Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal

Avaliação do metabolismo do monóxido de azoto eritrocitário

Nuno Miguel Henriques Duro

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal

Avaliação do metabolismo do monóxido de azoto eritrocitário

Dissertação orientada pela Doutora Patrícia Alexandra Veloso Napoleão (Instituto de Medicina Molecular, Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação) e pela Doutora Ana Maria de Lima Viegas Gonçalves Crespo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal)

Nuno Miguel Henriques Duro

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

“Aprender sem pensar é tempo perdido.”
Confúcio

Agradecimentos

Na elaboração deste trabalho foram muitas as pessoas que me auxiliaram e quero, por isso, aqui deixar o meu agradecimento às que foram essenciais à sua concretização.

Quero agradecer à Professora Doutora Carlota Saldanha e à Doutora Patrícia Napoleão por terem sido as minhas co-orientadoras na Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação (UBiMI) no Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina de Lisboa. Por me terem permitido trabalhar num excelente grupo de trabalho, por me terem dado a possibilidade de aumentar a minha formação através de cursos e de seminários, por todos os conhecimentos transmitidos, por me terem feito "crescer" enquanto investigador e pessoa, por me terem ajudado a manter a calma quando as coisas não corriam como esperado e pelo ENORME e CANSATIVO trabalho que tiveram na correcção da minha tese. Muito OBRIGADO.

Quero agradecer à toda a equipa da UBiMI por todo o apoio que me deram, em especial às duas pessoas que lidavam comigo no laboratório, à Teresa Freitas por todo o apoio e conhecimento que me deu durante à realização desta tese e ao Daniel "teló" pelas conversas, pela companhia e pelos cafés matinais para despertar.

Quero agradecer à Doutora Ana Crespo por ter aceitado ser minha orientadora, por ter confiado em mim e ter-me dado a possibilidade de me inserir neste grande grupo de trabalho.

Quero agradecer à Doutora Deodália Dias por me ter dado a possibilidade de frequentar o mestrado em Biologia Humana e Ambiente e por todo o apoio e motivação.

Quero agradecer às duas pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais. Por me apoiarem em todas as minhas decisões, por nunca terem duvidado de mim, por me meterem sempre em primeiro lugar, pela vida que me proporcionaram e pelo enorme esforço e sacrifício que têm feito para eu poder chegar ao fim do mestrado. OBRIGADO!

Quero agradecer ao meu irmão que apesar de só ter 12 anos sempre se interessou pelo meu trabalho e sempre me tentou ajudar no que podia, pelas noites que passou sem televisão para que eu pudesse escrever e pela companhia que me fez.

Quero agradecer aos meus avos por tudo o que me têm feito e por todo o apoio que me têm dado.

Quero agradecer à Joana, que mais que uma namorada foi uma amiga que sempre esteve ao meu lado durante os últimos 4 anos. Quero agradecer pela compreensão que teve nas alturas menos boas, por sempre me ter apoiado e por estar sempre disponível quando precisei. Obrigado por tudo, és muito importante!!

Quero agradecer aos meus amigos de" rua" Ivo, Diogo, Gonçalo, Ricardo, Dede e Guismo pelos momentos de descontracção e divertimento.

Quero agradecer ao Mário pelas palhaçadas e momentos divertidos que passamos durante a licenciatura e que continuamos a passar e ao André pela companhia e por todos estes Verões que passamos juntos no Algarve.

Resumo

O monóxido de azoto (NO) é formado nas células endoteliais vasculares, difundindo-se para os eritrócitos, onde regula a deformabilidade e agregação eritrocitárias, e para a parede vascular onde promove o relaxamento do músculo liso e, por conseguinte, o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos levando ao aumento do fluxo sanguíneo e à redução da pressão arterial. A redução da biodisponibilidade de NO e a consequente disfunção endotelial desencadeiam eventos precursores da formação da placa aterosclerótica. Como tal o estudo do metabolismo do NO eritrocitário pode contribuir para a compreensão da disfunção endotelial e patologias associadas. O objectivo deste estudo foi avaliar o metabolismo do NO eritrocitário em condições fisiológicas normais e em condições agudas de disfunção endotelial e inflamação (doentes com enfarte agudo do miocárdio – AMI). Para atingir o objectivo proposto, procurou-se estudar *in vitro* os efeitos da alteração conformacional da acetilcolinesterase (AChE), e da inibição/activação enzimática da proteína cinase C (PKC) sobre o metabolismo do NO eritrocitário. Ambos os efeitos foram estudados na presença/ausência de acetilcolina (ACh). Foi também realizado um ensaio *ex vivo* que teve como objectivo avaliar marcadores do metabolismo do NO eritrocitário em doentes na fase aguda do AMI. Os resultados obtidos demonstram que: (1) a AChE tem um papel regulador na mobilização do NO eritrocitário e na concentração intra-eritrocitária de nitrosoglutatião (GSNO); (2) o grau de fosforilação do complexo 4.1 R e da proteína banda 3 influencia o efluxo de NO e a concentração intra-eritrocitária de GSNO; (3) as alterações do grau de fosforilação da proteína banda 3 e do complexo 4.1 R favorecem uma maior concentração intra-eritrocitária de S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb), nitratos e nitritos independentemente do efluxo de NO eritrocitário. Em relação ao estudo *ex vivo*, verificou-se que os eritrócitos de doentes com AMI apresentaram menor tendência no efluxo de NO e menor concentração intra-eritrocitária de GSNO.

Palavras-chave: Eritrócito, Acetilcolina, Acetilcolinesterase, Proteína cinase C

Abstract

Formed in the endothelial cells, the nitric oxide (NO) spreads into erythrocytes, where it regulates erythrocyte deformability and aggregation, and into the vascular wall where it causes vascular smooth muscle relaxation and therefore increasing the diameter of blood vessels leading to blood flow rise and arterial pressure decrease. The reduction of NO bioavailability and subsequent endothelial dysfunction trigger events that lead to formation of atherosclerotic plaques. Therefore, the study of erythrocyte NO metabolism can contribute to the understanding of endothelial dysfunction and associated diseases. This research aimed to assess the erythrocyte NO metabolism under normal physiological conditions and under acute conditions of endothelial dysfunction and inflammation (patients with acute myocardial infarction - AMI). To achieve the objective, the effect of conformational change in acetilcolinesterase (AChE) and of enzymatic inhibition/activation of protein kinase C (PKC) on erythrocyte NO metabolism was investigated *in vitro*. Both effects were studied in the presence/absence of acetylcholine (ACh). Furthermore, an *ex vivo* assay that aimed to assess various markers of erythrocyte NO metabolism was conducted in patients with AMI. The results demonstrate that: (1) AChE has a regulating role in the mobilization of erythrocyte NO and intra- erythrocyte concentration of S-nitrosoglutathione (GSNO), (2) the degree of phosphorylation of complex 4.1 R and protein band 3 influences the efflux of erythrocyte NO and intra-erythrocyte concentration of GSNO, (3) changes in the degree of phosphorylation of complex 4.1 R and protein band 3 favor a higher intra-erythrocyte concentration of S-nitrosohemoglobin (SNO-Hb) , nitrates and nitrites regardless of erythrocyte NO efflux. Regarding the *ex vivo* study, the results seem to suggest a trend for lower erythrocyte NO efflux and a lower intra- erythrocyte concentration of GSNO in AMI patients.

Keywords: Erythrocyte, Acetylcholine, Acetylcholinesterase, Protein kinase C

Índice

Agradecimentos i

Resumo iii

Abstract iv

Índice de figuras vii

Índice de tabelas viii

Estado de Arte 1

1. Eritrócitos 1

1.1 Membrana dos Eritrócitos 1

1.2 Agregação e Deformabilidade Eritrocitárias 3

2. Função Endotelial 5

3. Monóxido de Azoto 5

4. Acetilcolina 7

5. NO, Função Endotelial e Aterosclerose 9

5.1 Formação da Placa Aterosclerótica 10

5.1 Enfarte Agudo do Miocárdio 11

Objectivos 12

Material e Métodos 12

Lista de material 12

Lista de anticorpos 13

Lista de reagentes 13

Protocolo de recolha de sangue 13

6. Estudo *In Vitro* 14

6.1 Caracterização do Grupo de Estudo 14

6.2 Modelo Experimental 14

6.3 Procedimento Experimental 15

6.3.1 Determinação da Concentração do NO Eritrocitário 15

6.3.2 Determinação da SNO-Hb 16

6.3.3 Determinação dos Peroxinitritos 16

6.3.4 Determinação da Concentração dos Nitritos, Nitratos e GSNO nos Eritrócitos 17

6.4 Análise Estatística 18

7. Estudo *Ex Vivo* 18

7.1 Caracterização do Grupo de Estudo 18

7.2 Protocolo Experimental 19
7.3 Procedimento Experimental 20
7.3.1 Determinação da Deformabilidade Eritrocitária 20
7.3.2 Determinação da Agregação Eritrocitária 20
7.4 Análise Estatística 21
Resultados 22
8. Ensaio *In Vitro* 22
8.1 Efeito da Alteração Conformacional da AChE 22
8.1.1 Efeito do bloqueio do domínio N terminal da AChE 22
8.1.2 Efeito do bloqueio do domínio C terminal da AChE 24
8.2 Efeito da Inibição/Activação Enzimática da PKC 25
8.2.1 Inibição enzimática da PKC com Cheleretrina 25
8.2.2 Activação enzimática da PKC com PMA 28
9. Ensaio *Ex Vivo* 31
9.1 Caracterização do Grupo de Estudo 31
9.2 Caracterização Hematológica e Hemorreológica do Grupo de Estudo 32
9.3 Comparação entre géneros 34
9.4 Comparação entre Classes de Factores de Risco 35
Discussão 36
Considerações finais 42
Referências bibliográficas 44
Anexos 51

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de tradução de sinal do NO e dos seus metabólitos derivados nos eritrócitos……..…8

Figura 2. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção N terminal da AChE, na presença e ausência de ACh……..22

Figura 3. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção C terminal da AChE, na presença e ausência de ACh…….....24

Figura 4. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição da cheleretrina, na presença e ausência de ACh…….....26

Figura 5. Média e desvio padrão dos valores de concentração de SNO-Hg, nitratos e nitritos com a adição da cheleretrina, na presença e ausência de ACh…..…… 26

Figura 6. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do PMA, na presença e ausência de ACh…….…….....…28

Figura 7. Média e desvio padrão dos valores de concentração de SNO-Hg, nitratos e nitritos com a adição do PMA, na presença e ausência de ACh……..29

Índice de tabelas

Tabela 1. Efeito de várias situações patológicas na agregação e deformabilidade eritrocitária…….....4

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos doentes com AMI……..…..31

Tabela 3. Medicação pré-evento dos doentes com AMI……...……..32

Tabela 4. Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI…….….33

Tabela 5. Valores dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI distribuídos por género……..….34

Tabela 6. Valores dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI distribuídos pelas três classes de factores de risco…….…….35

Tabela 7. Variação do efluxo de NO e das concentrações intra-eritrocitárias de GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos com a adição de ACh, AChE N-19, AChE C-16, Che, PMA, em relação aos valores controlo……...……..……42

Lista abreviaturas

ACh – Acetilcolina, do inglês *Acetylcholine*

AChE – Acetilcolinaesterase, do inglês *Acetylcholinesterase*

AMI – Enfarte agudo do miocárdio, do inglês *Acute myocardial infarction*

CAD – Doença das artérias coronárias, do inglês *Coronary artery Disease*

Che – Cheleretrina, do inglês *Cheleretrine*

CVD – Doenças Cardiovasculares, do inglês *Cardiovascular diseases*

DAF-2 – 4,5-diaminofluoreceina, do inglês *4,5-diaminofluorecein*

DCF-DA – 2,7-diclorofluoresceína diacetato, do inglês *2',7'dichlorfluorescein diacetate*

GE – Enzimas glicoliticas, do inglês *Glycolytic enzymes*

GP – Glicoforinas, do inglês *Glycophorin*

GPA – Glicoforina A, do inglês *Glycophorin A*

GPI – Glicosil-fosfatidil-inositol, do inglês *Glycophospholipidinositol*

GSH – Glutatião, do inglês *Glutathione*

GSNO – Nitrosoglutatião, do inglês *S-Nitrosoglutathione*

Ht – Hematócrito, do inglês *Hematocrit*

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *Low density lipoproteins*

NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)*

NO – Monóxido de azoto, do inglês *Nitric oxide*

NOS – monóxido de azoto sintase, do inglês *Nitric oxide synthase*

ox-LDL – Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, do inglês *Oxidative low density lipoproteins*

PKA – Proteína cinase A, do ingles *Protein kinase A*

PKC – Proteína cinase C, do ingles *Protein kinase C*

PMA – Acetato de forbol miristrato, do inglês *Phorbol myristate acetate*

PTK – Proteína tirosina cinase, do inglês *Protein tyrosine kinases*

PTP – Proteína tirosina fosfatase, do inglês *Protein tyrosine phosphatases*

ROS – Espécies reactivas de oxigénio, do inglês *Reactive oxygen species*

SNO-Hb – S-nitrosohemoglobina, do inglês *S-nitrosohemoglobin*

SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais, do inglês *Software Statistical Package for the Social Sciences*

Estado de Arte

1. Eritrócitos

O sangue é composto pelo plasma e por outros componentes como os eritrócitos, as plaquetas e os leucócitos (Seeley *et al.*, 2005).

Os eritrócitos são os principais componentes do sangue, sendo produto de uma diferenciação que começa na medula óssea onde as células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em eritrócitos nucleados. Após a extrusão do núcleo e da degradação do retículo endoplasmático, formam-se os reticulócitos, que em circulação rapidamente se transformam em eritrócitos maduros (Seeley *et al.*, 2005). Os eritrócitos apresentam a forma de disco bicôncavo com aproximadamente 8 µm de diâmetro, delimitados por uma membrana plasmática, exibindo em circulação um tempo de vida de 120 dias (Seeley *et al.*, 2005). O seu maior constituinte citoplasmático é a hemoglobina, que é responsável pela ligação e libertação do oxigénio e transporte do monóxido de azoto (NO) (Seeley *et al.*, 2005).

1.1 Membrana dos Eritrócitos

A membrana eritrocitária é composta por uma dupla camada lipídica assimétrica, à qual várias proteínas estão associadas. Esta estrutura permite separar os fluidos intra- e extracelulares, seleccionar nutrientes, iões e gases, conferindo também a capacidade de deformação aos eritrócitos (Seeley *et al.*, 2005).

Foram identificadas 340 proteínas diferentes na membrana dos eritrócitos, destacando-se a banda 3 e a glicoforina A (GPA) como as mais abundantes (Steck, 1974).

As proteínas de membrana podem ser classificadas como periféricas quando estão associadas apenas a uma face da dupla camada, ou como integrais quando estão inseridas na dupla camada lipídica através do seu domínio hidrofóbico. No entanto também podem ser divididas em: (1) proteínas que fazem parte do citoesqueleto como é o caso da espectrina e da actina (Yawata, 2003); (2) proteínas integrais, que incluem as proteínas que integram a dupla camada lipídica como a banda 3 e as glicoforinas (GPs);

e (3) proteínas periféricas que se associam à membrana através de uma ligação em âncora como a anquirina e a proteína 4.2 (Yawata, 2003).

De acordo com Yu e Branton (1976) a banda 3 é uma proteína integral presente na membrana dos eritrócitos que possui dois domínios, o N- e o C-terminal. O primeiro domínio é citoplasmático e responsável pelo principal ponto de ligação com o citoesqueleto, onde se ligam a anquirina, proteína 4.1, proteína 4.2, enzimas glicolíticas (GEs) e a hemoglobina, apresentando um papel muito importante na flexibilidade e rigidez dos eritrócitos (Yu e Branton, 1976). O domínio C-terminal é responsável pela troca de iões e pela ligação com a anidrase carbónica (Yu e Branton, 1976).

