

## eNOS se Correlaciona com a Biogênese Mitocondrial em Corações com Cardiopatia Congênita e Cianose

*eNOS Correlates with Mitochondrial Biogenesis in Hearts of Congenital Heart Disease with Cyanosis*

Juan Xiao, Lin Chen, Xuefeng Wang, Mei Liu, Yingbin Xiao

Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, PR China

### Resumo

**Fundamento:** O programa de biogênese mitocondrial no coração parece apresentar remodelação adaptativa após estresse biomecânico e oxidativo. Os mecanismos adaptativos que protegem o metabolismo do miocárdio durante a hipóxia são coordenados, em parte, pelo óxido nítrico (NO).

**Objetivo:** Observar a biogênese mitocondrial e expressão do óxido nítrico sintase (NOS) em corações de cardiopatia congênita com cianose; discutir a resposta mitocondrial à hipóxia crônica do miocárdio.

**Métodos:** Foram investigados 20 pacientes com defeitos cardíacos cianóticos (n = 10) ou acianóticos (n = 10). Foram estudadas amostras do miocárdio na via de saída ventricular direita, tomadas durante a operação. A análise morfométrica de mitocôndrias foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A relação mtDNA/nDNA foi determinada com PCR em tempo real. Os níveis de transcrição da subunidade I da citocromo c oxidase (COXI), coativador-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), e fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) foram detectados por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) ativado por fluorescência em tempo real. Os níveis proteicos de COXI e nNOS, iNOS e eNOS foram medidos por técnica de Western Blot.

**Resultados:** A densidade volumétrica mitocondrial (Vv) e a densidade numérica (Nv) foram significativamente elevadas em pacientes com cianose, em comparação com a cardiopatia congênita acianótica. MtDNA elevada e suprarregulação dos níveis de COXI, PGC-1  $\alpha$ , NRF1 e Tfam mRNA foram observadas em pacientes cianóticos. Os níveis de proteína de COXI e eNOS foram significativamente maiores no miocárdio de pacientes cianóticos que nos de acianóticos. Os níveis de transcrição do PGC-1 $\alpha$  se correlacionam com os níveis de eNOS.

**Conclusão:** A biogênese mitocondrial é ativada no miocárdio da via de saída ventricular na cardiopatia congênita com cianose, que poderia ser a resposta adaptativa à hipóxia crônica e possivelmente envolve suprarregulação da eNOS. (Arq Bras Cardiol 2012;99(3):780-788)

**Palavras-chave:** Biogênese; mitocôndria cardíaca; cardiopatias congênitas; óxido nítrico sintase.

### Abstract

**Background:** Mitochondrial biogenesis program in heart appears to exhibit adaptive remodeling following biomechanical and oxidative stress. The adaptive mechanisms that protect myocardium metabolism during hypoxia are coordinated in part by nitric oxide (NO).

**Objective:** To observe mitochondrial biogenesis and nitric oxide synthase (NOS) expression in hearts of congenital heart disease with cyanosis, discuss mitochondrial response to chronic hypoxia in myocardium.

**Methods:** 20 patients with cyanotic (n=10) or acyanotic cardiac defects (n=10) were investigated. Samples from the right ventricular outflow tract myocardium taken during operation were studied. Morphometric analysis of mitochondria was performed with transmission electron microscope. Relative mtDNA/nDNA ratio was determined with real-time PCR. Cytochrome c oxidase subunit I (COXI), peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), and mitochondrial transcription factor A (Tfam) transcript levels were detected by real-time fluorescent RT-PCR. COXI and nNOS, iNOS and eNOS protein levels were measured with western blot.

**Results:** Mitochondrial volume density (Vv) and numerical density (Nv) were significantly elevated in patients with cyanotic compared to acyanotic congenital heart disease. Elevated mtDNA and up-regulated COXI, PGC-1 $\alpha$ , NRF1 and Tfam mRNA levels were observed in cyanotic patients. Protein levels of COXI and eNOS were significantly higher in the myocardium of cyanotic than of acyanotic patients. PGC-1 $\alpha$  transcript levels correlated with the levels of eNOS.

