but not stunning in conscious rabbits. **J Mol Cell Cardiol**, 31: 5 A10, Abstract, 1999.
- BAFFY, G.; MIYASHITA, T.; WILLIAMSON, J. R.; REED, J. C. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is

associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. **J Biol Chem**, 268: 6511- 6519, 1993.

BAINES, C. P.; GOTO, M.; DOWNEY, J. M. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 207-216, 1997.

BAINES, C. P.; LIU, G. S.; BIRINCIOGLU, M.; CRITZ, S. D.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 276: H1361-H1368, 1999.

BAINES, C. P.; PASS, J. M.; PING, P. Protein kinase and kinase modulated effectors in the late phase of ischemic preconditioning. **Basic Res Cardiol**, 96: 207-218, 2001.

BAINES, C. P.; SONG, C. X.; ZHENG, Y. T.; WANG, O. L.; GUO, Y.; BOLLI, R.; CARDWELL, E. M.; PING, P. Protein kinase C ϵ interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. **Circ Res**, 92: 873-880, 2003.

BAINES, C. P.; WANG, L.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or KATP channels in the isolated rabbit heart. **Basic Res Cardiol**, 94: 188-198, 1999.

BAINES, C. P.; ZHANG, J.; WANG, G. W.; ZHENG, Y. T.; XIU, J. X.; CARDWELL, E. M.; BOLL, R.; PING, P. Mitochondrial PKC ϵ and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKC ϵ -MAPK interactions and

- differential MAPK activation in PKC ϵ -induced cardioprotection. *Circ Res*, 90: 390-397, 2002.
- BANERJEE, A.; LOCKE WINER, C.; ROGERS, K. B.; MITCHELL, M. B.; BREW, E. C.; CAIRNS, C. B.; BENSARD, D. D.; HARKEN, A. H. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an α 1-adrenergic mechanism. *Circ Res*, 73: 656-670, 1993.
- BANERJEE, A.; TANG, X. L.; QIU, Y.; TAKANO, H.; MANCHIKALAPUDI, S.; DAWN, B.; SHIRK, G.; BOLLI, R. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKC-dependent pathway. *Am J Physiol*, 277: H2488-H2494, 1999.
- BASANEZ, G.; ZHANG, J.; CHAU, B. N.; MAKSAEV, G. I.; FROLOV, V. A.; BRANDT, T. A.; BURCH, J.; HARDWICK, J. M.; ZIMMERBERG, J. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL from cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem*, 276: 31083-31091, 2001.
- BAXTER, G. F.; GOMA, F. M.; YELLON, D. M. Characterization of the infarct-limiting effects of delayed preconditioning time course and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol*, 92: 159-167, 1997.
- BAXTER, G. F.; MARBER, M. S.; PATEL, V. C.; YELLON, D. M. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation*, 90: 2993-3000, 1994.

- BAXTER, G. F.; YELLON, D. M. Time course of delayed myocardial protection after transient A₁ receptor activation in the rabbit. **J Cardiovasc Pharmacol**, 29: 631-638, 1997.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87: 1620-1624, 1990.
- BELL, R. M.; SMITH, C. C.; YELLON, D. M. Nitric oxide as a mediator of delayed pharmacological (A₁ receptor triggered) preconditioning: is eNOS masquerading as iNOS? **Cardiovasc Res**, 53: 405-413, 2002.
- BELL, R. M.; YELLON, D. M. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. **Cardiovasc Res**, 52: 274-280, 2001.
- BELL, S. P.; SACK, M. N.; PATEL, A.; OPIE, L. H.; YELLON, D. M. δ Opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. **J Am Coll Cardiol**, 36: 2296-2302, 2000.
- BERNARDO, N. L.; D'ANGELO, M.; OKUBO, S.; JOY, A.; KUKREJA, R. C. Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in rabbit heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 276: H1323-H1330, 1999.

- BLACK, R. G., Jr.; GUO, Y.; GE, Z. D.; MURPHREE, S.; PRABHU, S. D.; JONES, W. K.; BOLLI, R.; AUCHAMPACH, J. A. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A₃ adenosine receptor. *Circ Res*, 91: 165-172, 2002.
- BOLLI, R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*, 87: 972-983, 2000.
- BOLLI, R.; BECKER, L.; GROSS, G.; MENTZER, R.; BALSHAW, D.; LATHROP, D. A. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res*, 95: 125-134, 2004.
- BOLLI, R.; BHATTI, Z. A.; TANG, X. L.; QIU, Y.; ZHANG, Q.; GUO, Y.; JADOON, A. K. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by generation of nitric oxide. *Circ Res*, 81: 42-52, 1997.
- BOLLI, R.; DAWN, B.; TANG, X. L.; QIU, Y.; PING, P.; XUAN, Y. T.; JONES, W. K.; JADOON, A. K.; TAKANO, H.; GUO, Y.; ZHANG, J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 93: 325-338, 1998.
- BOLLI, R.; MANCHIKALAPUDI, S.; TANG, X. L.; TAKANO, H.; QIU, Y.; GUO, Y.; ZHANG, Q.; JADOON, A. K. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase: evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res*, 81: 1094-1107, 1997.
- BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C499-C508, 2003.