A configuração da proteína banda 3 pode ser modelada através da fosforilação provocada pela proteína tirosina cinase (PTK) (Mohamed e Steck, 1986) ou da desfosforilação provocada pela proteína tirosina fosfatase (PTP) (Yannoukakos *et al*., 1981). Estas alterações fosforilativas são responsáveis pela libertação das GEs para o citoplasma, aumentando a via glicolítica (Philip *et al*., 1987).

As GPs representam aproximadamente 2% das proteínas totais da membrana (Yawata, 2003). Devido ao seu conteúdo em ácido siálico, estas proteínas contribuem em 60% para a carga negativa total dos eritrócitos, tendo um papel muito importante na modelação das interacções entre os eritrócitos e entre estes e o endotélio (Winzler, 1970). A glicoforina A (GPA) é a mais abundante e estabelece ligação com a proteína banda 3, participando na troca de iões. Das glicoforinas presentes na membrana dos eritrócitos destacam-se também, apesar de em menores quantidades, as glicoforinas B/E e C/D (Yawata, 2003).

As proteínas glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) apresentam estruturas lipoglicolíticas complexas, com uma região central comum, e possuem um papel regulador sobre muitas proteínas de membrana, como enzimas (acetilcolinaesterase), proteínas imunológicas e receptores (Caras *et al*., 1989).

A anquirina tem como principal função a criação de uma forte associação entre a espectrina e a banda 3, no entanto esta associação pode ser modulada através da fosforilação provocada pela acção da proteína cinase A (PKA), caseína cinase I ou adenosina monofosfato cíclica (Kennedy *et al*., 1991).

A proteína 4.2 interage com a anquirina e participa na formação do macrocomplexo banda 3 (Yawata, 2003).

A proteína 4.1 R é responsável por mediar as interacções entre a actina e a espectrina (Winkelmann e Forget 1993). Estas interacções podem ser alteradas com a

adição da proteína cinase C (PKC), que fosforila a proteína 4.1R levando ao decréscimo das interacções entre a espectrina e actina (Nunomura *et al.*, 2000). A PKC também conduz à fosforilação da PTP nos resíduos de serina/treonina provocando a inactivação da PTP (Mohamed e Steck, 1986) e a activação da PTK (Yannoukakos *et al*., 1981), levando a fosforilação indirecta da proteína banda 3**.** Existem dois macrocomplexos de actina/espectrina responsáveis pela ligação do citoesqueleto à membrana dos eritrócitos, a formação destes macrocomplexos surge com à ligação da proteína banda 3 à anquirina e à proteína 4.2, e com a ligação da glicoforina C/D com à proteína 4.1 R (Harrison *et al*., 1991).

Todas estas proteínas desempenham um papel específico para garantir a integridade e deformabilidade dos eritrócitos.

1.2 Agregação e Deformabilidade Eritrocitárias

O citoesqueleto confere elasticidade e flexibilidade aos eritrócitos, permitindo-lhes passar por vasos e capilares que estreitam até 1 µm de diâmetro (Yawata, 2003). As mudanças na fluidez da membrana podem influenciar a agregação eritrocitária e a deformabilidade na microcirculação, por interferir com a forma espacial dos eritrócitos e com interacções célula a célula. A tendência dos eritrócitos para agregar é mediada por proteínas plasmáticas e está dependente das forças repulsivas estabelecidas por membranas de outras moléculas e pela corrente sanguínea (Dormandy, 1971).

Segundo Fabry (1987), os eritrócitos repelem-se entre si devido à sua carga negativa proveniente dos resíduos de ácido siálico. No entanto ao mesmo tempo são atraídos pelas forças de Van Der Waals. O balanço entre estas duas forças determina o rearranjo espacial dos eritrócitos numa solução electrolítica.

Em circulação sanguínea e em zonas de baixa tensão tangencial, os eritrócitos podem agregar-se e adquirir uma conformação tridimensional semelhante a uma pilha de moedas (Samsel e Perelson, 1984). Segundo Seeley *et al,* (2005), em muitas espécies animais, incluindo os humanos, os eritrócitos tendem a agregar-se na presença de certas macromoléculas, tais como o fibrinogénio.

De acordo com Yedgar *et al*. (2002), os eritrócitos também podem apresentar deformabilidade reduzida e maior agregação em muitas situações patológicas, tais

como: doenças cardíacas, hipertensão, diabetes, artrite reumatóide, anemia falciforme entre outras (Tabela 1), dificultando a circulação sanguínea.

Tabela 1. Efeito de várias situações patológicas na agregação e deformabilidade eritrocitária. Adaptado de Yedgar *et al*. (2002). Na tabela abaixo ↑ indica aumento, ↓ indica diminuição.

Doença	**Agregação**	**Deformabilidade**
Enfarte do Miocárdio	↑	↓
Inflamação	↑	↓
Angina	↑	↓
Sepsis Bacteriana	↑	↓
Diabetes	↑	↓
Malária Cerebral	↑	↓
Hipertensão Arterial	↑	↓
Acidente Cardiovascular	↑	↓
Anemia Falciforme	↑	↓

Na circulação sanguínea os agregados de eritrócitos contribuem para o processo inflamatório e estimulam a interacção dos leucócitos com o endotélio, promovendo o seu recrutamento. Esta agregação é reversível e, particularmente importante na microcirculação, uma vez que estes agregados podem aumentar drasticamente a viscosidade do sangue (Baumler *et al*., 1999).

A desagregação é conseguida principalmente através da tensão tangencial mecânica, sendo necessário aproximadamente 1 dyne de força para atingir esse pressuposto**.** Em condições fisiológicas normais, os eritrócitos não interagem com o endotélio através de receptores específicos, no entanto estas interacções receptor-ligante podem ocorrer em condições patológicas (Shiu e McIntire, 2003).

2. Função Endotelial

Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que o endotélio é um componente indispensável na regulação da homeostasia vascular, tendo descoberto que na ausência do endotélio a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) não ocorria. Estes autores evidenciaram também que o endotélio quando activo consegue libertar uma substância vasoactiva que causa o relaxamento nas células musculares lisas, tendo sido mais tarde descoberto por Ignarro *et al*. (1987) que essa substância era o monóxido de azoto (NO).

Na disfunção endotelial, ocorre o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Cai, 2005), as quais podem reduzir a disponibilidade do NO endotelial por diferentes vias: inactivação directa do NO pelo anião superóxido, com a formação dos peroxinitritos (Pryor e Squadrito. 1995); redução da expressão e da actividade da forma constitutiva da enzima sintase do NO (NOS), devido a mudanças nos seus substratos ou cofactores; e no aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (Colonna *et al*.,2009). A redução da biodisponibilidade do NO e a consequente disfunção endotelial desencadeiam na parede dos vasos eventos percursores da formação da placa aterosclerótica como alterações no tónus vascular e iniciação do processo inflamatório com adesão de leucócitos e proliferação e migração de células musculares lisas (Madamanchi *et al*.,2005).

3. Monóxido de Azoto

O NO é uma molécula de sinalização que foi descoberta por Furchgott, Murad e Ignarro permitindo-lhes receber o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1998. Esta molécula apresenta várias funções no nosso organismo, como a estimulação da vasoactividade, a inibição da proliferação das células musculares lisas, a inibição da adesão plaquetária, para além de regular a adesão celular, o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular e a deformabilidade eritrocitária (Seeley *et al.,* 2005).

Segundo Alderton *et al*, (2001) a NOS catalisa a transformação do aminoácido L-arginina, NADPH e oxigénio no aminoácido L-citrulina, NADP e NO. A NOS apresenta três isoformas diferentes, a NOS neuronal (NOS1 ou nNOS), a NOS induzível (NOS2 ou iNOS) e a NOS endotelial (NOS3 ou eNOS). As enzimas NOS1 e NOS3 são constitutivas e dependentes de cálcio, enquanto a enzima NOS2 pode ser induzida em diversos tipos de células durante o processo inflamatório (Alderton *et al*.,2001).

O NO que tem como origem a NOS3 é considerado a maior fonte de NO disponível nos vasos sanguíneos. Após a sua formação parte do NO difunde-se para o interior dos eritrócitos para reagir com a hemoglobina regulando assim a deformabilidade e agregação eritrocitárias (Korbut e Gryglewski, 1993). Outra parte difunde-se para a parede vascular onde reage com o grupo heme da guanilato ciclase estimulando a transformação da guanosina trifosfato em guanosina monofosfato cíclica, que por sua vez, activa a proteína cinase G (Arnold *et al*., 1977). Estes mecanismos de transdução de sinal levam à desfosforilação das cadeias leves de miosina, provocando assim o relaxamento do músculo liso vascular e, por conseguinte, o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos levando ao aumento do fluxo sanguíneo e à redução da pressão arterial (Seeley *et al.*, 2005).

Segundo Archer (1993), o NO é uma molécula instável, e por isso reage com varias moléculas dando origem a derivados metabólicos mais estáveis que asseguram a sua biodisponibilidade.

Estudos de cinética *in vitro* demonstraram que o NO é rapidamente convertido em nitratos relativamente inertes na presença de oxigénio e oxihemoglobina, podendo depois ser convertidos em nitritos pela acção da metahemoglobina redutase (Gibson e Roughton, 1957). Os nitritos têm sido considerados como uns dos produtos metabólicos finais mais estáveis do NO, sendo apontados como um reservatório de NO, podendo ser posteriormente reduzidos enzimaticamente a NO pela acção da hemoglobina sob condições de hipóxia (Gibson e Roughton, 1957). De acordo com Spencer *et al*. (2000), o NO quando reage com o glutatião (GSH) dá origem ao nitrosoglutatião (GSNO).

Segundo Gross e Lane (1999), o NO intraglobular liga-se à hemoglobina através do grupo heme ou através da cadeia beta da cisteína, dando origem a nitrosil hemoglobina e a S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb), respectivamente.

A reacção do NO com o anião superóxido origina o peroxinitrito, o qual pode produzir nitratos mas também causar danos oxidativos em proteínas. Para que esta reacção ocorra não e necessária a presença de nenhuma enzima (Pryor e Squadrito. 1995).

O NO é uma molécula muito importante para a regulação do tónus vascular, no entanto as suas vias de sinalização e a conversão nos seus metabólitos ainda não são totalmente conhecidas.

4. Acetilcolina

Existem algumas moléculas que podem modelar o efluxo de NO. Entre estas figura a acetilcolina (ACh) (VanBenthuysen *et al.*, 1987).

Segundo Sastry e Sadavongvivad (1979), classicamente a ACh era apenas conhecida como um neurotransmissor, no entanto sabe-se agora que a ACh apresenta outras funções importantes no nosso metabolismo. A ACh é produzida no sistema nervoso pelas células nervosas, mas também existe em circulação sendo produzida pelos linfócitos T e células endoteliais (Seeley *et al.*, 2005).

A ACh neuronal é produzida nas células nervosas a partir da colina e da acetil coenzima A mediada pela colina acetiltransferase, sendo armazenada posteriormente em vesículas nos neurónios pré-sinapticos. Quando a membrana é despolarizada com a chegada do impulso eléctrico a ACh é libertada, ligando-se ao seu receptor colinérgico na membrana, desencadeando assim várias reacções no neurónio. AChE hidrolisa a ACh em colina e ácido acético, conduzindo ao término da reacção (Michelson e Zeimal,1973).

O estudo intensivo da função da ACh em circulação conduziu ao conhecimento sobre a interacção desta molécula com os receptores muscarínicos do endotélio, provocando o efluxo de cálcio, a formação do complexo calcio-calmodulina e activação da NOS3, o que indirectamente tem como consequência o relaxamento muscular e a vasodilatação através da produção de NO (Furchgott *et al*., 1981). Demonstrou-se também que a ACh é muito importante no transporte de oxigénio, nas propriedades hemorreológicas, no metabolismo eritrocitário e na mobilização de NO eritrocitário e dos seus derivados metabólicos (Mesquita *et al*., 2001).

De acordo com Wright e Plummer (1973), os eritrócitos são componentes sanguíneos que apresentam maiores concentrações de AChE, sendo esta enzima constituída por um núcleo globular que apresenta na sua parte inferior o centro activo, estando incluído neste núcleo, também um local periférico aniónico e um local de ligação secundário entre outros (Grisaru *et al*., 1999).

A AChE possui um péptido secretório sinalizador N-terminal, que durante a biossíntese passa por diversas modificações incluindo N-glicolisação e oligomerização (Massoulie *et al*., 2005).

Nem todas as células expressam o mesmo tipo de AChE, devido ao *splicing* alternativo de mRNA que ocorre nas diferentes células, dando origem a três isoformas

diferentes da AChE (Fambrough *et al.*,1982), que apresentam uma extensão terminal-C diferente bem como diferentes propriedades bioquímicas (Wessler *et al*., 1999).

As três isoformas da proteína são: (1) a AChE sináptica, que é a isoforma principal do cérebro e do músculo; (2) a AChE eritrocitária, que normalmente ocorre na forma dimérica e cujo domínio C-terminal está ligado a proteínas GPI; e (3) a AChE *readthrough* que parece ser expressa como um monómero solúvel, e cuja expressão é induzida durante o desenvolvimento ou em resposta a condições de stress (Fambrough *et al.*, 1982).

A Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação do Instituto de Medicina Molecular dirigida pela Professora Carlota Saldanha tem realizado nos últimos anos estudos de investigação pioneiros sobre os mecanismos de tradução de sinal do NO eritrocitário. Os primeiros ensaios evidenciaram a participação de várias proteínas de membrana no efluxo de NO eritrocitário, tendo sido proposto por Carvalho *et al*. (2004) a seguinte via de sinalização (Figura 1):

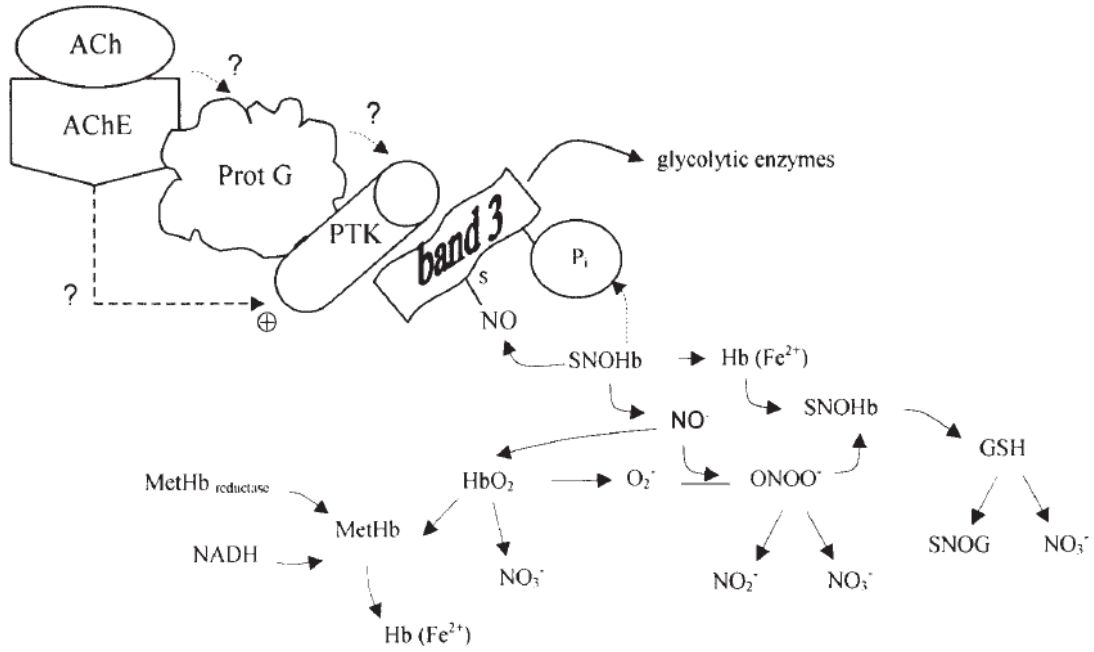

Figura 1. Mecanismos de tradução de sinal do NO e dos seus metabólitos derivados nos eritrócitos. Retirado de Carvalho *et al*. (2004).