**Conclusion:** Mitochondrial biogenesis is activated in right ventricular outflow tract myocardium in congenital heart disease with cyanosis, which could be the adaptive response to chronic hypoxia and possibly involves eNOS up-regulation. (Arq Bras Cardiol 2012;99(3):780-788)

**Keywords:** Biogenesis; mitochondria; heart; heart defects; congenital; nitric oxide Synthase.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Yingbin Xiao •

Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, 183 Xinqiao Street, Chongqing, 400037, PR China  
E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

Artigo recebido em 10/12/11; revisado em 22/12/11; aceito em 16/04/12.

## Introdução

As mitocôndrias são o local de produção de energia oxidativa em células eucarióticas. Biogênese mitocondrial é definida como o controle do *turnover* mitocondrial, conteúdo e número necessário para manter as diversas demandas homeostáticas, nos diferentes tipos de tecido<sup>1</sup>. A biogênese mitocondrial envolve a ação coordenada de ambos os genomas codificados, nuclear e mitocondrial. O coativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1  $\alpha$ ), um coativador transcricional induzível, tem sido implicado como um regulador principal do programa da biogênese mitocondrial. O PGC-1  $\alpha$  interage com o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), estimulando a transcrição de muitos genes mitocondriais, bem como o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), regulador direto de replicação e transcrição do DNA mitocondrial<sup>2</sup>. No coração, as mitocôndrias são muito abundantes, constituem aproximadamente 40% do volume total de cardiomiócitos, e produzem mais de 90% da energia da célula<sup>3</sup>. O programa de biogênese mitocondrial no coração parece apresentar remodelação adaptativa após estresse biomecânico e oxidativo, por exemplo, após a hipóxia, e se considera um alvo explícito para intervenções terapêuticas cardíacas<sup>1</sup>.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa com uma vasta gama de atividades fisiológicas e também patológicas, incluindo a regulação do tônus do vaso e angiogênese em doenças cardiovasculares isquêmicas, cicatrização de feridas, inflamação e doenças malignas. O NO também tem um efeito complexo na mitocôndria, incluindo o aumento da biogênese dirigida pela maquinaria transcricional, mediante indução do PGC-1 $\alpha$  dependente de (sGC) cGMP sensível a guanilato ciclase solúvel, e redução da fosforilação oxidativa mediante inibição competitiva da transferência de elétrons na cadeia respiratória<sup>4</sup>. Durante a hipóxia<sup>5</sup>, os cardiomiócitos apresentam um aumento da produção de NO e algumas respostas hipóxicas adaptativas são regulados pelo NO no coração<sup>6</sup>. A sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) mostrou ser induzida por hipoxia<sup>7</sup>, e ser ativada pelo fator de transcrição HIF<sup>8</sup> induzido por hipoxia.

Uma vez que faltam dados sobre a resposta mitocondrial do miocárdio para hipoxemia crônica em razão da Doença Cardíaca Congênita (DCC), realizamos uma análise morfológica e molecular detalhada em corações de pacientes

com doença coronariana cianótica congênita, comparando perfis de expressão gênica de reguladores-chave da biogênese mitocondrial e proteínas eNOS com corações de pacientes com CPC sem cianose.

## Materiais e métodos

### Pacientes

Após a aprovação pelo Comitê de Ética Humana do Hospital Xinqiao, 20 pacientes com idade entre 2 e 22 anos (média de 9,2 anos), submetidos a cirurgia cardíaca primária, foram incluídos neste estudo prospectivo. Dez pacientes tinham defeito cardíaco cianótico e dez, acianótico. Este estudo foi realizado entre pacientes diagnosticados com cardiopatia congênita com obstrução da via de saída ventricular direita e que foram submetidos a cirurgias cardíacas no Departamento de Cirurgia Cardiovascular do Hospital Xinqiao, entre janeiro de 2008 e dezembro de 2008. A Tabela 1 mostra os dados clínicos dos pacientes. O estudo está de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki.