- BOUCHER, M.; PESANT, S.; FALCAO, S.; MONTIGNY, C.; SCHAMPAER, E.;
CARDINAL, R.; ROUSSEAU, G. Post-ischemic cardioprotection by A_{2A} adenosine
receptors: dependent of Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway. **J Cardiovasc
Pharmacol**, 43: 416-422, 2004.
- BRIDGES, A. J.; ZHOU, H.; CODY, D. R.; REWCASTLE, G. W.; MCMICHAEL, A.;
SHOWALTER, H. H. D.; FRY, D. W.; KRAKER, A. J.; DENNY, W. A. Tyrosine
kinase inhibitors: an unusually steep structure-activity relationship for analogues of
4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of
the epidermal growth factor receptor. **J Med Chem**, 39: 267-276, 1996.
- BROWN, J. M.; TERADA, L. S.; GROSSO, M. A.; WHITMANN, G. J.; VELASCO, S.
E.; PATT, A.; HARKEN, A. H.; REPINE, J. E. Xanthine oxidase produces
hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated,
perfused rat hearts. **J Clin Invest**, 81: 1297-1301, 1988.
- BUDDE, J. M.; VELEZ, D. A.; ZHAO, Z.; CLARK, K. L.; MORRIS, C. D.; MURAKI, S.;
GUYTON, R. A.; VINTEN JOH NSEN, J. Comparative study of AMP579 and
adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury
during 24 h of reperfusion. **Cardiovasc Res**, 47: 249-305, 2000.
- CARMITA, M. G. W.; GABEL, S. A.; CHULADA, P.; BRADBURY, J. A.;
LANGENBACH, R.; ZELDIN, D. C.; MURPHY, E. Cyclooxygenase 1 and 2
knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are
protected by acute preconditioning. **Circulation**, 104: 2453-2458, 2001.

- CERNIWAY, R. J.; YANG, Z.; JACOBSON, M. A.; LINDEN, J.; MATHERNE, G. P. Targeted deletion of A₃ adenosine receptors improves tolerance to ischemia-reperfusion injury in mouse myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 281: H1751-H1758, 2001.
- CHAMBERS, D. J.; BAIMBRIDGE, M. V.; HEARSE, D. J. Free radicals and cardioplegia: allopurinol and oxypurinol reduce myocardial injury following arrest. **Ann Thorac Surg**, 44: 291-297, 1987.
- CHARLAT, M. L.; O'NEILL, P. G.; EGAN, J. M.; ABERNETHY, D. R.; MICHAEL, L. H.; MYERS, M. L.; ROBERTS, R.; BOLLI, R. Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 252: H566-H577, 1987.
- CHATTERJEE, S.; STEWART, A. S.; BISH, L. T.; JAYASANKAR, V.; KIM, E. M.; PIROLLI, T.; BURDICK, J.; WOO, Y. J.; GARDNER, T. J.; SWEENEY, H. Viral gene transfer of the antiapoptotic factor Bcl-2 protects against chronic postischemic heart failure. **Circulation**, 106: 212-217, 2002.
- CHEN, W.; GLASGOW, W.; MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. **Am J Physiol**, 276: H2094-H2101, 1999.
- CHEN, Z.; CHUA, C. C.; HO, Y. S.; HAMDY, R. C.; CHUA, B. H. Overexpression of bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 280: H2313-H2320, 2001.

- CHENG, E. H.; WEI, M. C.; WEILER, S.; FLAVELL, R. A.; MAK, T. W.; LINDSTEN, T.; KORSMEYER, S. J. BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAD-mediated mitochondrial apoptosis. **Mol Cell Biochem**, 8: 705-711, 2001.
- CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of Sildenafil. **J. Biol. Chem**, 274: 13729-13732, 1999.
- COX, J. L.; SUNDT, T. M. III. The surgical management of atrial fibrillation. **Annu Rev Med**, 48: 511-513, 1997.
- COWART, M.; LEE, C.H.; GFESSER, G. A.; BAYBURT, E. K.; BHAGWAT, S. S.; STEWART, A. O. Structure-Activity Studies of 5-Substituted Pyridopyrimidines as Adenosine Kinase Inhibitors. **Bioorg Med Chem Let**, 11: 83-86, 2001.
- CROW, J. P.; BECKMAN, J. S. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. **Adv Pharmacol**, 34: 17-43, 1995.
- DANA, A.; BAXTER, G. F.; WALKER, J. M.; YELLON, D. M. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A₁ receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. **J Am Coll Cardiol**, 31: 1142-1149, 1998.
- DANA, A.; JONASSEN, A. K.; YAMASHITA, N.; YELLON, D. M. Adenosine A₁ receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase. **Circulation**, 101: 2841-2848, 2000.

- DARVISH, A.; POMERANTZ, R. W.; ZOGRAFIDES, P. G.; METTING, P. J. Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. **Am J Physiol**, 271: H2162-H2167, 1996.
- DARVISH, A.; POSTLEWAITE, J. J.; METTING, P. J. Immunogold localization of adenosine 5'-monophosphate-specific cytosolic 5'-nucleotidase in dog heart. **Hypertension**, 21: 906-910, 1993.
- DAWN, B.; BOLLI, R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. **AM N Y Acad Sci**, 962: 18-41, 2002.
- DAWN, B.; XUAN, Y-T.; QIU, Y.; TAKANO, H.; TANG, X-L.; PING, P.; BANERJEE, S.; HILL, M.; BOLLI, R. Bifunctional role of protein tyrosine kinase in late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. **Circ Res**, 85: 1154- 1163, 1999.
- DECKING, U. K.; SCHLIEPER, G.; KROLL, K.; SCHRADER, J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. **Circ Res**, 81: 154-164, 1997.
- DE LA HABA, G.; CANTONI, G. L. The enzymatic synthesis of S-adenosylhomosysteine from adenosine and homosysteine. **J Biol Chem**, 234: 603-608, 1995.
- DEUSSEN, A.; BORST, M.; SCHRADER, J. Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart: an index of free intracellular adenosine. **Circ Res**, 63: 240-249, 1988.
- DEUSSEN, A.; LLOYD, H. G.; SCHRADER, J. Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. **J Mol Cell Cardiol**, 21: 773-782, 1989.

