

## EFEITO DO BLOQUEIO DA BIOSÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CORAÇÃO ISOLADO DE RATO

Tavares, J.G. P\*, Effting Jr, J.V.\*\*; Caricati-Neto, A.\*\*\*; Godoy, C. M. G.\*\*\*\*

\* Depto. Farmacologia/Universidade Federal de São Paulo, Doutorando, São Paulo – SP, Brasil.

\*\* Curso de Medicina/ Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Acadêmico de Medicina, Chapecó, Santa Catarina - SC, Brasil.

\*\*\*Depto. Farmacologia/Universidade Federal de São Paulo, Professor, São Paulo – SP, Brasil.

\*\*\*\*Instituto de Ciência e Tecnologia/Universidade Federal de São Paulo, Professor, São José dos Campos – SP, Brasil.

e-mail: gurjaogodoy@gmail.com

**Resumo:** Devido ao óxido nítrico (NO) ser uma molécula que exerce múltiplas funções no sistema cardiovascular, levantou-se a hipótese de haver uma participação relevante desta molécula sobre a resposta funcional do coração. Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o efeito de fármaco capaz de reduzir a geração de NO, ou seja, o L-NAME, sobre a funcionalidade de coração isolado de rato em Montagem de Langendorff em circulação fechada. Os resultados mostraram que no grupo Controle (sem L-NAME) há uma diminuição progressiva da frequência cardíaca (FC), da pressão ventricular esquerda (PVE), do fluxo de perfusão (FP) e da resistência ao fluxo de perfusão (RF). Estes parâmetros se anularam aos 70 minutos de experimentos. No grupo L-NAME (adição de 1 micro Molar na solução de perfusão do coração) também foi observado efeito inibitório sobre esta resposta funcional do coração isolado. Porém, diferente do observado no grupo Controle, há uma diminuição menos acentuada na FC, na PVE e no FP, sendo que este último está evidentemente aumentado, em relação ao Controle, durante todo o tempo do experimento (120 minutos). A RF na presença de L-NAME foi, desde o início dos experimentos, menor em relação à da condição Controle. Conclui-se que a inibição da biossíntese de NO atenua a diminuição da resposta funcional do coração em montagem de Langendorff com circulação fechada.

**Palavras-chave:** óxido nítrico, coração, Langendorff.

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is a molecule that plays multiple roles in the cardiovascular system and as a consequence it should have important participation on the functional response of isolated hearts. Thus, the goal of the present work was to characterize the effect of a drug capable of reducing NO generation (L-NAME) on the functionality of rat hearts in closed-loop circulation Langendorff setup. The results showed that in the control group (no L-NAME in the rat heart perfusion) there is a progressive decay in the cardiac rate (CR), left ventricular pressure (LVP), cardiac

*perfusion flux (PF) and resistance to cardiac perfusion flux (RF). These parameters nullified at 70 min of the experiments. As for the L-NAME group (1 micro Molar L-NAME added to rat heart perfusion), it was also observed a decrease in the cardiac functionality. However, distinctly from what occurred in the control condition, there was a less pronounced decay in CR, LVP and PF. The PF parameter kept its value higher than the control group during the entire experiment time. The RF parameter was lower at L-NAME group, in relation to control group. As a conclusion, the results suggest that the NO synthesis inhibition attenuates the decay of the cardiac functional responses.*

**Keywords:** nitric oxide, heart, Langendorff.

### Introdução

Na área de cardiologia clínica, o método de perfusão de coração isolado desenvolvido por Langendorff tem sido considerado como uma metodologia alternativa para a preservação do coração visando o transplante cardíaco [1]. Diversas moléculas estão envolvidas no funcionamento das células cardíacas que por sua vez determinam a funcionalidade de todo órgão. Uma importante molécula sinalizadora de diversas funções intra e extra celulares é o óxido nítrico (NO). Este gás desempenha um importante papel na regulação e na proteção do coração [2]. Devido à baixa capacidade de transporte de oxigênio pela solução de perfusão, é necessário um alto fluxo coronariano para adequada oxigenação do tecido cardíaco. Apesar de necessário, é razoável considerar que este aumento do fluxo coronariano poderia levar a uma disfunção endotelial, o que, por sua vez, poderia alterar os níveis de NO produzidos pela amostra.