### Cirurgia cardíaca e amostragem de biópsias do miocárdio

Os agentes administrados para pré-medicação e anestesia geral convencional consistiram em todos os casos de midazolam, fentanil sulfato e brometo de pancurônio. Após o início da Circulação Extracorpórea (CEC), a aorta foi pinçada e a parada cardíaca induzida pela injeção intraaórtica de solução cardioplégica esfriada a 4°C. Uma biópsia foi retirada da via de saída ventricular direita, imediatamente após o pinçamento aórtico. As amostras do miocárdio tomadas para avaliação ultraestrutural foram imediatamente picadas em pedaços de 1-2 mm, e colocadas em glutaraldeído 2,5% frio por 12 h. As amostras recolhidas para RT-PCR, RT e Western Blott foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70.

### Estudo de microscopia eletrônica

As amostras em glutaraldeído foram posteriormente colocadas em tetróxido de ósmio; e então embebidas em resina epóxi. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo saturados. De cada amostra foram obtidas 10 micrografias eletrônicas de campos escolhidos

Tabela 1 - Dados dos pacientes

	Grupo acianótico (n = 10)	Grupo cianótico (n = 10)	Valor de p
Sexo (masculino/feminino)	6/4	4/6	NS
Idade (anos)	8,8 $\pm$ 5,9	9,5 $\pm$ 5,7	NS
Diagnóstico	DSV com obstrução da VSVD: n=10	TOF: n = 9 DSVD: n=1	
SaO <sub>2</sub> pré-operatória (%)	95,2 $\pm$ 2,3	85,2 $\pm$ 3,4	p < 0,01

Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. SaO<sub>2</sub>: saturação de oxigênio arterial transcutânea; Grupo acianótico: defeitos cardíacos congênitos acianóticos, Grupo cianótico: defeitos cardíacos congênitos cianóticos, DSV: comunicação interventricular, VSVD: via de saída do ventrículo direito; TOF: tetralogia de Fallot; DSVD: dupla saída de ventrículo direito; NS: Não significativo

aleatoriamente. A densidade volumétrica mitocondrial (VV), a densidade numérica (Nv) e a média do volume (V) foram determinadas com ampliação de  $\times 89,00$ , de acordo com o método de Nouette-Gaulain e cols.<sup>9</sup>, como segue: Vv é a fração de volume relativa das mitocôndrias determinada como a fração relativa de superfície da unidade de área composta por todas as fatias de mitocôndria. Nv depende das seções das mitocôndrias (NA) contadas por superfície de medida padrão, da distribuição de tamanho (K), e, finalmente, do formato da mitocôndria, na relação  $Nv = K \cdot NA^{3/2} / \beta \cdot Vv^{1/2}$ . O coeficiente de forma b para estruturas elipsoidais é uma função dos diâmetros longitudinal e transversal. Com base em estudos anteriores, foi assumido como sendo  $\beta = 2$  no coração<sup>10</sup>. K é determinada pela distribuição do tamanho dos objetos. De acordo com estudos anteriores em coração com hipóxia crônica, foi assumido como sendo  $K = 1,1$  no presente estudo<sup>10</sup>. V é a média de volume por mitocôndria obtida pela divisão simples de Vv por Nv.

### Relação mtDNA/nDNA

O DNA genômico total foi isolado a partir de amostras de miocárdio com o kit TIANamp Genomic DNA (Tiangen, China) de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo de MtDNA relativo ao DNA nuclear foi determinado utilizando um PCR quantitativo em tempo real realizado em um Sistema de Detecção de Sequência ABI PRISM7900. Primers específicos foram utilizados para amplificar um fragmento de 86bp do citocromo-b mitocondrial ou um fragmento 207bp do gene L10A da proteína ribossômica genômica nuclear. As reações de PCR foram realizadas como se segue: 95°C por 60s; 45 ciclos a 95°C 15s, 60°C 15s, 72°C 45s. Os testes de PCR foram realizados em triplicado para cada amostra de DNA. A expressão do número de cópias do mtDNA em relação ao DNA nuclear (relação mtDNA/nDNA) foi determinada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ <sup>11</sup>.

### Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-PCR)

O RNA total foi extraído a partir de amostras de miocárdio, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada utilizando 2  $\mu$ g de RNA. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o kit BioRT cDNA First Strand Synthesis (Bioer, China). A amplificação da PCR-RT em tempo real foi realizada em 20  $\mu$ L de mistura de reação contendo 1  $\mu$ L da amostra de cDNA, 10  $\mu$ L de SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Japão), e 0,25  $\mu$ M de conjuntos de primers específicos mediante a utilização de um Sistema de Detecção de Sequência ABI PRISM 7900 (PE Applied Biosystems, EUA). A RT-PCR foi realizada começando com 60s a 95°C seguido por um passo de desnaturação a 95°C por 15s, um passo de hibridação a 60°C para 15s, e um passo de extensão a 72°C por 45s, por 45 ciclos. A análise da curva de dissociação foi realizada no final dos 45 ciclos para verificar a identidade do produto da PCR. Extraímos a curva padrão de cada gene entre uma concentração relativa e o ciclo limiar de uma série de diluições de 10 vezes do produto específico da PCR. Cada amostra foi medida por triplicados de modelos de cDNA e o nível de expressão foi calculado como a relação entre o valor médio da expressão relativa em triplicado de cada amostra, e

a expressão relativa da proteína L10A ribossômica (RPL10A) como controle interno. Para a análise dos dados foi utilizado o software do Sistema de Detecção de Sequência Versão 1.3.1 (Applied Biosystems).

### Análise de Western Blot

As amostras do miocárdio foram dissolvidas numa solução tampão contendo Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de vanadato de sódio, Triton X-100 1%, 0,5% de Nonidet P-40, e 1  $\mu$ g/mL de leupeptina e aprotinina. O homogenato foi centrifugado durante 5 min, e o sobrenadante foi congelado e armazenado a 80°C. Um ensaio de proteína BCA (Sangon, China) foi usado para determinar o conteúdo de proteína. O tecido dissolvido (100-200  $\mu$ g) foi submetido a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, e na sequência a proteína foi transferida para uma membrana de PVDF (Whatman Westran, RU). A membrana foi pré-incubada numa solução tampão contendo Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, e Tween 0,1% suplementado com 5% de leite desnatado durante 1 h à temperatura ambiente. Após a pré-incubação, a membrana foi incubada na solução tampão de Tris-NaCl-Tween suplementada com 5% de albumina sérica bovina e anticorpo por 1-2h à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram um anticorpo monoclonal de camundongo contra a citocromo c oxidase I, um anticorpo policlonal de coelho contra a nNOS, um anticorpo policlonal de coelho contra a iNOS, um anticorpo policlonal de coelho contra a eNOS (todos eles 1:1000, Santa Cruz, EUA) e um anticorpo policlonal de coelho contra a  $\beta$ -actina (1:1.000; Biosynthesis Biotechnology, Beijing, China). Após a incubação, a membrana foi lavada com solução tampão durante 1 h, e re-sondada com o anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase de rábano silvestre (1:1.000; Biotechnology Biossintese, Beijing, China) em solução tampão de Tris-NaCl-Tween suplementado com 5% de leite desnatado por 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com solução tampão de Tris-NaCl-Tween e as bandas foram visualizadas com kit de detecção ECL (ShineGene, Shanghai, China). Os filmes foram digitalizados com um densitômetro laser, utilizando o programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Canadá). Níveis relativos de proteína foram padronizados usando actina- $\beta$  como controle interno.

### Análise estatística

Os resultados são expressos como valor médio  $\pm$  DP. Foram realizados testes de normalidade. O teste t para amostras independentes foi utilizado para analisar diferenças entre os pacientes com defeitos cardíacos cianóticos ou acianóticos. A correlação de parâmetros independentes foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os dados foram analisados com o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS) versão 10.0.

## Resultados

A Tabela 1 resume os dados epidemiológicos dos pacientes. Pacientes com defeitos cardíacos cianóticos tiveram um

número significativamente menor de saturação de oxigênio arterial pré-operatório ( $\text{SaO}_2$ ) que pacientes com defeitos cardíacos acianóticos ( $p < 0,01$ ).