A via de sinalização (Figura 1) proposta apresentava alguns elos para o quais à data ainda não havia resposta. No entanto, estudos posteriores da mesma Unidade

sugeriram que a formação do complexo AChE-substrato através da adição da ACh provocava alterações conformacionais na associação da proteína banda 3 com a proteína G (subunidades Gαi1/ Gαi2 e Gβ). A par destas alterações conformacionais evidenciou-se também uma maior actividade das PTKs na membrana dos eritrócitos provocando a desfosforilação da proteína banda 3, dando origem a um maior efluxo de NO eritrocitário (Carvalho *et al.*, 2009). Apesar de todos os estudos realizados, ainda não se conhece completamente a via de sinalização do NO eritrocitário e dos seus metabólitos derivados, sendo necessários mais estudos para entender o papel de todos os intervenientes nestes processos.

Com o avanço da biologia molecular e biotecnologia a criação de anticorpos específicos tornou-se uma realidade nos dias que correm, tendo sido já criados vários anticorpos específicos para a AChE eritrocitária (anticorpo AChE dos domínios N- e C-terminal). A existência de tais anticorpos possibilita a inibição de um domínio específico da AChE, permitindo estudar o efeito da alteração conformacional da AChE eritrocitária.

5. NO, Função Endotelial e Aterosclerose

Como referido anteriormente, a redução da biodisponibilidade de NO conduz a uma situação de disfunção endotelial, o que desencadeia alterações importantes na parede do vaso as quais são precursoras da formação da placa aterosclerótica (Madamanchi *et al*., 2005). Visto que a disfunção endotelial é um factor chave no desenvolvimento do processo aterosclerótico pode servir como previdente da doença arterial coronária (CAD) (Kinlay *et al.*, 2001).

Em termos gerais, a aterosclerose é uma doença que se caracteriza pela formação de placas de ateroma nos vasos sanguíneos provocando um estreitamento do lúmen e perda de elasticidade da parede vascular, sendo esta a principal causa do enfarte agudo do miocárdio (AMI) e de outras doenças cardiovasculares (CVDs) (Fuster *et al.*, 1988).

Segundo Camacho *et al* (2007) a prevalência da aterosclerose tem aumentando à escala mundial, sendo já a maior causa de morte e morbilidade nos países ocidentais. Apesar da extensa investigação sobre o assunto e do extenso dispêndio de recursos para melhorar o nível de diagnóstico e terapêutica, a doença cardiovascular aterosclerótica

ainda é uma patologia que despende muitos recursos levando a uma sobrecarga a nível económico (Kolansky, 2009)

As lesões ateroscleróticas podem surgir durante a adolescência, no entanto a sua progressão está dependente de factores genéticos e ambientais (Libby e Theroux, 2005).

Até à década de 70, a aterosclerose era caracterizada exclusivamente como uma acumulação excessiva de lípidos na parede arterial, levando à formação da placa de ateroma. No entanto estudos mais recentes apontam para um envolvimento do processo inflamatório e de diversos tipos celulares, incluindo leucócitos, eritrócitos, plaquetas, células do músculo liso e células endoteliais na formação e progressão da placa aterosclerótica (Seeley *et al.,* 2005).

5.1 Formação da Placa Aterosclerótica

Pode-se considerar que a formação de uma placa de ateroma se inicia com a acumulação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no espaço sub-endotelial, podendo então sofrer um processo de oxidação na presença de ROS levando à formação das LDL oxidadas (ox-LDL). As ox-LDL desencadeiam uma resposta auto-imune, sendo fagocitadas pelos macrófagos. Como tal, ocorre uma acumulação de lípidos no interior dos macrófagos, levando à sua posterior transformação em células espumosas (Gerrity, 1981). Os macrófagos têm um papel central na amplificação da resposta inflamatória pois induzem a libertação de citocinas pró-inflamatórias no endotélio, que por sua vez promovem a expressão de moléculas de adesão, factores tecidulares e quimiocinas contribuindo para o crescimento do ateroma (Seeley *et al.*, 2005).

O evoluir da lesão provoca a necrose das células espumosas e a consequente coalescência lipídica, iniciando-se assim a formação de um núcleo necrótico no centro da lesão, constituído por células mortas e citocinas inflamatórias que promovem o aumento da inflamação e da instabilidade da placa (Fuster *et al.*, 1992).

Segundo Webster *et al.* (1990), com a ruptura da placa ou erosão endotelial, a matriz sub-endotelial expõe o seu conteúdo necrótico rico em factores pró-coagulantes na circulação sanguínea, ocorrendo a activação e agregação das plaquetas e formando-se o trombo. Desta forma surgem manifestações clínicas.

5.1 Enfarte Agudo do Miocárdio

Em 2007 houve uma nova modificação no diagnóstico do AMI, preconizada pela *Joint Task Force of the European Society of Cardiology*, *American College of Cardiology Foundation*, *American Heart Association* e a *World Health Federation* (ESC/ACCF/AHA/WHF), definindo o AMI como um evento clínico resultante da morte dos miócitos cardíacos (necrose miocárdica) causada por isquémia (Thygesen *et al*., 2007). O AMI tem duas formas de incidência com supradesnivelamento do segmento ST ou sem supradesnivelamento do segmento ST (Kumar e Cannon, 2009).

O AMI é a manifestação mais grave da doença coronária (CAD), e resulta da interrupção do fornecimento de oxigénio ao músculo cardíaco provocando uma necrose parcial do mesmo. Cerca de 95% dos AMI ocorrem devido ao processo aterosclerótico (Webster *et al.*, 1990).

Segundo Okrainec *et al*. (2004) estima-se que a mortalidade provocada pela CAD duplique no período de 1990 a 2020, com mais de 80 % do aumento a dever-se aos países em desenvolvimento.

Esta mudança epidemiológica deve-se em parte ao envelhecimento da população provocado pelo aumento da esperança média de vida mas também a mudança dos hábitos alimentares e urbanos (Kumar e Cannon, 2009).

Segundo Fox *et al*. (2004) a identificação dos factores de risco das doenças cardiovasculares (CVDs), como a hipertensão, tabagismo, dislipidémia, diabetes, obesidade historial familiar de doença coronária, evento prévio entre outros, permite tomar medidas preventivas que podem diminuir a sua taxa de incidência, reduzindo assim a elevada taxa de mortalidade associada a estes eventos cardiovasculares. No entanto, a sua utilização não é suficiente para uma prevenção eficiente das CVDs, pois em cerca de 50% de todos os doentes com CVDs não é identificado aparentemente nenhum destes factores de risco (Maas e Boger, 2003). Como tal, a utilização de novos biomarcadores é fundamental na identificação de doentes em risco de CVDs (Pearson *et al*., 2003).

Como referido anteriormente, a disfunção endotelial é um factor preditivo das CVDs, e caracteriza-se por uma diminuição da biodisponibilidade do NO. Assim sendo o conhecimento efectivo das vias de sinalização do metabolismo do NO eritrocitário pode ser importante para o diagnóstico precoce da disfunção endotelial.

Objectivos

O objectivo deste estudo foi avaliar o metabolismo do NO eritrocitário em condições fisiológicas normais e em condições agudas de disfunção endotelial e inflamação (doentes com enfarte agudo do miocárdio – AMI).

Para tal estudou-se os efeitos da alteração conformacional da AChE e da inibição e da activação enzimática da PKC sobre o metabolismo do NO eritrocitário. O efeito da presença e da ausência da ACh foi também avaliado.

Para além disso, determinou-se *ex vivo* marcadores do metabolismo do NO em doentes com AMI.

Material e Métodos

Lista de material

- Agregómetro MA1; Myrenne, Alemanha
- Amino-IV sensores; Innovative instruments, EUA
- Arca frigorifica -4ºC, -20º C e -80ºC
- Banho de água termostatatizado a 37º C
- Banho de gelo
- Centrifuga 2233 M-2; HERMLE, Alemanha
- Copos de laboratório Normax
- Cuvetes
- Ectacitometro**;** Myrenne, Alemanha
- Espectrofotómetro F-3000; Hitachi, Japão
- Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys**;** Thermo electron corporation, EUA
- Luvas
- Micro tubos Eppendorf
- Nitric oxide measuring system; Innovative instruments, EUA
- Pipetas Gilson 10,20,100,200,1000 µL
- Pontas de pipeta
- Tubos Colheita de sangue
- Vórtex

Lista de anticorpos

- AChE anticorpo (N-19). Santa Cruz biotechnology, inc.
- AChE anticorpo (C-16). Santa Cruz biotechnology, inc.

Lista de reagentes

- 4,5-diaminofluoreceina (DAF-2); SIGMA
- 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA); SIGMA
- Acetilcolina iodeto; SIGMA
- Acetilcolina cloreto; SIGMA
- Acetato de forbol miristrato (PMA); SIGMA
- Cheleretrina; SIGMA
- Cloroformio; Merck
- Dimetilsufóxido (DMSO); SIGMA
- Etanol 95%; Merck
- HgCl2; SIGMA
- Kit Reagente de Griess; Molecular Probes
- NaCl isotónico 0,9% em pH 7,4; AnalaR, BDH Laboratory
- NADPH; SIGMA
- Nitrato reductase (Aspergillus niger); SIGMA

Protocolo de recolha de sangue

No ensaio *in vitro*, o sangue (9 ml) foi obtido por punção venosa, e armazenado em tubos de colheita com o anticoagulante heparina 10 Ul/ml.

A recolha do sangue foi sempre realizada de manhã de modo a evitar variações circadianas. O intervalo de tempo desde a recolha do sangue até ao início do processamento em laboratório nunca excedeu um período de tempo superior a 60 minutos.

Para o ensaio *ex vivo*, as amostras de sangue foram recolhidas para tubos de colheita com o anticoagulante apropriado, heparina 10 Ul/ml e EDTA (1,5 mg/ml). A recolha das amostras foi realizada aquando da admissão dos doentes no Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, o que dada a natureza aguda e imprevisível da patologia estudada ocorreu a diferentes horas do dia.

6. Estudo *In Vitro*

6.1 Caracterização do Grupo de Estudo

Para a realização dos ensaios *in vitro*, utilizou-se sangue de indivíduos saudáveis. O sangue foi recolhido no Banco Público de Sangue do Instituto Português do Sangue (Lisboa, Portugal), no âmbito de um acordo institucional com o Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Os critérios de inclusão incluem indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos. Foram excluídas do estudo mulheres de modo a evitar alterações hormonais resultantes do ciclo menstrual.

6.2 Modelo Experimental

De forma a atingir o objectivo proposto de compreensão do metabolismo do NO eritrocitário, foram realizados dois ensaios utilizando diferentes efectores. O primeiro ensaio teve como objectivo estudar o efeito da alteração conformacional da AChE no metabolismo do NO eritrocitário na presença e ausência da ACh. A alteração conformacional da AChE foi efectuada com a adição de dois anticorpos específicos para a AChE, o anticorpo específico para o domínio N terminal e o anticorpo específico para o domínio C terminal. O segundo ensaio pretendeu estudar o efeito da inibição/activação enzimática da PKC no metabolismo do NO eritrocitário na presença e ausência da ACh. A inibição enzimática da PKC foi provocada pela adição da cheleretrina (Che) e a activação enzimática foi provocada pela adição do acetato miristato de forbol (PMA).

Estes ensaios foram realizados sequencialmente, mantendo-se sempre o modelo experimental descrito de seguida. Cada amostra de sangue foi centrifugada para a obtenção dos eritrócitos os quais foram ressuspendidos em soro fisiológico (NaCl isotónico) de modo a manter o valor de hematócrito inicial. Após esta preparação, as seguintes alíquotas:

- Alíquota Controlo – não se adicionou o efector;
- Alíquota Efector em estudo – adicionou-se o efector a ser estudado na concentração 10^{-5} M;
- Alíquota ACh – adicionou-se 10^{-5} M de ACh como controlo positivo;
- Alíquota Efector em estudo+ACh – adicionou-se o efector a ser estudado na concentração 10^{-5} M e ainda 10^{-5} M de ACh.

Foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente. Seguidamente as alíquotas foram centrifugadas (11000 rpm durante 1 min). O sobrenadante foi descartado, e os eritrócitos foram utilizados para as determinações do NO , GSNO, SNOHb, nitritos e nitratos.

6.3 Procedimento Experimental

6.3.1 Determinação da Concentração do NO Eritrocitário

Segundo Carvalho *et al*. (2004), existe uma relação directa entre a corrente eléctrica produzida pelo sensor do NO e a concentração padrão do NO, produzindo uma curva de calibração significativa. Os eritrócitos *in vitro* produzem valores amperométricos significativos de NO em resposta a uma ampla gama de efectores. A utilização do sensor amperométrico de NO constitui um método fiável para a medição directa em tempo real do efluxo de NO nas suspensões de eritrócitos. As mudanças registadas através da alteração do pico de corrente eléctrica são proporcionais à quantidade de NO mobilizado pelos eritrócitos quando estimulados pela ACh.

Para a determinação da concentração do NO eritrocitário foi adicionado NaCl à suspensão de eritrócitos a fim de alcançar um Ht de 0,05%. A suspensão foi então homogeneizada através de uma suave inversão. De seguida os amino-IV sensores que estão ligados ao medidor de NO foram estabilizados. Após à estabilização foi adicionado 10 mM de ACh à suspensão, provocando uma alteração de corrente eléctrica, que com base numa curva de calibração calculada previamente utilizando concentrações conhecidas de NO permite determinar a concentração de NO da suspensão (Almeida *et al.*, 2009).

6.3.2 Determinação da SNO-Hb

A determinação da concentração de SNO-Hb é baseada na reacção de clivagem dos S-nitrosotióis que produzem um nitrosante que activa 4,5-diaminofluoreceina (DAF-2) (Sonveaux *et al*., 2005).

Para a determinação de SNO-Hb foi adicionado igual volume de H_2O ao volume da suspensão de eritrócitos. De seguida foi feita uma diluição final de 1/200 com NaCl. Posteriormente foi misturado 5 mM de DAF-2 à solução. Metade dessa solução reage com um volume igual de $HgCl_2$ durante 10 min provocando a clivagem de SNO-Hb. A reacção termina com a adição de uma mistura de clorofórmio e etanol. A concentração da SNO-Hb foi derminada num espectrofotómetro Hitachi F-3000 com a excitação de luz a 485 nm e emissão a 520 nm. Os resultados foram quantificados com base na diferença de sinais de fluorescência gerada na presença e ausência de $HgCl_2$, (Sonveaux *et al*., 2005).

6.3.3 Determinação dos Peroxinitritos

O 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) difunde-se através das membranas celulares e é posteriormente desacetilado pelas esterases intracelulares dando origem ao DCF-H que é um composto não fluorescente. No entanto os peroxinitritos convertem o DCF-H num DCF altamente fluorescente.

Para a determinação dos peroxinitritos foi adicionado 15 µM de DCF-DA e tampão fosfato à suspensão de eritrócitos durante 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação suspensões foram diluídas no mesmo tampão. A concentração final da suspensão foi determinada com o espectrofotómetro Hitachi F-3000 utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão a 503 e 523 nm respectivamente. A concentração dos peroxinitritos foi calculada com base numa curva de calibração (1-100 µm) calculada previamente utilizando concentrações conhecidas de peroxinitritos permitindo determinar a concentração dos peroxinitritos na suspensão **(**Possel *et al*., 1997).

6.3.4 Determinação da Concentração dos Nitritos, Nitratos e GSNO nos Eritrócitos

Este método baseia-se na medição da florescência emitida pelos nitritos, nitratos e nitrosoglutatião com o reagente de Griess no espectrofotómetro (Guevara *et al*., 1998).