Devido ao NO ser também uma molécula que exerce múltiplas funções no sistema cardiovascular, entre elas, sinalizar a vasodilatação coronariana e exercer também influência sobre a incidência de apoptose [3, 4, 5, 6], a proliferação celular [7], o controle das concentrações de cálcio transiente nos cardiomiócitos [8, 9], entre outras funções, suscitou-se a hipótese de haver uma

participação relevante desta molécula sobre a resposta funcional do coração isolado em circuito fechado.

A resposta funcional do coração, caracterizada e analisada em trabalhos anteriores efetuados pelo grupo [10, 11, 12] foi o que inspirou o levantamento da hipótese, uma vez que naquela na condição estudada (Montagem de Langendorff em circulação fechada), ocorreu importante redução da funcionalidade cardíaca.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o efeito de fármaco capaz de reduzir a geração de NO sobre a funcionalidade de coração isolado em Montagem de Langendorff em circulação fechada.

### Materiais e Métodos

Os animais (ratos Wistar machos, 3 meses, provenientes da CEDEME – UNIFESP/SP) foram submetidos à eutanásia por concussão cerebral, sendo então decapitados e seus corações retirados após rápida abertura da caixa torácica e dissecação. Este procedimento está de acordo com o aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP-UNIFESP). Após a remoção do coração, o mesmo foi colocado em uma placa de Petri e submetido à limpeza, retirando estruturas circunvizinhas que permanecem junto à amostra, sendo em seguida posicionado através de ligadura a uma cânula (inserida na artéria aorta) fixada na montagem experimental (preparação de Langendorff), para assim ser perfundido retrogradamente com solução de K-H a 34,5°C (Fig. 1).

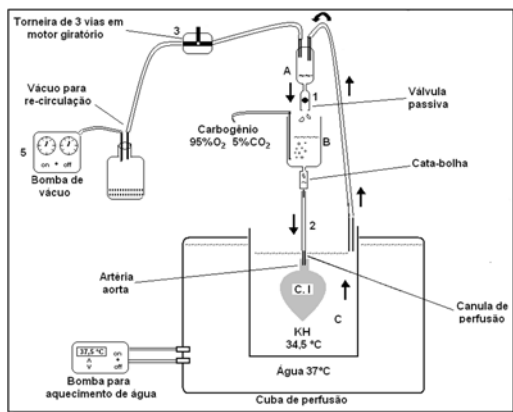


Figura 1: Ilustração da montagem experimental de Langendorff de circulação fechada. A solução passa do reservatório (B) por uma coluna com 80cm de altura (2) e perfunde o coração isolado (CI) em uma câmara com solução aquecida (C). Para re-circular a solução, uma bomba (5) gera vácuo na câmara A a qual suga a solução da câmara C. Em seguida, o vácuo é interrompido, fazendo com que a solução passe, via válvula passiva (1), da câmara A para o reservatório B, perfundindo novamente o CI. Para que o sistema ora gere vácuo, ora permita a entrada de ar na câmara A, é utilizada uma torneira de 3 vias acoplada a um motor giratório (3). Os sistemas de captação, amplificação e aquisição dos parâmetros cardíacos estão omitidos nesta ilustração e descritos no texto.

O traçado do ECG é captado pelos eletrodos de captação de referência, imersos na solução KH que banha o coração, e amplificado por amplificador de biopotenciais. A Pressão Ventricular Esquerda é captada através do transdutor de pressão, colocado numa derivação da coluna 2 (Figura 1) e amplificada por amplificador de biopotenciais. Estes parâmetros são visualizados em um osciloscópio e registrados através de um sistema computadorizado para aquisição de dados. O fluxo da perfusão é captado através da contagem do gotejamento no “cata-bolha” (figura 2), durante 1 minuto.

Utilizamos fármaco L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine methyl Ester), que é inibidor não seletivo da enzima da NO sintetase capaz de bloquear a biossíntese de NO. Este fármaco foi adicionado à solução de perfusão numa concentração final de 1 μM, diluídos de soluções estoques mais concentradas.

Para a análise da funcionalidade cardíaca na ausência de fármaco (grupo Controle Fechado) e na presença de L-NAME (grupo L-NAME), foram quantificados três parâmetros fisiológicos: frequência cardíaca (FC), pressão ventricular esquerda (PVE) e fluxo da perfusão cardíaca (FP). Também foi calculada a resistência ao fluxo de perfusão (RF) a partir da expressão:  $RF = PVE / FP$ .