- DIMMELER, S.; FISSTHALER, B.; FLEMING, I.; ASSMUS, B.; HERMANN, C.; ZEIHNER, A. Shear stress stimulates the protein kinase Akt-involvement in the regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, 98: I-312, 1998.
- DOUGHERTY, C.; BARUCHA, J.; SCHOFIELD, P. R.; JACOBSON, K. A.; LIANG, B. T. Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A₁ or A₃ receptor. **FASEB J**, 12: 1785-1792, 1998.
- DUBEY, R. K.; GILLESPIE, D. G.; MI, Z.; JACKSON, E. K. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A_{2B} receptors. **Circulation**, 96: 2656-2566, 1997.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H.; Katp-fact or artifact? New thoughts on the mode of the potassium channel openers. **Cardiovasc Res**, 28: 735-737, 1994.
- EPAND, R. F.; MARTINOU, J. C.; MONTESSUIT, S.; EPAND, R. M. Membrane perturbations induced by the apoptotic Bax protein. **Biochem J**, 367: 849-855, 2002a.
- EPAND, R. F.; MARTINOU, J. C.; MONTISSUIT, S.; EPAND, R. M.; YIP, C. M. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. **Biochem Biophys Res Commun**, 298: 744-749, 2002b.
- FISHER, M. N.; NEWSHOLME, E. A. Properties of rat heart adenosine kinase. **Biochem J**, 221: 521-528, 1984.

- FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B. E.; BUSSE, R.
Phosphorylation of Thr(495) regulates $\text{Ca}^{(2+)}$ / calmodulin-dependent endothelial
nitric oxide synthase activity. **Circ Res**, 88: E68-E75, 2001.
- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species
in cell death signaling. **Biochimie**, 84: 131-141, 2002.
- FOZART, J. R.; PFANNKUCHE, H. J.; SCHUURMAN, H. J. Mast cell degranulation
following adenosine A_3 receptors activation in rats. **European Journal of
Pharmacology**, 298: 293-297, 1996.
- FRICK, G. P.; LOWENSTEIN, J. M. Vectorial production of adenosine by 5'-nucleotidase
in the perfused rat heart. **J Biol Chem**, 253: 1240-1244, 1978.
- FRY, D. W. Inhibitor of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinase as
an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible
inhibitors. **Pharmacol Ther**, 82: 207-218, 1999.
- FRY, D. W.; KRAKER, A. J.; MACMICHAEL, A.; AMBROSO, L. A.; NELSON, M.;
LEOPOLD, W. R.; CONNORS, R. W.; BRIDGES, A. J. A specific inhibitor of the
epidermal growth factor tyrosine kinase. **Science**, 265: 1093-1095, 1994.
- FRYER, R. M.; HSU, A. K.; ELLS, J. T.; NAGASE, H.; GROSS, G. J. Opioid-induced
second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels.
Circ Res, 84: 846-851, 1999.

- FRYER, R. M.; HSU, A. K.; GROSS, G. J. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. **Basic Res Cardiol**, 96: 136-142, 2001.
- FULTON, D.; GRATTON, J. P.; McCABE, T. J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRAKE, T. F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, 399: 597-601, 1999.
- FUSTER, V. **Syndromes of atherosclerosis**. Armonk, NY: Ed. Futura Publishing Co, 1996. 99-116.
- GARLID, K. D. Opening mitochondrial KATP in the heart: what happens, and what does not happen. **Basic Res Cardiol**, 95: 275-279, 2000.
- GAUTHIER, N. S.; HEADRICK, J. P.; MATHERNE, G. P. Myocardial function in the working mouse heart overexpressing cardiac A₁ adenosine receptors. **J Mol Cell Cardiol**, 30: 187-193, 1998.
- GOMTSYAN, A.; LEE, C. H. Non nucleoside inhibitors of adenosine kinase. **Curr Pharm**, 10: 1093-1103, 2004.
- GORMAN, M. W.; HE, M. X.; HALL, C. S.; SPARKS, H. V. Inorganic phosphate as regulator of adenosine formation in isolated guinea pig hearts. **Am J Physiol**, 272: H913-H920, 1997.

- GOTO, M.; LIU, Y.; YANG, X. M.; ARDELL, J. L.; COHEN M. V.; DOWNEY, J. M.
Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbits hearts. **Circ Res**, 77: 611-621, 1995.
- GORMAN, M. W.; HE, M. X.; HALL, C. S.; SPARKS, H. V. Inorganic phosphate as regulator of adenosine formation in isolated guinea pig hearts. **Am J Physiol**, 272: H913-H920, 1997.
- GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, 57: 707-736, 1995.
- GUAY, J.; LAMBERT, H.; GINGRAS BRETON, G.; LAVOIE, J. N.; HUOT, J.; LANDRY, J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. **J Cell Sci**, 110: 357-368, 1997.
- GUO, Y.; BAO, W.; TANG, X. L.; WU, W. J.; TAKANO, H.; BOLLI, R. Pharmacological preconditioning (PC) with adenosine A₁ and opioid δ 1 receptor agonists is iNOS-dependent. **Circulation**, 102: II-121, 2000.
- GUO, Y.; BAO, W.; WU, W. J.; SHINMURA, K.; TANG, X. L.; BOLLI, R. Evidence for an essential role of cyclooxygenase-2 as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning in mice. **Basic Res Cardiol**, 95: 479-484, 2000.
- GUO, Y.; BOLLI, R.; BAO, W.; WU, W. J.; BLACK, R. G. Jr.; MURPHREE, S. S.; SALVATORE, C. A.; JACOBSON, M. A.; AUCHAMPACH, A. Targeted deletion of the A₃ adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning. **J Mol Cell Cardiol**, 33: 825-830, 2001.