Para determinar a concentração destes compostos derivados de NO, foi necessário hemolisar a suspensão de eritrócitos. Para tal foi adicionado água MILI-Q, etanol e clorofórmio aos eritrócitos. Seguidamente a suspensão foi homogeneizada no vórtex e centrifugada (3000 rpm durante 2 min). Após a centrifugação sobrenadante foi armazenado para a posterior determinação dos nitratos, nitritos e GSNO (Carvalho *et al*., 2004)

Para a determinação dos nitritos, o sobrenadante hemolisado foi incubados com o reagente de Griess de acordo com as instruções do Kit Reagente de Griess, de seguida as soluções foram incubadas 20 minutos à temperatura ambiente ao escuro. O kit é composto por dois componentes, o ácido sulfanílico (componente B) que quando reage com o nitrito converte-se num sal de diazónio em solução acida que ao reagir com o Nedd (componente A) forma um corante azo.

Para determinar a concentração dos nitritos as amostras foram analisadas no espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys) à 548 nm. A concentração dos nitritos foi determinada por comparação com uma curva de calibração (1-100 mM) de nitrito de sódio em água desionizada.

Para a medição dos nitratos, foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, no entanto teve que ocorrer primeiro a reacção de redução dos nitratos a nitritos, para tal foi adicionado 50 µm de Nitrato reductase e NADPH em tampão Tris 20 mM ao sobrenadante hemolisado, sendo então incubados durante 30 min a temperatura ambiente no escuro (Carvalho *et al*., 2004).

Para a quantificação de GSNO, foi preparada uma mistura de reacção contendo 57,7 mM de ácido sulfanílico (Componente B do reagente de Griess), 7,5 mM de Nedd (componente A do reagente de Griess) e tampão fosfato, e uma solução de 10 mM de $HgCl_2$ em dimetilsulfóxido. Posteriormente foi adicionado ao sobrenadante hemolisado a mistura de reacção na presença e na ausência da solução de $HgCl_2$ em dimetilsulfóxido de modo a perfazer uma concentração de 100 mM, as soluções foram então agitadas por inversão e deixadas no escuro durante 20 min. A concentração de GSNO foi determinada no espectrofotómetro à 490 nm. A concentração de GSNO foi calculada

através da extrapolação dos resultados obtidos com uma curva de calibração (1-100 mM) de nitrito de sódio em água desionizada e por um espectro de controlo da solução com mercúrio iónico (Cook *et al.*, 1996).

6.4 Análise Estatística

Os dados foram resumidos como média e desvio padrão (dp) para variáveis contínuas.

As diferenças nos parâmetros de metabolismo de NO eritrocitário foram avaliadas, para cada um dos ensaios (papel da AChE e o papel da sinalização da PKC sobre o metabolismo do NO nos eritrócitos) utilizando o teste paramétrico de análise de variância ANOVA.

Os cálculos foram efectuados utilizando os programas EXCEL e SPPS (versão 19.0).

7. Estudo *Ex Vivo*

7.1 Caracterização do Grupo de Estudo

Para a realização do estudo *ex vivo*, foram seleccionados doentes com enfarte agudo do miocárdio nas primeiras 24 horas desde o início da dor, confirmado através de alterações electrocardiográficas (com supradesnivelamento do segmento ST), elevação dos níveis de troponina e alterações enzimáticas (aumento significativo da ceratina cinase). Todos os doentes foram inscritos no estudo aquando da sua admissão no hospital e foram submetidos a angioplastia coronária como terapia de reperfusão. O período médio desde o início da dor torácica para a intervenção foi menos de 6 horas.

A selecção dos doentes foi realizada pelo Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, com o consentimento informado de todos os participantes. O estudo integra-se num estudo mais vasto o qual foi previamente aprovado pelo Comité de Ética do Hospital de Santa Marta.

Doentes com idade acima de 70 anos ou com significativa co-morbidades como doença arterial periférica ou doença da artéria carótida, antecedentes conhecidos de malignidade ou doenças infecciosas, insuficiência renal crónica, foram excluídos.

Todos os doentes foram caracterizados para parâmetros clínicos e bioquímicos. A caracterização dos doentes foi complementada com dados demográficos (sexo e idade) e antropométricos (peso, altura e índice de massa corporal – IMC) e ainda uma bateria de marcadores bioquímicos (colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, glucose, proteína C-reactiva, fibrinogénio) e hematológicos (hemoglobina, hematócrito, distribuição dos eritrócitos – RDW, e contagem de eritrócitos).

A existência de factores de risco foi definida com base nos seguintes critérios:

- Diabetes – são considerados diabéticos indivíduos com diabetes mellitus confirmada clinicamente com base nos valores de glucose em jejum ≥7.0 mmol/l (126 mg/dl) ou glucose plasmática 2h ≥11.1 mmol/l (200 mg/dl);
- Hipertensão – são considerados hipertensos indivíduos com pressão arterial sistólica ≥140 mmHg e/ou pressão diastólica ≥90 mmHg, ou a fazer terapêutica anti-hipertensora;
- Dislipidémia – são considerados hiperlipémicos indivíduos a tomar medicação par abaixar o perfil lipídico ou tendo valor de colesterol total ≥190 mg/dl ou de triglicéridos ≥180 mg/dl;
- Obesidade – diversos graus de obesidade são considerados: indivíduos com IMC entre 25 e 29,9 são considerados com excesso de peso; enquanto indivíduos com IMC superior ou igual a 30 são considerados obesos.
- Tabagismo – indivíduos que fumem qualquer quantidade de cigarros, charutos ou cachimbo são considerados como fumadores. São ainda considerados fumadores indivíduos que fumaram no ano precedente à inclusão no estudo.

7.2 Protocolo Experimental

O estudo *ex vivo* teve como objectivo avaliar vários marcadores em doentes que sofreram AMI entre os quais o NO eritrocitário**.** Como tal, a inclusão dos doentes no estudo ocorreu aquando da admissão dos mesmos no Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, antes da intervenção coronária e da administração de medicação.

Os parâmetros hemorreológicos foram avaliados num período máximo de 3 horas após a recolha do sangue, de modo a garantir fiabilidade nos resultados. Foram determinados os principais parâmetros hemorreológicos de interesse:

- ✓ Determinação da Deformabilidade eritrocitária.
- ✓ Determinação da Agregação eritrocitária.
- ✓ Medição do NO eritrocitário.
- ✓ Medição da concentração do GSNO eritrocitário.

7.3 Procedimento Experimental

7.3.1 Determinação da Deformabilidade Eritrocitária

A determinação da agregação eritrocitária foi feita através da análise num ectacitometro. O ectacitometro altera a sua velocidade de rotação de modo a produzir diferentes tensões de cisalhamento. O ectacitometro emite um feixe laser que é desviado através da suspensão de células à medida que há mudança da velocidade de rotação. Essa difracção sofrida pelo laser devido a existência das células vai permitir determinar a deformabilidade a diferentes tensões de cisalhamento.

Para esta técnica foi utilizado sangue total em heparina. A amostra foi previamente diluída em Dextran de modo a ter um hematócrito de 15% (Mohandas *et al.*,1980).

7.3.2 Determinação da Agregação Eritrocitária

A agregação eritrocitária foi determinada utilizando o agregómetro MA1, o qual consiste numa câmara cónica rotativa que dispersa a amostra com uma tensão tangencial mecânica de 600 s^{-1} e um fotómetro que determina o grau de agregação. A intensidade da luz é medida após transmissão através da amostra de sangue. A agregação

determinou-se após 5 e 10 segundos de dispersão (Schmid-Schonbein *et al*., 1982). Para esta técnica o anticoagulante utilizado foi heparina.

7.4 Análise Estatística

Os dados foram resumidos como média e desvio padrão (dp) para variáveis contínuas e como proporções para variáveis categóricas.

O estudo preliminar de avaliação dos parâmetros hemorreológicos e hematológicos no enfarte agudo do miocárdio incidiu somente sobre 5 doentes dados os múltiplos condicionalismos referidos anteriormente. Assim sendo, não foi possível aplicar a análise estatística inicialmente prevista, tendo-se optado por uma comparação inicial dos valores médios de cada parâmetro com os seus valores de referência, o que permite uma avaliação geral do estado hematológico e hemorreológico dos doentes.

Para além disso, foram ainda comparadas as diferenças entre géneros para os diversos parâmetros, bem como com a existência de factores de risco utilizando o teste paramétrico de análise de variância ANOVA. De modo a realizar a análise descrita anteriormente, uma nova variável denominada classes de factores de risco foi criada, a qual teve por base a existência dos factores de risco mencionados anteriormente (diabetes, hipertensão, dislipidémia, obesidade e tabagismo). Nesta nova variável categórica foram considerados 3 classes de doentes: doentes sem qualquer factor de risco; doentes com um ou dois factores de risco; e por fim doentes com três ou mais factores de risco.

Os cálculos foram efectuados utilizando os programas EXCEL e SPPS (versão 19.0).

Resultados

8. Ensaio *In Vitro*

8.1 Efeito da Alteração Conformacional da AChE

8.1.1 Efeito do bloqueio do domínio N terminal da AChE

Na figura 2 e anexo I são apresentados os resultados do ensaio do bloqueio do domínio N-terminal da AChE na presença e ausência de ACh nas concentrações de NO, GSNO e peroxinitritos.

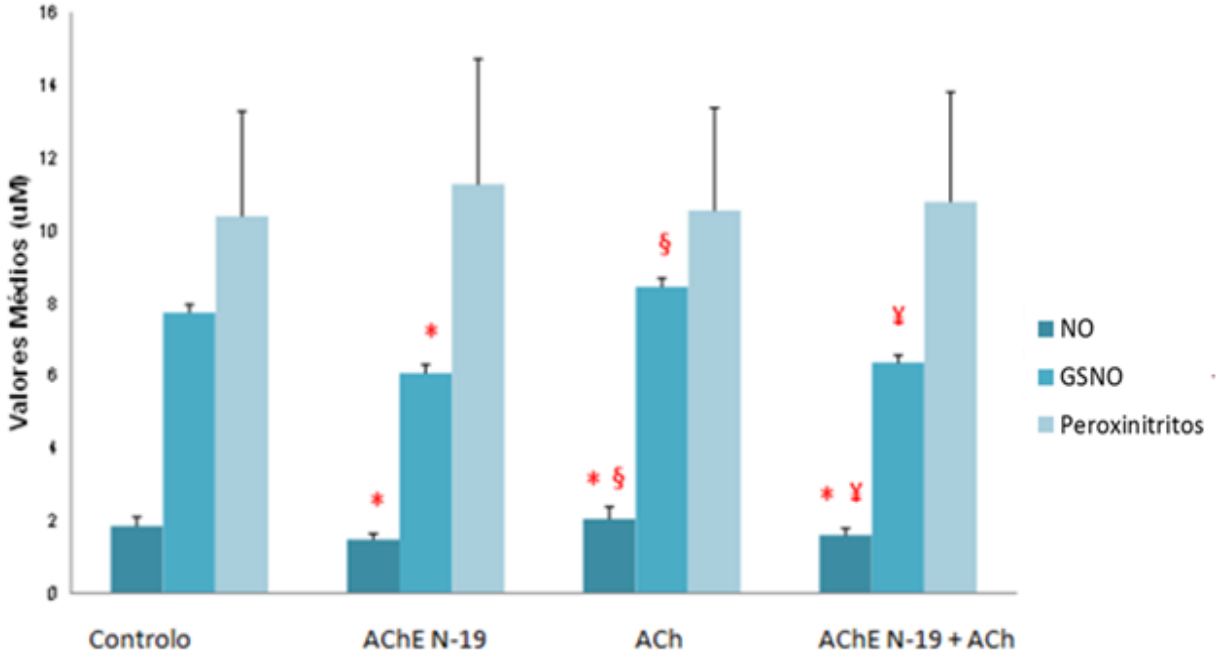

Figura 2. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção N terminal da AChE, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 27 para o NO e GSNO, para os peroxinitritos n = 23. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus AChE N-19; $^{¥}$p<0,05 versus ACh.

- ✓ A adição do anticorpo N-19 provocou uma diminuição na concentração de NO (1,49±0,15 µM) em relação às alíquotas controlo (1,84±0,25 µM) ($p<0,001$) e ACh (2,06±0,33 µM) ($p=0.013$). A presença de ACh conduziu a maiores concentrações de NO (2,06±0,33 µM) em relação à alíquota controlo (1,84±0,25 µM) ($p<0,001$). Na presença de ACh, a adição do anticorpo (AChE N-19+ACh) causou uma diminuição da concentração de NO (1,60±0,19 µM) em relação às alíquotas controlo (1,84±0,25 µM) ($p=0,001$) e ACh (2,06±0,33 µM) ($p<0,001$), não havendo diferenças significativas por comparação com a presença do anticorpo (1,49±0,15 µM) ($p=0,318$). Ou seja, ocorreu uma diminuição da concentração de NO devido ao bloqueio do domínio N terminal da AChE, bloqueio que não foi revertido pela adição de ACh.

- ✓ A adição do anticorpo provocou uma diminuição na concentração de GSNO **(**6,07±1,08 µM) em relação às alíquotas controlo (7,68±2,11 µM) ($p=0,029$) e ACh (8,44±3,19 µM) ($p=0,001$). Por sua vez, a adição de ACh não induziu alteração significativas na concentração de GSNO (8,44±3,19 µM) em relação à alíquota controlo (7,68±2,11 µM) ($p=0,644$). A adição do anticorpo na presença de ACh (AChE N-19+ACh) teve como efeito uma diminuição da concentração de GSNO (6,35±1,67 µM) em relação à adição de ACh (8,44±3,19 µM) ($p=0,003$). Ocorreu assim a diminuição da concentração de GSNO devido ao bloqueio do domínio N terminal da AChE que não foi revertido pela presença de ACh.

- ✓ Os resultados da concentração dos peroxinitritos foram muito semelhantes entre as quatro alíquotas, controlo (10,39±2,89 µM), AChE N-19 (11,27±3,45µM), ACh (10,54±2,84 µM) e AChE N-19+ACh (10,79±3,02µM), o que demonstra que tanto a adição do anticorpo, como a adição de ACh não provocaram alterações significativas na concentração dos peroxinitritos.

- ✓ Os resultados obtidos da concentração de SNO-Hb neste ensaio, não serão apresentados pois aquando a realização deste ensaio o protocolo ainda estava numa fase de optimização não produzindo resultados viáveis.

- ✓ O valor das concentrações dos nitratos e nitritos não foram medidos neste ensaio.

8.1.2 Efeito do bloqueio do domínio C terminal da AChE

Na figura 3 e anexo II são apresentados os resultados do ensaio do bloqueio do domínio C-terminal da AChE na presença e ausência de ACh nas concentrações de NO, GSNO e peroxinitritos.