#### Análise morfométrica

Amostras do miocárdio foram encontradas como sendo histologicamente normais na maioria dos pacientes acianóticos. Essas amostras apresentaram um arranjo ordenado de miofibrilas e sarcômeros, mitocôndria bem distribuída e bandas-Z normais. Em pacientes cianóticos observou-se desorganização miofibrilar, encurtamento de sarcômeros, acúmulo focal da mitocôndria com desigualdade de tamanho e forma, depósitos anormais intramitocôndriais e bandas-Z e discos intercalares (Figuras 1 e 2). A densidade volumétrica mitocondrial  $V_v$  foi significativamente maior em pacientes cianóticos do que em pacientes acianóticos ( $46,47 \pm 9,73\%$  vs.  $34,80 \pm 10,42\%$ ,  $p < 0,05$ ). A densidade numérica mitocondrial  $N_v$  foi significativamente maior em pacientes cianóticos do que em pacientes acianóticos ( $1,08 \pm 0,17\mu\text{m}^{-3}$  vs.  $0,73 \pm 0,11\mu\text{m}^{-3}$ ,  $p < 0,05$ ).

#### Perfil de expressão gênica

A relação mtDNA/nDNA em pacientes cianóticos foi maior que em pacientes acianóticos ( $1,56 \pm 0,18$  vs.  $0,97 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$ ). Após a normalização com o gene Rpl10a, os níveis de expressão de mRNA em cada amostra foram estimados como um nível de expressão relativa em comparação com a amostra de referência. O nível de ARNm

da COXI foi significativamente incrementado, enquanto os níveis de transcrição de vários reguladores essenciais da biogênese mitocondrial (PGC-1 $\alpha$ , NRF1 e Tfam) apresentaram uma suprarregulação coordenada em pacientes cianóticos comparado com os pacientes acianóticos ( $p < 0,01$ , Figura 3). Considerando todos os pacientes, os níveis miocárdicos de mRNA na PGC-1 $\alpha$  apresentaram correlação inversa com  $\text{SaO}_2$  (coeficiente de correlação de Spearman:  $-0,75$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 4), sugerindo que a hipoxemia é um gatilho importante para expressão da PGC-1 $\alpha$  em pacientes com cardiopatia congênita cianótica.

#### Níveis de proteína

A análise de Western Blot revelou que os níveis da COXI foram significativamente maiores no miocárdio do ventrículo direito de pacientes com cianose do que naqueles com defeitos cardíacos acianóticos ( $p < 0,05$ ). Uma quantidade muito baixa de proteína nNOS foi detectada em todas as amostras do miocárdio e não foi observada diferença entre os dois grupos. Não houve diferença entre os níveis de proteína iNOS de pacientes cianóticos e acianóticos. Os níveis de eNOS foram aumentados em pacientes cianóticos, comparado com pacientes acianóticos ( $p < 0,05$ , Figura 5). Considerando todos os pacientes, as concentrações miocárdicas de eNOS apresentaram correlação inversa com a  $\text{SaO}_2$  (coeficiente de correlação de Spearman:  $-0,64$ ,  $p < 0,01$ , Figura 6), e os níveis de transcrição de PGC-1 $\alpha$  se correlacionaram com os níveis de eNOS (coeficiente de Spearman:  $0,58$ ,  $p < 0,01$ , Figura 7).