- GUO, Y.; JONES, W. K.; XUAN, Y. T.; TANG, X. L.; BAO, W.; WU, W. J.; HAM, H.; LAUBACH, V. E.; PING, P.; YANG, Z.; QUI, Y.; BOLLI, R. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of inducible NO synthase gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 11507-11512, 1999.
- HARRIS, M. B.; JU, H.; VENEMA, V. J.; LIANG, H.; ZOU, R.; MICHELL, B. J.; CHEN, Z. P.; KEMP, B. E.; VENEMA, R. C. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. **J Biol Chem**, 276: 16587-16591, 2001.
- HARRISON, G. J.; CERNIWAY, R. J.; PEART, J.; BERR, S. S.; ASHTON, K.; REGAN, S.; MATHERNE, G. P.; HEADRICK, J. P. Effects of A₃ adenosine receptor activation and gene knock-out in ischemic-reperfused mouse heart. **Cardiovascular Research**, 53: 147-155, 2002.
- HAUSENLOY, D. J.; MADDOCK, H. L.; BAXTER, G. F.; YELLON, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm in myocardial preconditioning. **Cardiovasc Res**, 55: 534-543, 2002.
- HAYNES, M. P.; SINHA, D.; RUSSELL, K. S.; COLLINGE, M.; FULTON, D.; MORALES-RUIZ, M.; SESSA, W. C.; BENDER, J. R. Membrane estrogen receptor engagement activates nitric oxide synthase via PI3-kinase_Akt pathway in human endothelial cells. **Circ Res**, 87: 677-682, 2000.
- HEADRICK, J. P.; HACK, B.; ASHTON, K. J. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 285: H1797-H1818, 2003.

- HEADRICK, J. P.; MATHERNE, G. P.; BERNE, R. M. Myocardial adenosine formation during hypoxia: effects of 5'-nucleotidase inhibition. *J Mol Cell Cardiol*, 24: 295-303, 1992.
- HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP. MRC/BHF Heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 360: 7-22, 2002.
- HILL, M.; KODANI, E.; SHINMURA, K.; TANG, X. L. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction despite nitrite tolerance. *Circulation*, 102: II-25, 2000.
- HOLMUHAMEDOV, E. L.; WANG, L.; TRZIC, A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in cardiac mitochondria. *J Physiol*, 519: 347-360, 1999.
- HOSHIDA, S.; KUZUAYA, T.; FUJI, H.; YAMASHITA, N.; OE, H.; HORI, M.; SUZUKI, K.; TANIGUCHI, N.; TADA, M. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 264: H33-H39, 1993.
- HUNTER, J. J.; CHIEN, K. R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 341: 1276-1283, 1999.
- IAMAGAWA, J.; BAXTER, G. F.; YELLON, D. M. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the "second window of protection" 48 hours after ischemic preconditioning in rabbit. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 1885-1893, 1997.

- IGARASHI, J.; MICHEL, T. Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase pathways. **J Biol Chem**, 276: 36281-36288, 2001.
- IMAHASHI, K.; SCHNEIDER, M. D.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism and prevents cytosolic acidification during ischemia and reduces ischemia-reperfusion injury. **Circulation**, 108: IV-297, 2003.
- JIANG, X.; NAKAJIMA, Y.; SATO, S. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice. **Anesthesiology**, 101: 82-88, 2004.
- JORDAN, J. E.; SATO, H.; VINTEN-JOHANSEN, J. Adenosine A₂ receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, seroxide generation and coronary endothelial adherence. **J Pharmacol Exp Ther**, 280: 301-309, 1997.
- KIRSCH, G. E.; CODINA, J.; BIRNBAUMER, L.; BROWN, A. M. Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 259: H820-H826, 1990.
- KIS, A.; BAXTER, G. F.; YELLON, D. M. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A₁ / A₂ receptor agonist: role of A_{2A} receptor and ERK1/2. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 17: 415-425, 2003.

- KITAKASE, M.; HORI, M.; MORIOKA, T.; MINAMINO, T.; TAKASHIMA, S.; SATO, H. et al. Infarct size-limiting effect of preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. *Circulation*, 89: 1237-1246, 1994.
- KODANI, E.; TANG, X. L.; TAKANO, H.; SHINMURA, K.; HILL, M.; BOLLI, R. The role of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, 32: A32, 2000.
- KOLOCASSIDES, K. G.; SEYMOUR, A-M. L.; GALIÑANES, M.; HEARSE, D. J. Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 28: 1045-1057, 1996.
- KOPFF, M.; ZAKRZEWSKA, I.; FUCHS-KALIMOWSKA, J.; KLEM, J.; STRZELCZYK, M.; PUCZKOWSKI, S. 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities in blood of patients with unstable angina pectoris. *Hematologia (BUDAP)*, 28: 223-231, 1997.
- KRENZ, M.; BAINES C. P.; YANG, X. M.; HEUSCH, G.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. Acute ethanol exposure fails to elicit preconditioning-like protection in situ rabbit hearts because of its continued presence during ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 37: 601-607, 2001.
- KRIEG, T.; QIN, Q.; Mc INTOSH, E. C.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M. ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H2322-H2330, 2002.

- KROLL, K.; DECKING, U. K.; DREIKON, K.; SCHRADER, J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res*, 73: 846-856, 1993.
- KUZUYA, T.; HOSHIDA, S.; YAMASHITA, N.; FUJI, H.; OE, H.; HORI, M.; KAMADA, T.; TODA, M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*, 72: 1293-1299, 1993.
- LEVITZKI, A. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 82: 231-239, 1999.
- LI, G. C.; VASQUEZ, J. A.; GALLAGHER, K. P.; LUCCHESI, B. R. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*, 82: 609-619, 1990.
- LIN, M. I.; FULTON, D.; BABBITT, R.; FLEMING, I.; BUSSE, R.; PRITCHARD, K. A.; SESSA, W. C. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem*, 278: 44719-44726, 2003.
- LIU, G. S.; THORNTON, J.; VAN WINKLE, D. M.; STANLEY, A. W. H.; OLSSON, R. A.; DOWNEY, J. M. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 84: 350-356, 1991.
- LIU, Y.; DOWNEY, J. M. Preconditioning against infarction in the rat heart does not involve a pertussis toxin sensitive G protein. *Cardiovasc Res*, 27: 608-611, 1993.