### Resultados

Na Figura 2, apresentamos o efeito do tempo de experimento sobre parâmetros funcionais do coração nos grupos Controle Fechado e L-NAME. No que se refere ao grupo Controle Fechado, verifica-se uma diminuição progressiva da frequência cardíaca (FC), da pressão ventricular esquerda (PVE) e do fluxo de perfusão (FP). Estes parâmetros se anulam aos 70 minutos de experimentos. Ao inibir sua síntese do NO utilizando o fármaco L-NAME, também observamos um efeito inibitório sobre esta resposta funcional do coração isolado. Porém, diferente do observado no grupo Controle Fechado, há uma diminuição menos acentuada na FC, na PVE e no FP, sendo que este último está evidentemente aumentado, em relação ao Controle, durante todo o tempo do experimento.

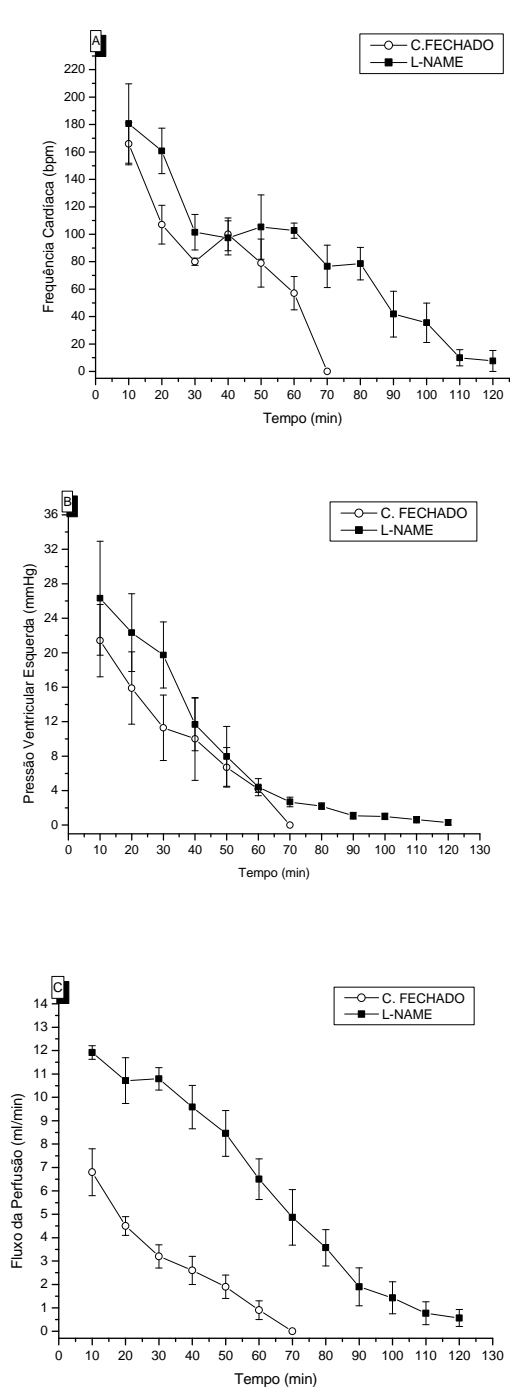


Figura 2: Gráfico ilustrando as médias (com erro padrão) da (A) Freqüência Cardíaca, (B) Pressão Ventricular Esquerda e (C) Fluxo da Perfusão nos grupos “Controle fechado” (N = 5), “L-NAME”(N = 4), ao longo do tempo de experimento.

Na Figura 3, ilustra-se a diminuição da resistência ao fluxo de perfusão (RF) com a adição do L-NAME à solução.

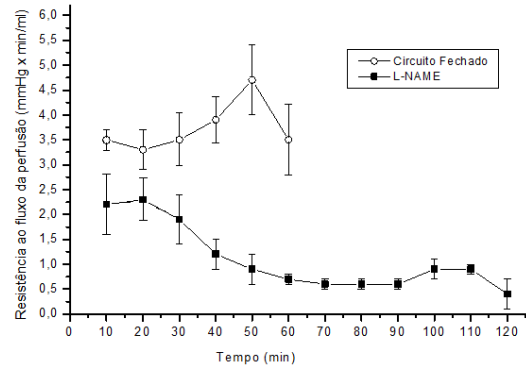


Figura 3: Gráfico ilustrando as médias (com erro padrão) da Resistência ao Fluxo de Perfusão (RF) nos grupos “Circuito Fechado” (N=5) e L-NAME (N=4) ao longo do tempo experimento.

Observa-se, até 60 minutos do tempo de experimento, que a resistência ao fluxo na presença de L-NAME é menor em relação à da condição Controle (Circuito Fechado). A partir de 20 minutos de experimento, RF diminui gradativamente até atingir valor próximo de zero aos 120 min.