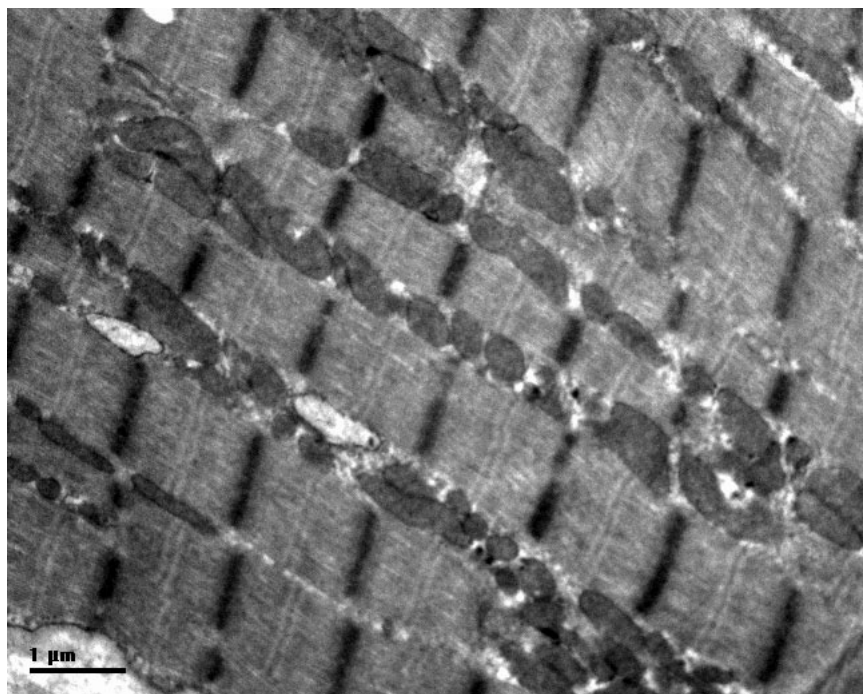
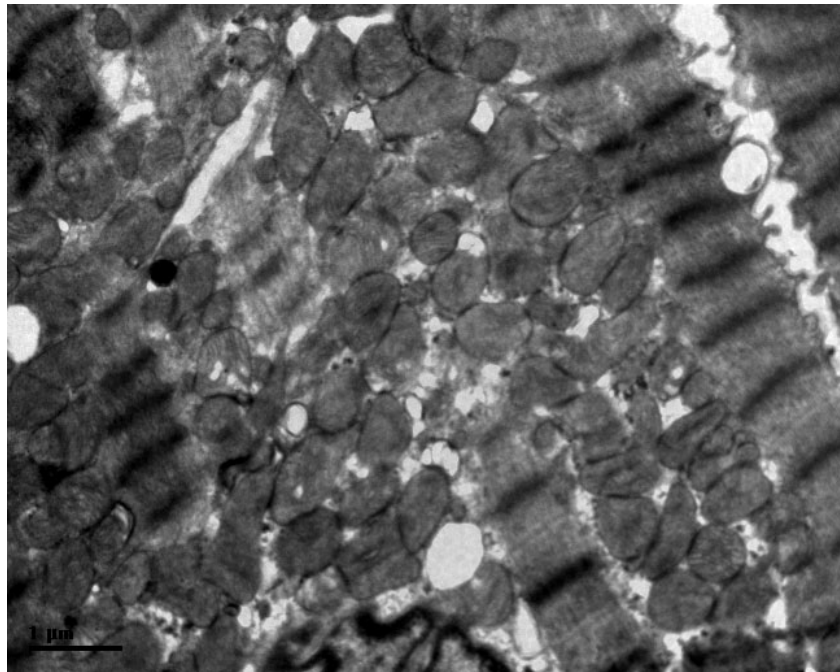
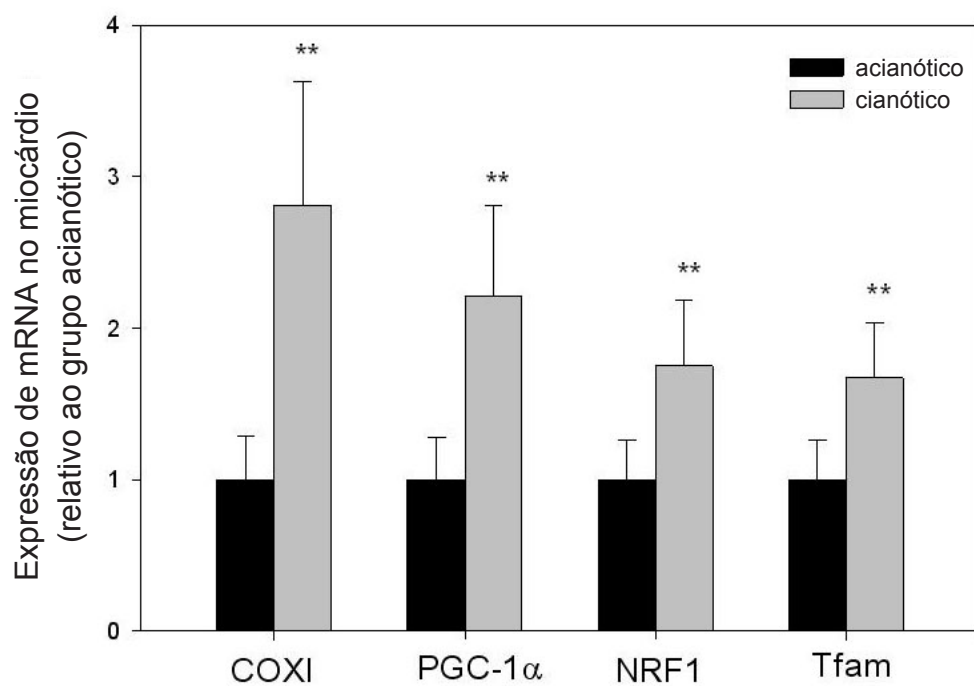