- LOCHNER, A.; GENADE, S.; TROMP, E.; PODZUWEIT, T.; MOOLMAN, J. A. Ischemic preconditioning and de beta-adrenergic signal transduction pathway. **Circulation**, 100: 958-966, 1999.
- LU, H. R.; REMEYSEN, P.; De CLERCK, F. Does the antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning in rats involve the L-arginine nitric oxide pathway? **J Cardiovasc Pharmacol**, 25: 524-530, 1995.
- MANGANELLO, J. M.; HUANG, J. S.; KOZASA, T.; VOYNO YASENETSKAYA, T. A.; LE BRETON, G. C. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the Galpha 13 switch-I region alters the Galphabeta gamma13-G protein-coupled receptor complex and inhibits Rho activation. **J Biol Chem**, 278: 124-130, 2003.
- MARBER, M. S.; LATCHMAN, D. S.; WALKER, J. M.; YELLON, D. M. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. **Circulation**, 88: 1264-1272, 1993.
- MARBER, M. S.; YELLON, D. M. Myocardial adaptation, stress proteins, and the second window of protection. **Ann N Y Acad Sci**, 793: 123-141, 1996.
- MARIN, R. M. **Efeitos de compostos quinazolinicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase em corações isolados de ratos**. Campinas, 2003. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).
- MARTIN, M.; ARAN, J. M.; COLOMER, D.; HUGUET, J.; CENTELLES, J. J.; VIVES-CORRONS, J. L.; FRANCO, R. Surface adenosine deaminase. A novel B-cell marker in chronic lymphocytic leukemia. **Hum Immunol**, 42: 265-273, 1995.

- MAROKO, P. R.; KJEKSHUS, J. K.; SOBEL, B. E.; WATANABE, T.; COVELL, J. W.; ROSS, J. Jr.; BRAUNWALD, E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. **Circulation**, 43: 67-82, 1971.
- MATHERNE, G. P.; LINDEN, J.; BYFORD, A. M.; GAUTHIER, N. S.; HEADRICK, J. P. Transgenic A₁ adenosine receptor overexpression increases myocardial resistance to ischemia. **Proc Nat Acad Sci USA**, 94: 6541-6546, 1997.
- MAULIK, N.; ENGELMAN, D. T.; WATANABE, M.; ENGELMAN, R. M.; MAULIK, G.; CORDIS G. A.; DAS, D. K. Nitric oxide signaling in ischemic heart. **Cardiovasc Res**, 30: 593-601, 1995.
- McMAHON et al., WO9810767; **Chem Abstr**, 128, 261949, 1998.
- MEGHJI, P.; MIDDLETON, K. M.; NEWBY, A. C. Absolute rates of adenosine formation during ischaemia in rat and pigeon hearts. **Biochem J**, 249: 695-703, 1988.
- MICHELL, B. J.; HARRIS, M. B.; CHEN, Z. P.; JU, H.; VENEMA, V. J.; BLACKSTONE, M. A.; HUANG, W.; VENEMA, R. C.; KEMP, B. E. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. **J Biol Chem**, 277: 42314-42351, 2002.
- MINARINI, A.; BUDRIESI, R.; CHIARINE, A.; LEONARDI, A.; MELCHIORRE, C. Search for x-adrenoceptor subtypes selective antagonist: design, synthesis and biological activity of cystazosin, an am-adrenoceptor antagonist. **Letters Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 8: 1353-1358, 1998.

- MIYAWAKI, H.; ZHOU, X.; ASHRAF, M. Calcium preconditioning elicit strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*, 79: 137-146, 1996.
- MOCANO, M. M.; BELL, R. M.; YELLON, D. M. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 34: 661-668, 2002.
- MONKADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 214-220, 2002.
- MORALES-RUIZ, M.; LEE, M. J.; ZOLLNER, S.; GRATTON, J. P.; SCOTLAND, R.; SHIOJIMA, I.; WALSH, K.; HLA, T.; SESSA, W. C. Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein / phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cell. *J Biol Chem*, 276: 19672-19677, 2001.
- MURPHY, E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res*, 94: 7-16, 2004.
- MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternate projections of mortality and disability cause 1990–2020: global burden of disease study. *Lancet*, 349: 1498-1504, 1997.
- MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136, 1986.

- MURRY, C. E.; RICHARD, V. J.; REIMER, K. A.; JENNINGS, R. B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*, 66: 913-931, 1990.
- MYERBURG, R. J. Sudden cardiac death: exploring the limits of our knowledge. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 12: 369-381, 2001.
- NAGA PRASAD, S. V.; BARAK, L. S.; RAPACCIUOLO, A.; CARON, M. G.; ROCKMAN, H. A. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by β -adrenergic receptor kinase1: a role in receptor sequestration. *J Biol Chem*, 276: 18953-18959, 2001.
- NAGA PRASAD, S. V.; ESPOSITO, G.; MAO, L.; KOCH, W. J.; ROCKAMN, H. A. G-By-dependent phosphoinositide 3- kinase activation in hearts whit in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem*, 275: 4693- 4698, 2000.
- NAKANO, A.; LIU, G. S.; HEUSCH, G.; DOWNEY, J. M.; COHEN, M. V. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 1159-1167, 2000.
- NEWBY, A. C.; WORKU, Y.; HOLMQUIST, C. A. Adenosine formation. Evidence for a direct biochemical link with energy metabolism. *Adv Myocardial*, 6: 273-284, 1985.
- NORTON, E. D.; JACKSON, E. K.; TURNER, M. B.; VIRMANI, R.; FORMAN, M. B. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A₁ receptor and A₂

receptor agonist on myocardial reperfusion injury. *Am Heart J*, 123: 332-338, 1992.