## Discussão

Na literatura não foi possível encontrar trabalhos que abordassem o uso deste fármaco em corações isolados nas mesmas condições experimentais utilizadas no presente trabalho (circuito fechado com baixo volume circulante). No entanto, no que diz respeito aos corações isolados perfundidos retrogradamente (técnica de Langendorff original), existem relatos de efeitos inotrópicos positivos e negativos mediados pelo NO. Em alguns trabalhos, como de Kojda e colaboradores [13], foram observados efeitos inotrópicos negativos após a perfusão de corações de ratos com bloqueadores da enzima sintetizadora do NO (L-NOARG e L-NMMA, 0,1 e 1,0 mM), enquanto o uso de doadores de NO causou um efeito inotrópico positivo.

A adição de fármaco que leva à diminuição do NO (L-NAME) resultou numa redução ainda maior no fluxo de perfusão, chegando, em relação aos grupos nas condições controle em circuito aberto ou circuito fechado, a uma diminuição de aproximadamente 90%. Estes dados corroboram achados da literatura que estabelecem que o NO tem importante participação na vasodilatação coronariana [14, 15, 16], o que confirma o envolvimento ativo, e complexo, do NO nas respostas do coração isolado observadas no presente trabalho.

## Conclusão

Em suma, conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo sugerem haver uma capacidade de atenuação da diminuição da resposta funcional do coração por meio da inibição da biossíntese do NO. No entanto, ainda faz-se necessário uma investigação mais aprofundada, como com outras doses do L-NAME e fármacos doadores de NO e, principalmente, um melhor

entendimento do modelo experimental utilizado, para que se possa afirmar que a melhora na resposta funcional exercida pelo bloqueio da biossíntese de NO seja uma resposta cardioprotetora.

### Agradecimentos

Aos órgãos financiadores: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### Referências

- [1] Fitton TP, Wei C, Lin R, Bethea BT, Barreiro CJ, Amado L et al. Impact of 24 h continuous hypothermic perfusion on heart preservation by assessment of oxidative stress. *Clinical Transplantation*. 2004; 18: 22-27.
- [2] Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning - A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100(4): 295-310.
- [3] Nishio, E. et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996; 221(1): 163-168.
- [4] Sam F. et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. *Circ. Res*. 2001; 89(4): 351-356.
- [5] Patten RD et al. Ventricular assist device therapy normalizes inducible nitric oxide synthase expression and reduces cardiomyocyte apoptosis in the failing human heart. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2005; 45(9): 1419-1424.
- [6] Ravavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol. Ther*. 2005; 106(2): 147-162.
- [7] Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail. Rev*. 2002; 7(4): 317-325.
- [8] Stojanovic MO et al. Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol*. 2001; 281(1): C342-C349.
- [9] Ziolo MT et al. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca<sup>2+</sup> transients. *Circulation*. 2004; 109(15): 1886-1891.
- [10] Necchi-Júnior JA, Oliveira MM, Godoy CMG. Dispositivo para Recirculação de Solução à Vácuo para Montagem Experimental de Langendorff. In: *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, 2006; São Pedro, São Paulo, Brasil.
- [11] Effing Junior JV, Necchi Junior JS, Caricati-Neto A, Godoy CMG. Parâmetros eletrofisiológicos de coração de rato em preparação de Langendorff com circulação fechada e de baixo volume: influência do bloqueio colinérgico. In: *IFMBE Proceedings of IV Latin American Congress on Biomedical Engineering (CLAIB)*, 2007, Caracas, Venezuela, 2007. v. 18. p. 611-614.
- [12] Effing Junior JV, Tavares, JGP; Alves BJ, Vasques ER, Nechi Júnior JÁ, Caricati Neto A, Godoy CMG. Estudo da Participação de Mecanismos Colinérgicos Muscarínicos na Resposta Funcional do Coração de Rato Perfundido em Sistema de Langendorff de Circulação Fechada. In: *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, 2008, Salvador, Bahia, Brasil.
- [13] Kojda G, Kottenberg K, Noack E. Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. *Eur. J. Pharmacol*. 1997; 33(2-3): 181-190.
- [14] Ignarro LJ et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res*. 1987; 61(6): 866-879.
- [15] Ignarro LJ. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 1. ed. San Diego, USA: Academic Press, 2000. v. 1.
- [16] Ignarro, L. J Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol Pharmacol*. 2002; 53(4 Pt 1): 503-514.