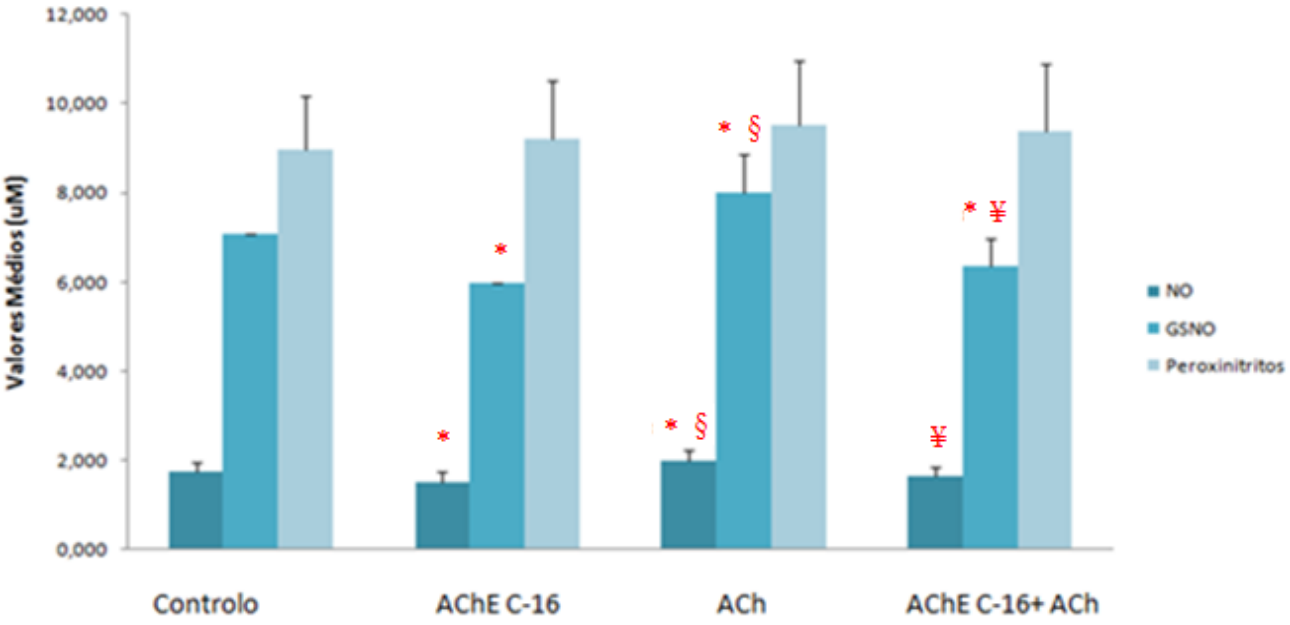

Figura 3. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção C terminal da AChE, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 21. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus AChE C-16; $^{¥}$p<0,05 versus ACh.

✓ A adição do anticorpo C-16 provocou uma diminuição na concentração de NO (1,52±0,24 µM) em relação às alíquotas controlo (1,75±0,21 µM) (p=0,008) e ACh (1,99±0,25 µM) (p<0,001). A adição de ACh aumentou à concentração de NO (1,99±0,25µM) em relação a alíquota controlo (1,75±0,21 µM) (p=0,006). Quando se adicionou o anticorpo com ACh (AChE C-16+ACh), apenas se verificou uma redução significativa da concentração de NO (1,65±0,21 µM) em relação à ACh (1,99±0,25µM)

(p<0,001), mostrando que o efeito do bloqueio do domínio C-terminal foi atenuado com a adição de ACh comparando com o controlo (1,75±0,21 µM) (p=0,946).

✓ A adição do anticorpo C-16 da AChE provocou uma diminuição na concentração de GSNO (5,99±0,00 µM) em relação às alíquotas controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,001) e ACh (8,00±0,86 µM) (p<0,001). A adição da ACh aumentou a concentrações de GSNO (8,00±0,86µM) em relação à alíquota controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,001). Quando se adiciona o anticorpo com ACh (AChE C-16+ACh), verificou-se uma redução significativa da concentração de GSNO (6,35±0,63 µM) em relação ao controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,001) e ACh (8,00±0,86µM) (p<0,001), mostrando que o efeito do bloqueio do domínio C-terminal não foi revertido com à adição de ACh.

✓ Os resultados da concentração dos peroxinitritos foram muito semelhantes entre as quatro alíquotas, controlo (8,89±1,21 µM), AChE C-16 (9,20±1,31 µM), ACh (9,53±1,44 µM) e AChE C-16+ACh (9,39±1,49 µM), o que demonstra que tanto a adição do anticorpo AChE C-16, como a adição de ACh não originou alterações significativas na concentração dos peroxinitritos.

✓ Os resultados obtidos da concentração de SNO-Hb neste ensaio, não serão apresentados pois aquando a realização deste ensaio o protocolo ainda estava numa fase de optimização não produzindo resultados viáveis.

✓ O valor da concentração dos nitratos e nitritos não foi medido neste ensaio.

8.2 Efeito da Inibição/Activação Enzimática da PKC

8.2.1 Inibição enzimática da PKC com Cheleretrina

Nas figuras 4 e 5 e anexo III são apresentados os resultados do ensaio da inibição enzimática da PKC com a adição de Che na presença e ausência de ACh nas concentrações de NO, GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos.

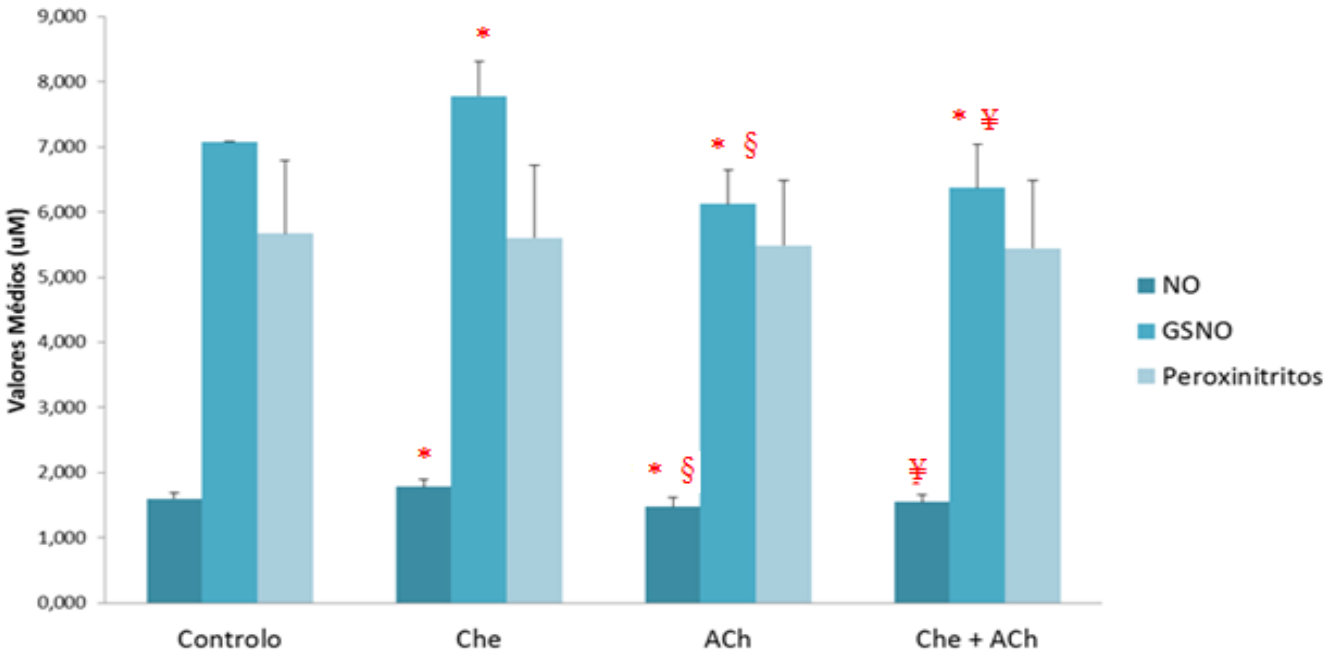

Figura 4. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição da cheleretrina, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 17. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus Che; ¥p<0,05 versus ACh.

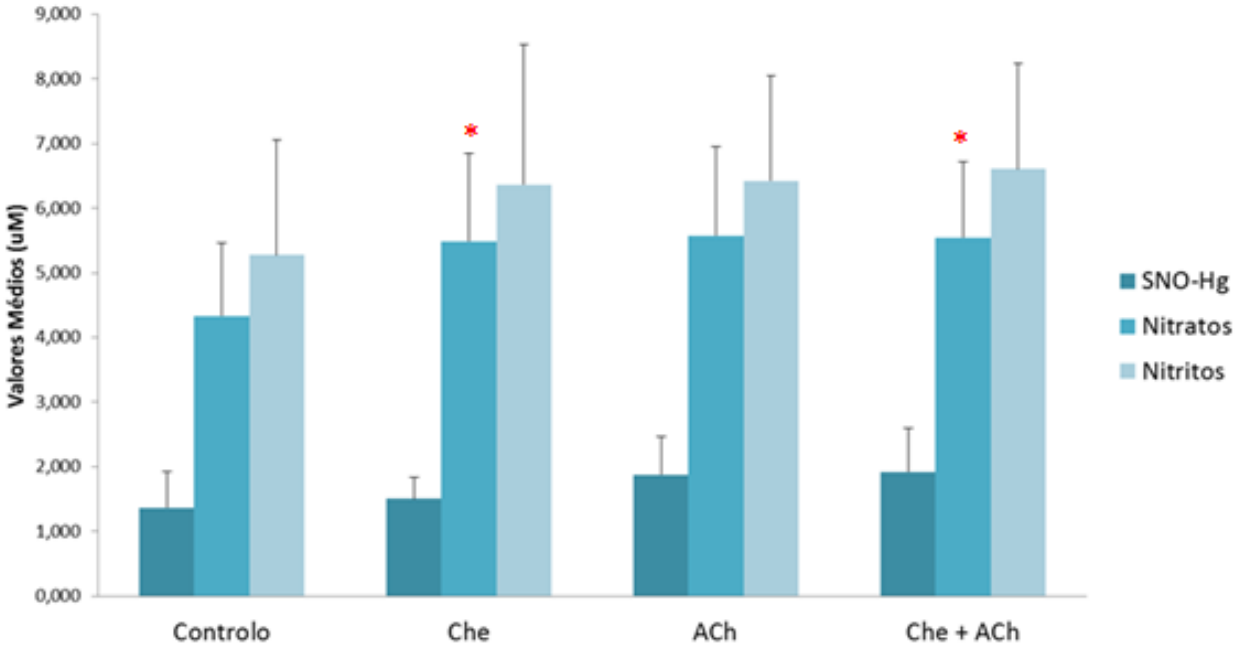

Figura 5. Média e desvio padrão dos valores de concentração de SNO-Hg, nitratos e nitritos com a adição da cheleretrina, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 17 excepto para SNO-Hb n=10. *p<0,05 versus Controlo.

✓ Com a adição da Che ocorreu uma diminuição da concentração de NO (1,48±0,14 µM) em relação às alíquotas controlo (1,60±0,09 µM) (p=0,011) e ACh (1,79±0,11 µM) (p<0,001). De acordo com os ensaios anteriormente descritos, a adição de ACh aumenta as concentrações de NO (1,79±0,11 µM) em relação à alíquota controlo (1,60±0,09 µM) (p<0,001). Quando se adicionou o inibidor da PKC com ACh (Che+ACh), verificou-se uma redução significativa da concentração de NO (1,55±0,11 µM) em relação a ACh (1,79±0,11 µM) (p<0,001). Em relação à alíquota controlo não se encontram diferenças significativas (1,60±0,09 µM) (p=1,00). Os resultados sugerem assim que o efeito da inibição da PKC foi anulado com a adição de ACh.

✓ A adição da Che provocou uma diminuição na concentração de GSNO (6,12±0,53 µM) em relação às alíquotas controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,001) e ACh (7,78±0,54 µM) (p<0,001). A adição de ACh aumentou a concentrações de GSNO (7,78±0,54 µM) em relação à alíquota controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,002). Quando se adicionou o inibidor da PKC com ACh (Che+ACh), verificou-se uma redução significativa da concentração de GSNO (6,37±0,66 µM) em relação às alíquotas controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,002) e ACh (7,78±0,54 µM) (p<0,001), mostrando que o efeito da inibição da PKC não foi revertido com a adição de ACh.

✓ Os resultados da concentração dos peroxinitritos foram muito semelhantes entre as quatro alíquotas, controlo (5,67±1,13 µM), Che (5,48±0,99 µM), ACh (5,60±1,11 µM) e Che+ACh (5,44±1,03 µM), o que demonstra que tanto a adição da Che, como a adição de ACh não origina alterações significativas na concentração dos peroxinitritos.

✓ Na determinação da concentração de SNO-Hb, os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados dos peroxinitritos, não havendo diferenças significativas na concentração da SNO-Hb entre as quatro alíquotas, controlo (1,37±0,56 µM), Che (1,88±0,58 µM), ACh (1,51±0,33 µM) e Che+ACh (1,92±0,67µM).

✓ As concentrações dos nitratos aumentaram com a adição da Che (5,57±1,39 µM) (p=0,036) e Che+ACh (5,54±1,17 µM) (p=0,043) em relação a alíquota controlo (4,34±1,12 µM).

✓ Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações dos nitritos entre as quatro alíquotas, controlo (5,28±1,78 µM), Che (6,42±1,62 µM), ACh (6,36±2,16 µM) e Che+ACh (6,60±1,64 µM).

8.2.2 Activação enzimática da PKC com PMA

Nas figuras 6 e 7 e no anexo IV são apresentados os resultados do ensaio da activação da PKC com PMA. Os parâmetros determinados foram o NO, GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos.

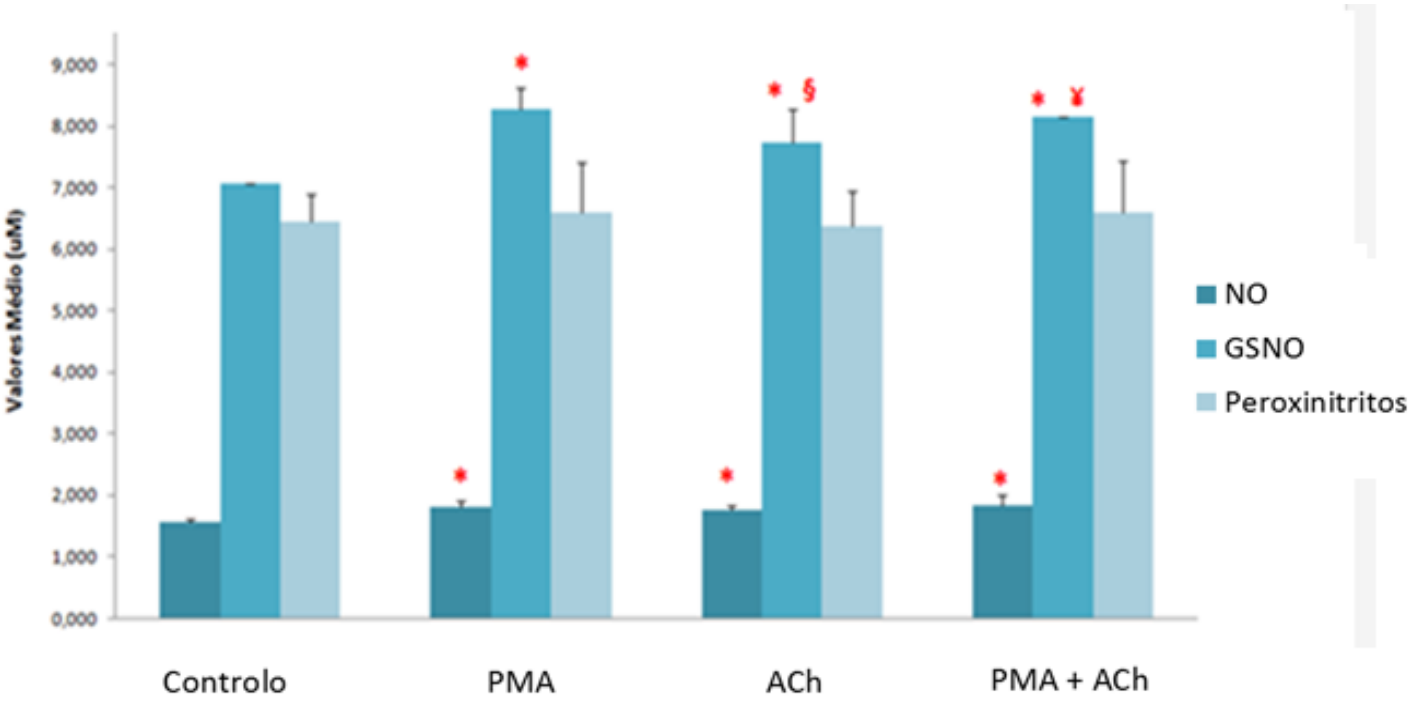

Figura 6. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do PMA, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 10. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus PMA; ¥p<0,05 versus ACh.