OHNO, M.; TAKEMURA, G.; MISAO, J.; HAYAKAWA, Y.; MINATOUGHCHI, S.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Apoptotic myocytes in infarct area in rabbit hearts be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ nick end-labeling. *Circulation*, 98: 1422-1430, 1998.

OSHEROV, N.; LEVITZKI, A. Epidermal-growth-factor-dependent activation of src-family kinases. *Eur J Biochem*, 225: 1319-1322, 1994.

PIERCE, K. L.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene*, 20: 1532-1539, 2001.

PING, P.; TAKANO, H.; ZHANG, J.; TANG, X. L.; QIU, Y.; LI, R. C.; BANERJEE, S.; DAWN, B.; BALAFONOVA, Z.; BOLLI, R. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res*, 84: 587-604, 1999a.

PING, P.; ZHANG, J.; HUANG, S.; CAO, X.; TANG, X. L.; LI, R. C.; ZHENG, Y. T.; QIU, Y.; CLERK, A.; SUGDEN, P.; HANG, J.; BOLLI, R. PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol*, 277: H1771-1785, 1999b.

- PING, P.; ZHANG, J.; ZHENG, Y. T.; LI, R. C.; DAWN B.; TANG, X. L.; TAKANO, H.; BALAFANOVA, Z.; BOLLI, R. Demonstration of selective, PKC-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinase during ischemic preconditioning in conscious rabbits. **Circ Res**, 85: 542-550, 1999.
- PIOMELLI, D.; GREENGARD, P. Lipxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signaling. **Trends Pharmacol Sci**, 11: 367-373, 1990.
- POST, H.; SCHULZ, R.; BEHRENDTS, M.; GRES, P.; UMSCHLAG, C.; HEUSCH, G. No involvement of endogenous nitric oxide in classical ischemic preconditioning in swine. **J Mol Cell Cardiol**, 32: 725-733, 2000.
- PU, Y.; CHANG, D. C. Cytosolic Ca(2+) signal is involved in regulating UV-induced apoptosis in hela cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 282: 84-89, 2001.
- QIN, S.; CHOCK, P. B. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase membrane recruitment in hydrogen peroxide-induced activation of PI3K and Akt. **Biochemistry**, 42: 2995-3003, 2003.
- REEVES, J. J.; JONES, C. A.; SHEEHAN, M. J.; VARDEY, C. J.; WHELAN, C. J. Adenosine A₃ receptors promote degranulation of rat mast cells in vitro and in vivo. **Inflamm Res**, 46: 180-184, 1997.
- REWCASTLE, G. W.; DENNY, W. A.; BRIDGES, A. J.; ZHOU, H.; CODY, D. R.; MCMICHAEL, A.; FRY, D. W. Adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal grow factor receptor. **J. Med. Chem**, 38: 3482-3487, 1996.

- SALA-NEWBY, G. B.; SKLADANOWSKI, A. C.; NEWBY, A. C. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J Biol Chem*, 274: 17789-17793, 1999.
- SALLOUM, F.; YIN, C.; XI, L.; KUKREJA, R. C. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circ Res*, 92: 595-597, 2003.
- SANADA, S.; ASANUMA, H.; TSUKAMOTO, O.; MINAMINO, T.; NODE, K.; TAKASHIMA, S.; FUKUSHIMA, T.; OGAI, A.; SHIMOZAKI, Y.; FUJITA, M.; HIRATA, A.; OKUDA, H.; SHIMOKAWA, H.; TOMOIKE, H.; HORI, M.; KITAKAZE, M. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation*, 110: 51-57, 2004.
- SANADA, S.; KITAKAZE, M.; PAPST, P. J.; ASANUMA, H.; NODE, K.; TAKASHIMA, S.; ASAKURA, M.; OGITA, H.; LIAO, Y.; SAKATA, Y.; OGAI, A.; FUKUSHIMA, T.; YAMADA, J.; SHINOZAKI, Y.; KUZUYA, T.; MORI, H.; TERADA, N.; HORI, M. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase-III inhibitors: the role of protein kinase-A and P38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation*, 104: 705-710, 2001.
- SASAKI, N.; SATO, T.; OHLER, A.; O'ROURKE, B.; MARBÁN, E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, 101: 439-445, 2000.

- SATO, T.; O'ROURKE, B.; MARBÁN, E. Modulation of mitochondrial ATP- dependent k^+ channels by protein kinase C. **Circ Res**, 83: 110-114, 1998.
- SCHEID, M. P.; WOODGETT, J. R. PKC/Akt: functional insights from genetic models. **Nat Res Mol Cell Biol**, 2: 760-768, 2001.
- SCHRADER, J.; GERLACH, E. Compartmentation of cardiac adenine nucleotides and formation of adenosine. **Pflügers Arch**, 267: 129-135, 1976.
- SCHRADER, W. P.; WEST, C. A.; STROMINGER, N. L. Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit brain. **J Histochem Cytochem**, 35: 443-451, 1987.
- SCHULTZ, J. J.; HSU, A. K.; NAGASE, H.; GROSS, G. J. TAN-67, a $\delta 1$ -opioides receptor agonist, reduces infarct size via activation of G_i/o proteins and KATP channels. **Heart Circ Physiol**, 43: H909-H914, 1998.
- SCHUTZ, W.; SCHRADER, J.; GERLACH, E. Different sites of adenosine formation in the heart. **Am J Physiol**, 240: H963-H970, 1981.
- SEVER, P. S.; DAHOLOF, B.; POULTER, N. R.; WEDEL, H.; BEEVERS, G.; CAULFIRLD, M.; COLLINS, R.; KJELDSSEN, S. E.; KRISTINSSON, A.; Mc INNES, G. T.; MEHLSSEN, J.; NIEMINEN, M.; O'BRIEN, E.; OSTERGREN, J.; ASCOT INVESTIGATORS. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-

Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. **Lancet**, 361: 1149-1158, 2003.

SHIMIZU, S.; IDE, T.; YANAGITA, T.; TSUJIMOTO, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. **J Biol Chem**, 275: 12321-12325, 2000.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of opoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, 399: 483-487, 1999.

SHIMOKAWA, H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. **J Cardiovasc Pharmacol**, 39: 319-327, 2002.

SHINMURA, A.; TANG, X. L.; XUAN, Y. T.; WANG, Y. T.; LIU, S. Q.; TACAÑO, H.; BHATNAGAR, A.; BOLLI, R. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 10197-10202, 2000.

SHINMURA, A.; XUAN, Y. T.; TANG, X. L.; KODANI, E.; HAN, H.; ZHU, Y.; BOLLI, R. Inducible nitric oxide synthase modulates Cyclooxygenase-2 activity in heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. **Circ Res**, 90: 602-608, 2002.

SIMONCINI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; BRASIL, D. P.; LEY, K.; CHIN, W. W.; LIAO, J. K. Interaction of estrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol- 3-OH kinase. **Nature**, 407: 538-541, 2000.

- SMALL, J. B.; REWCASTLE, G. W.; LOO, J. A.; GREIS, K. D.; CHAN, O. H.; REYNER, E. L.; LIPKA, E.; SHOWALTER, H. D.; VINCENT, P. W.; ELLIOTT, W. L.; DENNY, W. A. Tyrosine kinase inhibitors. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(phenylamino)quinazoline and 4-(phenylamino)pyrido [3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides bearing additional solubilizing functions. **J Med Chem**, 43: 1380-1397, 2000.
- SMITS, G. J.; Mc VEY, M.; COX, B. F.; PERRONE, M. H.; CLARK, K. L. Cardioprotective effects of the novel adenosine A₁ / A₂ receptor agonist AMP 579 in porcine model of infraction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 286: 611-618, 1998.
- SONG, C.; ZHANG, J.; GAO, J.; ZHENG, Y.; CAO, X.; WEAD, W.; BOLLI, R.; PING, P. Lck tyrosine kinase is a direct substrate of PKC ϵ in cardiac myocytes. **Circulation**, 102: II-211, 2000.
- SUN, J. Z.; KAUR, H.; HALLIWELL, B.; LI, X. Y.; BOLLI, R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo: direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. **Circ Res**, 73: 534-549, 1993.
- SUN, J. Z.; TANG, X. L.; PARK, S. W.; QIU, Y.; TURRENS, J. F.; BOLLI, R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. **J Clin Invest**, 97: 562-576, 1996.
- SZALAI, G.; KRISHNAMURTHY, R.; HAJNOCZKY, G. Apoptosis driven by PI3k-linked mitochondrial calcium signals. **EMBO J**, 18: 6349-6361, 1999.

- TAKANO, H.; BOLLI, R.; BLACK, R. G. Jr.; KODANI, E; TANG, X. L.; YANG, Z; BHATTACHARYA, S.; AUCHAMPACH, J. A. A₁ or A₃ adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. **Circ Res**, 88: 520-528, 2001.
- TAKANO, H.; BOLLI, R.; TANG, X. L.; YANG, Z; BLACK, R.; AUCHAMPACH, J. Activation of A₁ or A₃ receptors produces delayed protection against infarction in conscious rabbits by a mechanism involving KATP channels. **Circulation**, 100: I-56, 1999.
- TAKANO, H.; MANCHIKALAPUDI, S.; TANG, X. L.; QUI, Y.; RIZVI, A.; JADOON, A. K.; ZHANG, Q.; BOLLI, R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. **Circulation**, 98: 441-449, 1998.
- TAKANO, H.; TANG, X. L.; BOLLI, R. Differential roles of KATP channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. **Am Physiol Heart Circ Physiol**, 279: H2350-H2359, 2000.
- TAKANO, H.; TANG, X. L.; QIU, Y.; GUO, Y.; FRENCH, B. A.; BOLLI, R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. **Circ Res**, 83: 73-84, 1998.
- TEOH, L. K. K.; GRANT, R.; HULF, J. A.; PUGSLRY, W. B.; YELLON, D. M. The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass surgery. **Cardiovasc Res**, 53: 175-180, 2002.

- THOMTON, J. D.; LIU, G. S.; DOWNEY J. M. Pretreatment with pertussis toxin blocks the protective effects of preconditioning: evidence for a G-protein mechanism. *J Mol Cell Cardiol*, 25: 311-320, 1993.
- TONG, H.; CHEN, W.; STEENBERGEN, C.; MURPH, E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*, 87: 309-315, 2000.
- TONG, H.; ROCKMAN, H. A.; KOCH, W. J.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circ Res*, 94: 1133-1141, 2004.
- TONG, H.; STEENBERGEN, C.; KOCH, W. J.; MURPHY, E. G $\beta\gamma$ -dependent signaling pathway in ischemic preconditioning: a role for endosomal signaling. *Circulation*, 108: IV-37, 2003.
- TRITO, I.; D'ANDREA, D.; ERAMO, N.; SCOGNAMIGLIO, A.; De SIMONE, C.; VIOLANTE, A.; ESPOSITO, A.; CHIARIELLO, M.; AMBROSIO, G. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*, 80: 743-748, 1997.
- UEDA, S. MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*, 4: 405-414, 2002.
- UKITA, T.; NAKAMURA, Y.; KUBO, A.; YAMAMOTA, Y.; MORITANI, Y.; SARUTA, K.; HIGASHIJIMA, T.; KOTERA, J.; TAGAGI, M.; KIKKAWA, K.; OMORI, K. Novel potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitors: synthesis