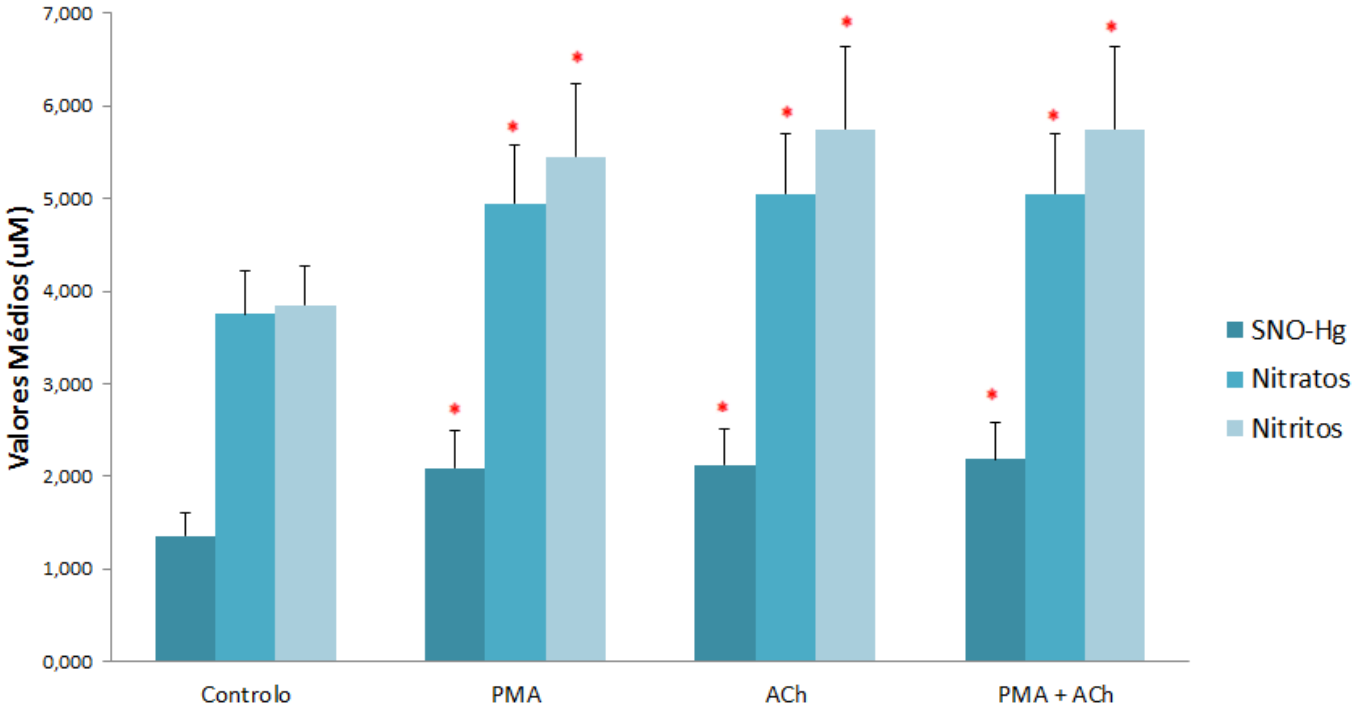

Figura 7. Média e desvio padrão dos valores de concentração de SNO-Hg, nitratos e nitritos com a adição do PMA, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 10. *p<0,05 versus Controlo.

✓ A adição do PMA provocou um aumento significativo da concentração de NO (1,81±0,10 µM) em relação à alíquota controlo (1,56±0,06 µM) (p<0,001). Com a adição de ACh ocorreu um aumento significativo da concentração de NO (1,77±0,08 µM) em relação à alíquota controlo (1,81±0,10 µM) (p<0,002), o mesmo ocorrendo com a adição do PMA+ACh (1,84±0,16 µM) (p<0,002). Estes resultados apontam para um efeito na concentração de NO semelhante entre as alíquotas PMA (1,81±0,10 µM) e ACh (1,77±0,08 µM). A adição dos dois efectores (PMA+ACh) em simultâneo não resultou numa variação significativa das concentrações de NO (1,88±0,58 µM), evidenciando que o efeito das moléculas não é cumulativo.

✓ A adição do PMA provocou um aumento na concentração de GSNO (8,27±0,34 µM) em relação às alíquotas controlo (7,07±0,00 µM) (p<0,001) e alíquota ACh (7,73±0,56 µM) (p<0,005). A adição de ACh aumentou a concentração do GSNO

(7,73±0,56 µM) em relação à alíquota controlo (7,07±0,00 µM) ($p<0,002$). Quando se adicionou o activador da PKC com ACh (PMA+ACh), também se verificou um aumento significativo da concentração de GSNO (8,16±0,00 µM) em relação às alíquotas controlo (7,07±0,00 µM) ($p<0,001$) e ACh (7,73±0,56 µM) ($p=0,033$), mostrando que o efeito da activação da PKC não é alterado com a adição de ACh.

✓ Os resultados da concentração dos peroxinitritos foram muito semelhantes entre as quatro alíquotas, controlo (6,44±0,46 µM), PMA (6,61±0,81 µM), ACh (6,38±0,56 µM) e PMA+ACh (6,60±0,83 µM), o que demonstra que tanto a adição do PMA, como a adição de ACh não originam alterações significativas na concentração de peroxinitritos.

✓ A adição do PMA provocou um aumento significativo da concentração de SNO-Hb (2,12±0,39 µM) em relação à alíquota controlo (1,36±0,25 µM) ($p<0,001$), dos nitratos (5,05±0,64 µM) em relação à alíquota controlo (3,75±0,47 µM) ($p<0,001$) e dos nitritos (5,75±0,88 µM) em relação à alíquota controlo (3,85±0,42 µM) ($p<0,001$). Com a adição de ACh ocorreu um aumento significativo da concentração de SNO-Hb (2,09±0,40 µM) em relação à alíquota controlo (1,36±0,25 µM) ($p<0,001$), dos nitratos (5,45±0,78 µM) em relação à alíquota controlo (3,75±0,47 µM) ($p<0,001$) e dos nitritos (5,45±0,78 µM) em relação à alíquota controlo (3,85±0,42 µM) ($p<0,001$). Estes resultados evidenciam que à adição do PMA e ACh têm um efeito semelhante na concentração da SNO-Hb, nitratos e nitritos, o qual não é cumulativo.

9. Ensaio *Ex Vivo*

Como já foi referido anteriormente, a amostragem desta segunda fase da tese de mestrado foi condicionada por diversos factores tendo sido apenas recolhidos 5 doentes com enfarte agudo do miocárdio (AMI).

9.1 Caracterização do Grupo de Estudo

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos doentes com AMI.

	AMI (n=5)
Género (f/m)	2/3
Idade (anos)	63
Índice de massa corporal – IMC (kg/m^2)	28,2±2,25
Factores de risco e co-morbilidades	
Hipertensão, n (%)	4 (80)
Tabagismo, n (%)	1 (20)
Dislipidémia, n (%)	3 (60)
Diabetes, n (%)	1 (20)
Obesidade, n (%)	2 (40)
Historial familiar de doença coronária, n (%)	1 (20)
Evento prévio, n (%)	1 (20)

As características demográficas apresentadas na tabela 2 demonstram que dos cinco doentes dois eram do género feminino e três do género masculino, a média de idades deste grupo de doentes ronda os 63 anos e o IMC médio é de 28,2 kg/m2.

A análise dos factores de risco e co-morbilidades desta amostra identifica como factor de risco mais comum à hipertensão atingindo 80% dos doentes. Segue-se a dislipidémia que afecta 60 % dos doentes e a obesidade em 40% dos doentes.

Tabela 3. Medicação pré-evento dos doentes com AMI.

	AMI (n=5)
Aspirina, n (%)	1 (20)
Inibidor da enzima conversora da angiotensina, n (%)	1 (20)
Anti-agregantes plaquetários, n (%)	1 (20)
β-bloqueantes, n (%)	3 (60)
Estatinas, n (%)	2 (40)

A tabela 3 descreve a medicação tomada pelos doentes incluídos no estudo antes do AMI, sendo a medicação mais comum neste grupo os β-bloqueantes tomados por 60% dos doentes, seguindo-se as estatinas tomadas por 40% dos doentes.

9.2 Caracterização Hematológica e Hemorreológica do Grupo de Estudo

Tabela 4. Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI. α- valores de referencia obtidos de Azevedo *et al*. (2010). π- valores de referência apenas de homens obtidos de vários trabalhos da Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação (UBiMI). ∑- valores de referência obtidos dos resultados da fase *in vitro* desta tese. ∞- valor de referência obtido de Tripette *et al.* (2009).

	AMI		Valores de referência	
	Mulheres **(n=2)**	Homens **(n=3)**	Mulheres	Homens
Parâmetros Hematológicos				
Hemoglobina (g/dl)	10,70±2,96	15,37±1,07	12 - 16,5 α	13,5 – 18 α
Eritrócitos (10^6/ul)	3,79±0,28	4,70±0,17	4,0 - 5,6 α	4,5 - 6,5 α
Hematócrito (%)	32,55±7,28	44,40±3,30	35 – 47 α	40 -– 54 α
Distribuição eritrócitos (%)	14,54±0,97		11 - 14 % α	
Parâmetros Hemoreológicos				
Deformabilidade 0,6 (mPa) (%)	8,07±1,47		4,40±0,31 π	
Deformabilidade 6 (mPa) (%)	41,83±2,46		37,27±0,89 π	
Deformabilidade 30 (mPa) (%)	52,55±2,95		48,02±1,84 π	
Agregação 5 s (sd)	10,59±0,42		7,95±1,67 π	
Agregação 10s (sd)	18,77±0,36		14,04±4,08 π	
Parâmetros Bioquímicos				
NO (μM)	1,53±0,002		1,68±0,13 ∑	
GSNO (μM)	5,99±0,00		7,07±0,30 ∑	
Fibrinogénio Claus (mg/dl)	2,43±1,3		3±0,5 ∞	

A tabela 4 ilustra a média de vários parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos obtidos neste estudo, bem como os valores de referência para estes parâmetros.

Os resultados dos parâmetros hematológicos mostram que para as mulheres os valores de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito foram inferiores em relação aos valores de referência, para os homens os resultados obtidos encontram-se dentro dos valores de referência.

Os resultados dos parâmetros hemorreológicos, mostram que os valores da agregação eritrocitária foram superiores em relação aos valores de referência, enquanto os valores da deformabilidade eritrocitária não sofreram alterações comparando com os valores de referência.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos demonstraram que os doentes com AMI analisados neste trabalho apresentaram um menor efluxo de NO eritrocitário e uma menor concentração eritrocitária de GSNO comparando com os valores de referência, enquanto para as concentrações de fibrinogénio não se evidenciaram diferenças entre os cinco doentes com AMI e os valores de referência.

9.3 Comparação entre géneros

Tabela 5. Valores dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI distribuídos por género.

	AMI	
	Mulheres (n=2)	**Homens (n=3)**
Hemoglobina (g/dl)	10,70±2,96	15,37±1,07
Eritrócitos (10^6/ul)	3,79±0,28	4,70±0,17
Hematócrito (%)	32,55±7,28	44,40±3,30
Distribuição eritrócitos (%)	16,00±3,40	13,57±0,25
Deformabilidade 0,6 (mPa) (%)	7,82±3,27	8,24±4,02
Deformabilidade 6 (mPa) (%)	43,75±2,34	40,56±7,17
Deformabilidade 30 (mPa) (%)	58,16±6,49	48,81±3,70
Agregação 5 s (sd)	10,52±0,21	10,64±1,30
Agregação 10s (sd)	19,38±0,12	18,36±0,79
NO (uM)	1,52±0,006	1,53±0,006
GSNO (uM)	5,99±0,00	5,99±0,00

Quando se analisa as médias dos parâmetros estudados separadas por género (tabela 5), apenas se encontram diferenças significativas entre ambos os géneros para a contagem de eritrócitos (p=0,020). Tais resultados evidenciam que nesta amostra a diferença de género não é um factor significativo.

9.4 Comparação entre Classes de Factores de Risco

Tabela 6. Valores dos parâmetros hematológicos, hemorreológicos e bioquímicos dos doentes com AMI distribuídos pelas três classes de factores de risco.

	Classes de Factores de Risco dos Doentes com AMI		
	Sem factores de risco (n=1)	**Com um ou dois factores de risco (n=1)**	**Com três ou mais factores de risco (n=3)**
Hemoglobina (g/dl)	14,20	15,60	12,57±3,86
Eritrócitos (10^6/ul)	4,79	4,80	4,03±0,47
Hematócrito (%)	40,80	45,10	37,47±9,95
Distribuição eritrócitos (%)	13,30	13,60	15,27±2,72
Deformabilidade 0,6 (mPa) (%)	4,30	8,10	9,32±3,49
Deformabilidade 6 (mPa) (%)	34,12	39,27	45,26±3,10
Deformabilidade 30 (mPa) (%)	48,66	45,19	56,30±5,60
Agregação 5 s (sd)	10,37	9,50	11,03±0,90
Agregação 10s (sd)	17,50	18,50	19,28±0,20
NO (uM)	1,52	1,53	1,53±0,006
GSNO (uM)	5,99	5,99	5,99±0,00

Quando se analisa as médias dos parâmetros estudados separadas pelas três classes de factores de risco (tabela 6), encontram-se diferenças significativas apenas para a agregação 10s (p=0,032), havendo um aumento da agregação consistente com o aumento de factores de risco.

De realçar no entanto que o reduzido número de amostras não permite uma análise extensa, o que ainda é mais evidente na divisão por género ou classes de factores de risco.

Discussão

As vias de sinalização do metabolismo do NO eritrocitário, têm sido alvo de extensa investigação e pesquisa nos últimos anos, tendo havido avanços muito significativos na compreensão de alguns mecanismos envolvidos nos processos de regulação do tónus vascular e das propriedades vasodilatadoras do NO. No entanto, devido à complexidade desses mecanismos ainda existem muitas questões por esclarecer.

O NO como é uma molécula instável, que se converte rapidamente em derivados metabólicos mais estáveis para assegurar a sua biodisponibilidade (Archer, 1993), e para tal pode reagir com a hemoglobina ou com o GSH, que são moléculas presentes em grandes concentrações nos eritrócitos (Seeley *et al.*, 2005). O NO nos eritrócitos pode: (1) ligar-se à hemoglobina através da cadeia beta da cisteina levando a formação de SNO-Hb (Gross e Lane, 1999); (2) ligar-se ao anião superóxido resultante da auto-oxidação da hemoglobina, dando origem aos peroxinitritos, que em elevadas concentrações são citotóxicos e por isso são convertidos em nitratos (Pryor e Squadrito. 1995); (3) ligar-se a oxihemoglobina dando origem aos nitratos que podem depois ser convertidos em nitritos pela acção da metahemoglobina redutase (Gibson e Roughton, 1957); (4) ligar-se ao GSH formando o GSNO (Spencer *et al*.,2000).

Os resultados obtidos demonstraram que a adição de ACh nos eritrócitos provoca um aumento do efluxo de NO e das concentrações intra-eritrocitárias de GSNO, SNO-Hb, nitratos e nitritos, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores da UbiMI/IMM/FMUL. Carvalho *et al*. (2004) e Almeida *et al*. (2009) evidenciaram um aumento na concentração eritrocitária dos nitratos e nitritos e o aumento do efluxo de NO eritrocitário com a adição de ACh. A via metabólica sugerida por Carvalho *et al.* (2009) apresenta uma explicação para os resultados obtidos. Segundo esses autores, a formação do complexo AChE-substrato através da adição da ACh provoca alterações conformacionais na associação da proteína banda 3 com a proteína G (subunidades Gαi1/ Gαi2 e Gβ). A par destas alterações conformacionais ocorre também um aumento da actividade das PTKs na membrana dos eritrócitos, tendo como consequência a fosforilação da proteína banda 3, o que induz um maior efluxo de NO eritrocitário e uma maior concentração intra-eritrocitária dos seus metabólitos derivados (GSNO, SNO-Hb, nitratos e nitritos).