- and biological activities of a series of 4-aryl-isoquinolinone derivatives. *J Med Chem*, 44: 2204-2218, 2001.
- VÄHÄSITA, T.; VIRTANEN, J.; SARASTE, A.; LOUTOLAHTI, M.; PULKKI, K.; VALTONEN, M.; VOPIO PULKKI, L. M.; SAVUNEN, T. Adenosine in myocardial protection given though three window opportunity. An experimental study with pigs. *Scand Cardiovasc J*, 35: 409-14, 2001.
- VANDEN ABEELE, F.; SKRYMA, R.; SHUBA, Y.; VAM COPPENOLLE, F.; SLOMIANNY, C.; ROUDBARAKI, M.; MAUROY, B.; WUYTACK, F.; PREVARSKAYA, N. Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell*, 1: 169-179, 2002.
- WAGNER, D. R.; BONTEMPS, F.; VAN DEN BERGHE, G. Existence and role of substrate cycling between AMP and adenosine in isolated rabbit cardiomyocytes under control conditions and in ATP depletion. *Circulation*, 90: 1343-1349, 1994.
- WARD, W. H.; COOK, P. N.; SLATER, A. M.; DAVIES, D. H.; HOLDGATE, G. A.; GREEN, L. R. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 48: 659-666, 1994.
- WESELCOUCH, E. O.; BAIRD, A. J.; SLEPH, P.; GROVER, G. J. Inhibition of nitric oxide synthesis does not affect ischemic preconditioning in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 268: H242-H249, 1995.

- WOOLFSON, R. G.; PATEL, V. C.; NEILD, G. H.; YELLON, D. M. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces infarct size by an adenosine-dependent mechanism. *Circulation*, 91: 1545-1551, 1995.
- XI, L.; JARRETT, N. C.; HESS, M. L.; KUKREJA, R. C. Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A-induced late cardioprotection: evidence from pharmacological inhibition and gene knockout mice. *Circulation*, 99: 2157-2163, 1999.
- XU, Z.; DOWNEY, J. M.; COHEN, M. V. AMP579 reduces contracture and limits infarction in rabbits heart by activating adenosine A₂ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38: 474-481, 2001.
- XU, Z.; YANG, X. M.; COHEN, M. V.; NEUMANN, T.; HEUSCH, G.; DOWNEY, J. M. Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist ANP 579 administered at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 2339-2347, 2000.
- XUAN, Y. T.; TANG, X. L.; BANERJEE, S.; TAKANO, H.; LI, R. C.; HAN, H.; QIU, Y.; LI, J. J.; BOLLI, R. Nuclear factor kappaB plays an essential role in the late phase of preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res*, 84: 1095-1109, 1999.
- XUAN, Y. T.; TANG, X. L.; QIU, Y.; BANERJEE, S.; TAKANO, H.; HAN, H.; BOLLI, R. Biphasic response of cardiac NO synthase to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol*, 279: H2360-H2371, 2000.

- YAMASHITA, N.; HASHIDA, S.; OTSU, K.; ASAH, M.; KUSUYA, T.; HORI, M.
Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide desmutase activation. **J Exp Med**, 189: 1699-1706, 1999.
- YAMASHITA, N.; HOSHIDA, S.; OTSUO, K.; ASAH, M.; KUZUYA, T.; HORI, M.
Involvement of cytokines in second window of ischemic preconditioning. **Br J Pharmacol**, 131: 415-422, 2000.
- YAMASHITA, N.; HOSHIDA, S.; TANIGUCHI, N.; KUZUYA, T.; HORI, M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia / reperfusion injury in the rat. **Circulation**, 98: 1414-1421, 1998.
- YAMASHITA, N.; NISHIDA, M.; HOSHIDA, S.; KUZUYA, T.; HORI, M.; TANIGUCHI, N.; KAMADA, T.; TADA, M. Induction of manganese super-oxide desmutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. **J Clin Invest**, 94: 2193-2199, 1994.
- YANG, Z.; CERNIWAY, R. J.; BYFORD, A. M.; BERR, S. S.; FRENCH, B. A.; MATHERNE, G. P. Cardiac overexpression of A₁-adenosine receptor protects intact mice against myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282: H949-H955, 2002.
- YELLON, D. M.; DOWNEY, J. M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. **Physiol Rev**, 83: 1113-1151, 2003.
- ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. The mitochondrion apoptosis: how Pandora's Box opens. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2: 67-71, 2001.

- ZHANG, H. Y.; McPHERSON, B. C.; LIU, H.; BAMAN, T.; Mc PHERSON, S. S.; ROCK, P.; YAO, Z. Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection. **J Pharmacol Exp Ther**, 30: 1012-1019, 2002.
- ZHAO, Z. Q.; BUDDE, J. M.; MORRIS, C.; WANG, N. P.; VELEZ, D. A.; MURAKI, S.; GUYTON, R. A.; VINTEN JOHANSEN, J. Adenosine attenuates reperfusion – induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. **J Mol Cell Cardiol**, 33(1): 57-68, 2001.
- ZHAO, Z. Q.; Mc GEE, S.; NAKANISHI, K.; TOOMBS, C. F.; JOHNSTON, W. E.; ASHAR, M. S.; VINTEN-JOHANSEN, J. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. **Circulation**, 88: 709-19, 1993.
- ZHAO, Z.; XI, L.; CHELLIAH, J.; LEVASSEUR, J. E.; KUKREJA, R. C. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A₁ receptors: evidence from gene-knockout mice. **Circulation**, 102: 902-907, 2000.
- ZOREF-SHANI, E.; KESSLER-ISEKSON, G.; SPERLING, O. Pathways of adenine nucleotide catabolism in primary rat cardiomyocyte cultures. **J Mol Cell Cardiol**, 20: 23-33, 1988.