A alteração conformacional da AChE, resultante da adição dos anticorpos N-19 ou C-16, provocou a redução do efluxo de NO e uma menor concentração de GSNO intra-eritrocitário. Estes efeitos mantiveram-se na presença de ACh. Assim, os resultados parecem sugerir que a alteração conformacional da AChE (provocada pelos anticorpos) altera sua ligação funcional à ACh, modificando o complexo ACh-AChE.

A inibição enzimática da PKC (através da cheleretrina) diminuiu o efluxo de NO e reduziu a concentração intra-eritrocitária de GSNO, enquanto a activação da PKC (pelo PMA) teve o efeito inverso.

A PKC nos eritrócitos apresenta um duplo papel. Por um lado fosforila a proteína 4.1 R levando ao decréscimo das interacções entre a espectrina e actina (Nunomura *et al*., 2000). Por outro, conduz à fosforilação da PTP nos resíduos de serina/treonina (Mohamed e *Steck*, 1986) promovendo a inactivação da PTP e a consequente activação da PTK (Yannoukakos *et al*., 1981), induzindo uma fosforilação indirecta da proteína banda 3 (Zhaowei e Cohen, 1993).

A cheleretrina ao inibir enzimaticamente a PKC torna a fosforilação do complexo 4.1 R menos eficiente, aumentando o número de ligações entre a espectrina e a actina, promovendo assim uma maior ligação entre as proteínas da membrana dos eritrócitos e as proteínas do citoesqueleto. Para além disso, provoca também uma desfosforilação indirecta da proteína banda 3, dificultando o efluxo de NO eritrocitário (Carvalho *et al*., 2009). Assim, se compreende que a adição da cheleretrina em simultâneo com a ACh não tenha provocado diferenças significativas no efluxo de NO e na concentração intra-eritrocitária de GSNO, já que a adição simultânea dos dois efectores anulou o seu efeito, permanecendo inalterado o nível de fosforilação da proteína banda 3.

O PMA ao activar enzimaticamente a PKC induz uma maior fosforilação das proteínas do complexo 4.1R e das PTP nos resíduos de serina/treonina, e promove a inactivação da PTP e a activação da PTK. Desta forma, ocorre a fosforilação indirecta da proteína banda 3, aumentando o efluxo de NO eritrocitário (Carvalho *et al*., 2009). No presente estudo, a adição do PMA e de ACh em simultâneo aumentou o efluxo de NO e aumentou as concentrações intra-eritrocitárias de GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos, resultados que são semelhantes aos efeitos da adição dos dois efectores em separado. Tais resultados sugerem que a adição dos dois efectores não apresenta um efeito cumulativo nos marcadores do metabolismo de NO estudados.

Relativamente às concentrações dos peroxinitritos, estas não variaram nem com a alteração conformacional da AChE nem com a alteração enzimática da PKC, à semelhança do que aconteceu com a adição de ACh. Tais resultados parecem reforçar a ideia da rápida transformação dos peroxinitritos em nitratos, uma vez que estes em concentrações elevadas são citotóxicos para as células. Para além disso, com tal transformação a biodisponibilidade do NO continua assegurada.

De forma geral, a alteração enzimática da PKC induziu o aumento da concentração intra-eritrocitária de SNO-Hb, nitratos e nitritos em relação aos controlos. No entanto essas diferenças só foram significativas no caso da experiência de adição de PMA (activação da PKC). O facto do aumento das concentrações de SNO-Hb e dos nitritos com a adição da cheleretrina não ser significativo necessita de posteriores estudos.

Variações nas concentrações de nitritos e nitratos com a fosforilação e desfosforilação da proteína banda 3 foram descritas também por Almeida *et al.* (2011). Estes autores demonstraram que quando a proteína banda 3 é fosforilada ocorre um aumento do efluxo de NO e um aumento das concentrações intra-eritrocitárias de GSNO, nitratos e nitritos. No entanto, quando a proteína banda 3 está desfosforilada (através da adição de AMGT) ocorre uma diminuição do efluxo do NO e da concentração intra-eritrocitária de GSNO, e um aumento das concentrações de nitratos e nitritos. Os resultados sugerem que as alterações de fosforilação/desfosforilação na proteína banda 3 e no complexo 4.1 R favorecem uma maior concentração intra-eritrocitária de SNO-Hb, nitratos e nitritos independentemente do efluxo de NO eritrocitário. No entanto, são necessários mais estudos a fim de perceber os mecanismos através dos quais tais alterações aumentam a concentração destes metabólitos derivados do NO eritrocitário.

O estudo da avaliação do metabolismo do NO eritrocitário no enfarte agudo do miocárdio incidiu somente sobre cinco doentes. Os critérios de inclusão, nomeadamente a inscrição no estudo nas primeiras 24h após o início da dor torácica ou outra manifestação clínica, condicionaram em parte o reduzido número de doentes incluídos no estudo. Tal número pode ser explicado também pela época do ano em que foi realizada a amostragem, a qual ocorreu essencialmente nos meses de primavera com clima mais ameno.

Segundo Wilson *et al*. (2010), a exposição ao frio, provoca uma maior contracção dos vasos sanguíneos, perda de capacidade motora, diminuição da pulsação e do ritmo respiratório e uma maior necessidade de oxigenação do miocárdio, no entanto, o ritmo cardíaco aumenta, aumentando assim o esforço cardíaco. Estes eventos desencadeados pela exposição ao frio obrigam o coração a um esforço suplementar, aumentando a probabilidade de ocorrência de enfarte agudo do miocárdio em períodos do ano em que as temperaturas sejam mais baixas. De facto, o trabalho de Almendra *et al.* (2010) que teve como base a população portuguesa, mostra o efeito da sazonalidade na taxa de incidência de enfartes agudos do miocárdio, tendo sido observado um maior número de internamentos durante o Inverno.

Segundo Burch e Pasquale (1962), as CVDs provocam alterações ao nível dos parâmetros reológicos do sangue.

A análise dos parâmetros hematológicos (hemoglobina, contagem eritrocitária, hematócrito e distribuição eritrocitária) obtidos no presente estudo não demonstrou alterações significativas entre os valores apresentados pelos doentes e os valores de referência de indivíduos saudáveis, exceptuando uma ligeira diminuição dos valores de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos por parte das mulheres. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Ernst *et al*. (1990), que demonstrou que o AMI não provoca diferenças significativas nos valores da viscosidade plasmática, hematócrito e contagem de leucócitos.

Os resultados de Cecchi *et al*. (2008), demonstraram que em doentes com AMI com supradesnivelamento do segmento ST os valores de hematócrito são elevados. Os autores consideraram assim o valor do hematócrito como um factor de risco para o AMI, baseando-se no facto de um valor superior de hematócrito provocar o aumento da resistência microvascular e a diminuição do fluxo sanguíneo favorecendo a oclusão total da artéria. No entanto, os valores de hematócrito dos cinco doentes do presente estudo apresentaram valores inferiores aos valores de referência, o que pode estar condicionado pelo reduzido número de amostras.

A análise dos parâmetros hemorreológicos, demonstrou um aumento da agregação eritrocitária nos doentes com AMI em relação aos valores de referência de indivíduos saudáveis. Não se evidenciaram diferenças na deformabilidade eritrocitária. Tais resultados estão de acordo com estudos anteriores da UBiMI/IMM/FMUL (Saldanha *et al*., 1999, Sargento *et al*., 2003) e com a restante literatura (Dodds *et al*., 1980, Pfafferott *et al*., 1999).

De acordo com Lowe (1986) a oclusão das artérias coronárias resultante da placa aterosclerótica, com a consequente redução do fluxo sanguíneo no miocárdio, pode ser agravada pelo aumento da viscosidade sanguínea. A hiperviscosidade sanguínea pode resultar do aumento da agregação eritrocitária, do aumento da concentração de fibrinogénio, do aumento do hematócrito e da menor deformabilidade eritrocitária (Sargento *et al*., 2002). O aumento da agregação eritrocitária tem sido associado com a redução do fluxo sanguíneo capilar (Soutani *et al*., 1995), hipóxia tecidular (Tateishi *et al*., 2002) e disfunção endotelial (Baskurt *et al*., 2004), condições que podem ocorrer no AMI.

De acordo com o trabalho de Sargento *et al*. (1996) a deformabilidade eritrocitária em doentes com AMI está dependente das forças de cisalhamento utilizadas. Segundo estes autores a capacidade de deformabilidade dos eritrócitos não se altera com forças de cisalhamento superiores a 1,20 mPa.s, no entanto, para forças iguais ou inferiores a 1,20 mPa.s verificou-se menor deformabilidade eritrocitária comparando com os valores de referência. Esta dependência da deformabilidade eritrocitária com as forças de cisalhamento, não foi evidenciada no presente estudo. Com forças de cisalhamento superiores a 1,20 mPa.s (6 e 30 mPa.s) os valores de deformabilidade dos doentes não sofreram alterações. No entanto, com força de cisalhamento inferior a 1,20 mPa.s (0,6 mPa.s) não se evidenciou uma menor deformabilidade em relação aos valores de referência como seria de esperar.

De acordo com Saldanha *et al*. (1999) após o AMI a membrana eritrocitária dos doentes tende a ficar mais rígida, o que pode explicar o aumento da agregação eritrocitária e a diminuição da deformabilidade evidenciadas. Estes resultados foram também descritos por outros autores que demonstraram que doentes com AMI apresentavam uma maior agregação eritrocitária (Pfafferott *et al.*, 1999), e uma menor deformabilidade eritrocitária (Dodds *et al*., 1980) comparando com indivíduos saudáveis.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos demonstraram que para os doentes com AMI analisados neste trabalho o efluxo de NO e as concentrações GSNO eritrocitário foram inferiores aos valores de referência. Relativamente às concentrações de fibrinogénio não se evidenciaram diferenças entre os cinco doentes com AMI e os valores de referência.

A redução da biodisponibilidade de NO em doentes com AMI evidenciada neste trabalho, provocada pela diminuição do efluxo de NO e pela diminuição da

concentração de GSNO eritrocitário vai de encontro com a bibliografia existente, visto que a redução da biodisponibilidade de NO conduz a uma situação de disfunção endotelial, que desencadeia alterações importantes na parede dos vasos as quais são precursoras da formação da placa aterosclerótica (Madamanchi *et al*., 2005) dando origem ao AMI.

O trabalho de Yang *et al*. (2006) também demonstrou uma diminuição da biodisponibilidade de NO em doentes com AMI, tendo evidenciado uma menor concentração de nitratos e nitritos 3 horas após o AMI.

Se essas alterações são causa (directa ou indirecta) ou consequência da ruptura da placa está ainda por apurar.

De acordo com Reinhart (2003), o fibrinogénio é o principal determinante da viscosidade plasmática e da agregação nos eritrócitos afectando a viscosidade do sangue tanto em altas tensões (principalmente na circulação nas artérias, arteríolas, e capilares) como em baixas tensões (principalmente na circulação em veias e sob estase), tendo sido sugerido que o fibrinogénio interage com a membrana do eritrócito de forma a possibilitar a sua agregação. Para além disso, o aumento da concentração de fibrinogénio é um factor de risco para as doenças coronárias (Woodward *et al*., 1998). Estudos recentes, mostraram que nas primeiras 6 horas após o enfarte as concentrações de fibrinogénio permanecem semelhantes aos valores de referência, começando a aumentar após 32 horas (Steinvil *et al*., 2010). Desta forma, e tendo em conta que os doentes foram incluídos no presente estudo na fase aguda do evento até 24 horas após o início da sintomatologia, os resultados obtidos neste estudo para as concentrações de fibrinogénio estão de acordo com os resultados de Steinvil *et al*. (2010).

Considerações Finais

O metabolismo do NO eritrocitário tem sido alvo de extensa pesquisa nos últimos anos. Inúmeros progressos foram alcançados até a data, no entanto, ainda existem muitas questões por esclarecer.

Os resultados obtidos com a realização do estudo *in vitro* estão representados de forma resumida na tabela 7.

Tabela 7. Variação do efluxo de NO e das concentrações intra-eritrocitárias de GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos com a adição de ACh, AChE N-19, AChE C-16, Che, PMA, em relação aos valores controlo. ↑-aumento da concentração em relação ao controlo, ↓- diminuição da concentração em relação ao controlo, =- concentração permanece igual ao controlo, 0- ensaio não realizado.

	NO	**GSNO**	**Peroxinitritos**	**SNO-Hb**	**Nitratos**	**Nitritos**
In Vitro						
ACh	↑	↑	=	↑	↑	↑
Alteração conformacional da AChE						
AChE N-19	↓	↓	=	**0**	**0**	**0**
AChE C-16	↓	↓	=	**0**	**0**	**0**
Inibição/Activação da PKC						
Che	↓	↓	=	=	↑	=
PMA	↑	↑	=	↑	↑	↑

A análise dos resultados obtidos com a realização deste trabalho demonstrou que:

- ✓ A adição de ACh estimula o efluxo de NO eritrocitário e aumenta as concentrações intra-eritrocitárias de SNO-Hb, nitratos e nitritos.

- ✓ A adição de anticorpos específicos da AChE dos domínios N- e C-terminal demonstra o mesmo grau de eficiência na alteração conformacional da AChE, evidenciada pelas alterações provocadas no efluxo de NO, indicando que ambos podem ser utilizados com o fim de bloquear a formação do complexo AChE-ACh.

- ✓ O grau de fosforilação do complexo 4.1 R e da proteína banda 3 influencia o efluxo de NO e a concentração intra-eritrocitária de GSNO, provocado pela inibição ou activação da PKC.

- ✓ As alterações do grau de fosforilação da proteína banda 3 e do complexo 4.1 R favorecem maiores concentrações intra-eritrocitárias de SNO-Hb, nitratos e nitritos independentemente do efluxo de NO eritrocitário.

- ✓ A concentração intra-eritrocitária dos peroxinitritos não é afectada pela adição da ACh, pela alteração conformacional da AChE ou pelas alterações do grau de fosforilação da proteína banda 3 e do complexo 4.1 R.

- ✓ O estudo *ex vivo*, apesar de incluir um número reduzido de doentes permitiu verificar um menor efluxo de NO eritrocitário e uma menor concentração intra-eritrocitária de GSNO comparando com os valores de referência. Estudos longitudinais alargados serão necessários para determinar se tais variações persistem ao longo do tempo e se são causa ou consequência da ruptura da placa na fase aguda do enfarte do miocárdio. Os resultados de tais estudos futuros poderão indicar a determinação destas moléculas como medidas de diagnóstico ou prognóstico do AMI.

A realização deste trabalho foi mais um passo com vista ao conhecimento integral dos mecanismos do metabolismo do NO eritrocitário e das suas vias de sinalização. No entanto ainda há um longo caminho a percorrer de modo a poder utilizar todo potencial do NO tanto ao nível do diagnóstico como terapêutico, no AMI.

Referências Bibliográficas

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry*. 357(3):593–615.

Almeida JP, Freitas-Santos T, Saldanha C. 2009. Fibrinogen-dependent signaling in microvascular erythrocyte function: implications on nitric oxide efflux. Journal Membrane Biology. 231(1): 47-53.

Almeida JP, Freitas-Santos T, Saldanha C. 2011. Evidence that the degree of band 3 phosphorylation modulates human erythrocytes nitric oxide efflux – *in vitro* model of hyperfibrinogenemia. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 49(1):407-423.

Archer S. 1993. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB.* 7(2):349–360.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(8):3203–3207.

Azevedo AP, Silva P, Marcelo C, Gamelas C, Teixeira V, Vieira A, Francisco FD, Cruz M. 2010. Valores de referência para hemograma na população da zona metropolitana de Lisboa. *Acta Medica Portuguesa*. 23:597-604.

Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, Meiselman HJ. 2004. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 286(1):222-229.

Baumler H, Neu B, Donath E, Kiesewetter H. 1999. Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation biorheology. *Biorheology*. 36(5):439–442.

Burch GE, Pasquale NP. 1960. Hematocrit, blood viscosity and myocardial infarction. *American Journal of Medicine.* 32:161-164.

Cai H. 2005. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circulation Research*. 96:818-840.

Camacho CRC, Melicio LAD, Soares AMVC. 2007. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arquivos de Ciências da Saúde*. 14(1):41-48.

Caras IW, Weddell GN, Williams SR. 1989. Analysis of the signal for attachment of a glycophospholipid membrane anchor. *Cell Biology*. 108(4):1387–1396.

Carvalho FA, Almeida JP, Freitas-Santos T, Saldanha C. 2009. Modulation of erythrocyte acetylcholinesterase activity and its association with G protein-band 3 interactions. *Membrane biology*. 228(2):89-97.

Carvalho FA, Martins e Silva J, Saldanha C. 2004. Amperometric measurements of nitric oxide in erythrocytes. *Biosensors and Bioelectronics.* 20(3):505-513.

Cecchi E, Liotta AA, Gori AM, Valente S, Giglioli C, Lazzeri C, Sofi F, Gensini GF, Abbate R, Mannini L. 2008. Comparison of Hemorheological Variables in ST-Elevation Myocardial Infarction Versus Those in Non-ST-Elevation Myocardial Infarction or Unstable Angina Pectoris. *American Journal of Cardiology*. 102(2):125–128.

Colonna GV, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. 2009. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Medical science monitor*. 15(4):91-101.

Cook JA, Kim SY, Teague D, Krishna MC, Pacelli R, Mitchell JB, Vodovotz Y, Nims RW, Christodoulou D, Miles AM, Grisham MB, Wink DA. 1996. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal Biochemistry*. 238(2):150-158.

Dawber TR, Meadors GF, Moore FE. 1951. Epidemiological approaches to heart disease the Framingham Study. *American Journal of Public Health*. 41(3):279-286.

Dodds AJ, Boyd MJ, Allen J, Bennett ED, Flute PT, Dormandy JA. 1980. Changes in red cell deformability and other haemorrheological variables after myocardial infarction. *British Heart.* 44: 508-519.

Dormandy JA. 1971. Influence of blood viscosity on blood flow and the effect of low molecular weight dextran. *British Medical*. 5(5789):716-725.

Fabry TL. 1987. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*. 70(5):1572–1576.

Fambrough DM, Engel AG, Rosenberry TL. 1982. Acetylcholinesterase of human erythrocytes and neuromuscular junctions: Homologies revealed by monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79(4):1078–1082.

Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. 2004. Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 110(5):522-527.

Furchgott RF, Zawadzki JV, Cherry PD. 1981. Role of the endothelium in the vasodilator response to acetylcholine. In Vasodilatation, *Raven Press*. 49-66.

Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789):373-379.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *The New England Journal of Medicine*. 326:310-318.

Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J. 1988. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation*. 77(6):1213-1220.

Gerrity RG. 1981. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *American Journal of Pathology*. 103(2):181-190.

Gibson WH, Roughton FJ. 1957. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *Physiology*. 136(3):507–524.

Gillum RF. 1987. The association of body fat distribution with hypertension, hypertension heart disease, coronary heart disease, diabetes and cardiovascular risk factors in men and women aged 18-79 years. *Chronic Diseases*. 40(5):421-428.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry.* 264(3):672–686.

Gross SS, Lane P. 1999. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96:9967-9969.

Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinic Chemistry Acta.* 274(2):177-1788.

Harrison ML, Rathinavelu P, Arese P, Geahlen RL, Low PS. 1991. Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. *Biological Chemistry*. 266(7):4106–4111.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 84(24):9265-9274.

Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS. 1991. Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and non erythroid beta-spectrin. *Cell Biology.*115(1):267–277.

Kinlay S, Libby P, Ganz P. 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Current Opinion in lipidology*. 12(4):383-392.

Kolansky D. 2009. Acute coronary syndromes: morbidity, mortality, and pharmacoeconomic burden. *American Journal of Manage Care*; 15(2):36-41.

Korbut R, Gryglewski RJ. 1993. Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*. 234(1):17–22.

Kumar A, Cannon CP. 2009. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clinic Proceedings.* 84(10):917-38.

Kumar A, Schupp E, Bunnell E, Ali A, Milcarek B, Parrillo JE. 2008. Cardiovascular response to dobutamine stress predicts outcome in severe sepsis and septic shock. *Critical Care*. 12(2):35

Libby P, Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 111:3481-3488.

Low PS, Allen DP, Zioncheck TF, Chari P, Willardson BM, Geahlen RL, Harrison ML. 1987. Tyrosine phosphorylation of Band 3 inhibits peripheral protein binding. *Biological Chemistry*. 262(10):4592-4598.

Lowe GD. 1986. Blood rheology in arterial disease. *Clinic Science*. 71(2):137-183.

Maas R, Boger RH. 2003. Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atherosclerosis*. 4(4):5-17.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. 2005.Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 25(1):29-38.

Massouli´e J, Bon S, Rieger F, Vigny M. 1975. Molecular forms of acetylcholinesterase. *Croatica Chemica Acta.* 47:163–179.

Mesquita R, Pires I, Saldanha C, Martins-Silva J. 2001. Effects of acetylcholine and spermine on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. *Clinical hemorheology and microcirculation.* 25(3):153–163.

Michelson MJ, Zeimal EV. 1973. Acetylcholine. An Approach to the Molecular Mechanism of Action. *Pergamon* Press: Oxford.

Mohamed AH, Steck TL. 1986. Band 3 tyrosine kinase. Association with the human erythrocyte membrane. *Biological Chemistry*. 252(6):2804–2809.

Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. 1980. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *Journal of Clinic Investigation*. 66(3):563-573.

Nunomura W, TakakuwaY, Parra M, Conboy JG, Mohandas N. 2000. Ca2+-dependent and Ca2+-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1 Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *Biological Chemistry*. 275:6360–6367.

Okrainec K, Banerjee DK, Eisenberg MJ. 2004. Coronary artery disease in the developing world. *American Heart*. 148(1):7-15.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare

professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 107:499-511.

Pfafferott C, Moessmer G, Ehrly AM, Bauersachs RM. 1999. Involvement of erythrocyte aggregation and erythrocyte resistance to flow in acute coronary syndromes. *Clinic Hemorheology. Microcirculation* 21(1):35–43.

Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G. 1997. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Leterst* . 416(2):175-183.

Pryor WA, Squadrito GL. 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology*. 268(5):699–722

Reinhart WH. 2003. Fibrinogen--marker or mediator of vascular disease?, *Vascular Medicine*. 8(3):211-216.

Saldanha C, Sargento L, Monteiro J, Perdigao C, Ribeiro C, Martins e Silva J. 1999. Impairment of the erythrocyte membrane fluidity in survivors of acute myocardial infarction. A prospective study. *Clinic Hemorheology Microcirculation*. 20(2):111–116.

Samsel RW, Perelson AS. 1984. Kinetics of rouleau formation. *Biophysical*. 45(4):805–824.

Sargento L, Monteiro J, Saldanha C, Perdigao C, Martins e Silva J, Ribeiro C. 1996. The evaluation of erythrocyte deformability in patients with an acute myocardial infarct by means of laser ectacytometry. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 15(12):935-936.

Sargento L, Saldanha C, Monteiro J, Perdigão C, Martins e Silva J. 2003. Evidence of prolonged disturbances in the haemostatic, hemorheologic and inflammatory profiles in transmural myocardial infarction survivors. *Thrombosis and Haemostasis*. 89(5):892-903.

Sargento L, Sobral do Rosário H, Monteiro J, Perdigão C, Saldanha C, Martins e Silva J. 2002. Factores biohemorreológicos e a curva de eventos cardiovasculares em sobreviventes de enfarte agudo do miocárdio transmural- 24 meses de seguimento clínico. *Revista Portuguesa Cardiologia*. 21(2):165-71.

Sastry BVR, Sadavongvivad C. 1979. Cholinergic systems in nonnervous tissues. *Pharmacological Reviews*. 30(1):65–132.

Schmid-Schonbein H, Volger E, Teitel P, Kieswetter H, Dauer V, Heilman L. 1982. New hemorheological techniques for the routine laboratory. *Clinical Hemorheology*. 2:93–105.

Seeley RR, Stephens TD, TATE P. 2005. Anatomia & fisiologia. *Lusociência 6ª ed. Loures*.

Shiu Y-T, McIntire LV. 2003. *In vitro* studies of erythrocyte-vascular endothelium interactions. *Annual Biomedical Engineering*. 31(11):1299–1313.

Sonveaux P, Kaz AM, Snyder SA, Richardson RA, Cardenas-Navia LI, Braun RD, Pawloski JR, Tozer GM, Bonaventura J, McMahon TJ, Stamler JS, Dewhirst MW. 2005. Oxygen regulation of tumor

perfusion by S-nitrosohemoglobin reveals a pressor activity of nitric oxide. *Circulation Research*. 96:1119–1126.

Soutani M, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. 1995. Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *American Journal of Physiology*. 268(5):1959-1965.

Spencer NY, Zeng H, Patel RP, Hogg N. 2000. Reaction of S-Nitrosoglutathione with the the heme group of deoxyhemoglobin. *Biological Chemistry*. 275(47):36562-36569

Steck, TL. 1974. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *Cell Biology*. 62(1):1-19.

Steinvil A, Berliner S, Shapira I, Rogowski O, Justo D, George J, Halkin A, Keren G, Finkelstein A, Banai S, Arbel Y. 2010. Time to rheology in acute myocardial infarction: inflammation and erythrocyte aggregation as a consequence and not necessarily as precursors of the disease. *Clinical Research in Cardiology*. 99(10):651–656.

Tateishi N, Suzuki Y, Shirai M, Cicha I, Maeda N. 2002. Reduced oxygen release from erythrocytes by the accelerationinduced flow shift, observed in an oxygen-permeable narrow tube. *Biomechanics*. 35(9):1241-1251.

The Pooling Project Research Group. 1978. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to the incidence of major coronary events: final report of the pooling project. *Chronic Disease*. 31(4):201-306.

Thygesen K, Alpert JS, White HD. 2007. Universal definition of myocardial infarction. *European Heart.* 28:2525.

Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougenel D, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Etienne-Julan M, Hue O, Meiselman HJ, Connes P. 2009. Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*. 94(8):1060–5.

VanBenthuysen KM, MaMurtry IF, Horwitz LD. 1987. Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium- dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity *in vitro*. *Clinic Investigation*. 79(1):265–274.

Wessler I, Kirckpatrick CJ, Racke´ K . 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 26(3):198–205.

Wilson TE, Gao Z, Hess KL, Monahan KD. 2010. Effect of aging on cardiac function during cold stress in humans. *American Journal of Physiology*. Regulatory. 298(6):1627-1633.

Winkelmann JC, Forget BG. 1993. Erythroid and non erythroid spectrin skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Blood*. 81:3173-3185.

Winzler RJ. 1970. Carbohydrates in cell surfaces. *International Review of Cytology*. 29:77–125.

Woodward M, Lowe GD, Rumley A, Tunstall-Pedoe H. 1998. Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease and mortality in middle-aged men and women. *European Heart*.19(1):1257–1260.

Wright DL, Plummer DT. 1973. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. *Biochemical*. 133(3):521–527.

Yang YJ, Zhao JL, You SJ, Wu YJ, Jing ZC, Yang WX, Meng L, Wang YW, Gao RL. 2006. Different effects of tirofiban and aspirin plus clopidogrel on myocardial no-reflow in a mini-swine model of acute myocardial infarction and reperfusion. *Heart*. 92:1131–1137.

Yannoukakos D, Vasseur C, Piau JP, Wajcman H, Bursaux E. 1991. Phosphorylation sites in human erythrocyte band 3 protein. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1061(2):253-266.

Yawata Y. 2003. Cell Membrane: The red blood cell as a Model. *John Wiley & Sons.*

Yedgar S, Koshkaryev A, Barshtein G. 2002. The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiology Haemostasis Thrombosis*. 32:263-268.

Yu J, Branton D. 1976. Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein Band 3 and lipid: Effects of spectrin-actin association. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 73(11):3891-3895.

Zhaowei AI, Cohen CM. 1993. Phorbol 12-myristatc 13-acetatc-stimulated phosphorylation of erythrocyte membrane skeletal proteins is blocked by calpain inhibitors: possible role of protein kinase M. *Biochemistry*. 296(3):675–683.

Anexos

Anexo I. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção N terminal da AChE, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 27 para o NO e GSNO, para os peroxinitritos n = 23. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus AChE N-19; ¥p<0,05 versus ACh.

	Modelo Experimental			
	Controlo	**AChE N-19**	**ACh**	**AChE N-19+ACh**
NO (µM)	1,84±0,25	1,49±0,15*	2,06±0,33*§	1,60±0,19*¥
GSNO (µM)	7,68±2,11	6,07±1,08*	8,44±3,19§	6,35±1,67¥
Peroxinitritos (µM)	10,39±2,89	11,27±3,45	10,54±2,84	10,79±3,02

Anexo II. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO e peroxinitritos com a adição do anticorpo da porção C terminal da AChE, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 21. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus AChE N-19; ¥p<0,05 versus ACh.

	Modelo Experimental			
	Controlo	**AChE C-16**	**ACh**	**AChE C-16+ACh**
NO (µM)	1,75±0,21	1,52±0,24*	1,99±0,25*§	1,65±0,21¥
GSNO (µM)	7,07±0,00	5,99±0,00*	8,00±0,86*§	6,35±0,63*¥
Peroxinitritos (µM)	8,89±1,21	9,20±1,31	9,53±1,44	9,39±1,49

Anexo III. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos com a adição da cheleretrina, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 17 excepto para SNO-Hb n=10. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus Che; ¥p<0,05 versus ACh.

	Modelo Experimental			
	Controlo	**Che**	**ACh**	**Che+ACh**
NO (µM)	1,60±0,09	1,48±0,14*	1,79±0,11*§	1,55±0,11¥
GSNO (µM)	7,07±0,00	6,12±0,53*	7,78±0,54*§	6,37±0,66*¥
Peroxinitritos (µM)	5,67±1,13	5,48±0,99	5,60±1,11	5,44±1,03
SNO-Hb (µM)	1,37±0,56	1,88±0,58	1,51±0,33	1,92±0,67
Nitratos (µM)	4,34±1,12	5,57±1,39*	5,48±1,36	5,54±1,17*
Nitratos (µM)	5,28±1,78	6,42±1,62	6,36±2,16	6,60±1,64

Anexo IV. Média e desvio padrão dos valores de concentração de NO, GSNO, peroxinitritos, SNO-Hb, nitratos e nitritos com a adição do PMA, na presença e ausência de ACh. Amostra n = 10. *p<0,05 versus Controlo; §p<0,05 versus PMA; ¥p<0,05 versus ACh.

	Modelo Experimental			
	Controlo	**PMA**	**ACh**	**PMA+ACh**
NO (µM)	1,56±0,06	1,81±0,10*	1,77±0,08*	1,84±0,16*
GSNO (µM)	7,07±0,00	8,27±0,34*	7,73±0,56§	8,16±0,00*¥
Peroxinitritos (µM)	6,44±0,46	6,61±0,81	6,38±0,56	6,60±0,83
SNO-Hb (µM)	1,36±0,25	2,12±0,39*	2,09±0,40*	2,19±0,40*
Nitratos (µM)	3,75±0,47	5,05±0,64*	4,95±0,63*	5,05±0,64*
Nitratos (µM)	3,85±0,42	5,75±0,88*	5,45±0,78*	5,75±0,88*