Fig. 1 - Micrografia de transmissão eletrônica de mitocôndrias na VSVD de um paciente acianótico ( $\times 8900$ , barras 1  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 2** - Micrografia de transmissão eletrônica de mitocôndrias na VSVD de um paciente cianótico ( $\times 8900$ , barras  $1 \mu\text{m}$ ). A densidade volumétrica mitocondrial  $V_v$  e densidade numérica foram significativamente maiores em pacientes cianóticos do que em pacientes acianóticos ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 3** - Comparações da expressão relativa de mRNA miocárdico entre o grupo acianótico e o grupo cianótico (\*\*  $p < 0,01$  versus grupo acianótico).

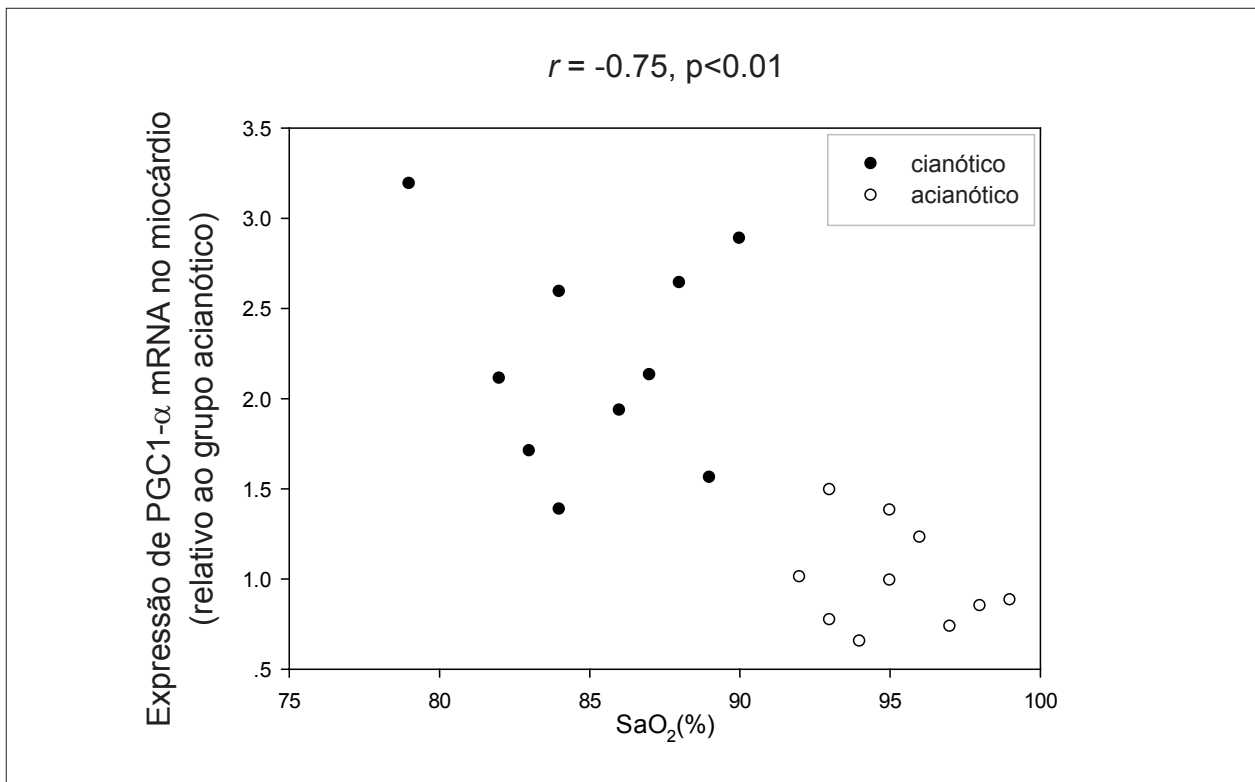


Fig. 4 - Correlação entre expressão de PGC1- $\alpha$  mRNA no miocárdio e SaO<sub>2</sub>.

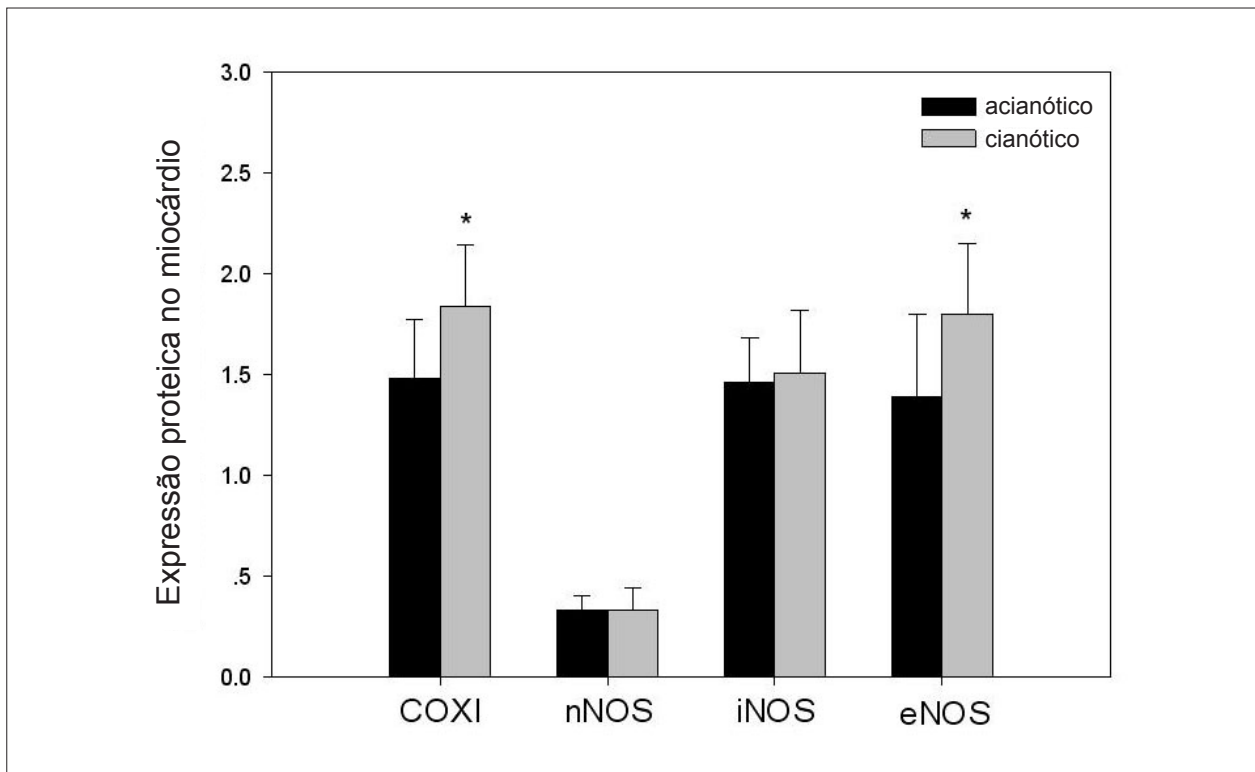


Fig. 5 - Comparações da expressão proteica no miocárdio entre o grupo acianótico e o grupo cianótico (\*  $p < 0,05$  versus grupo acianótico).

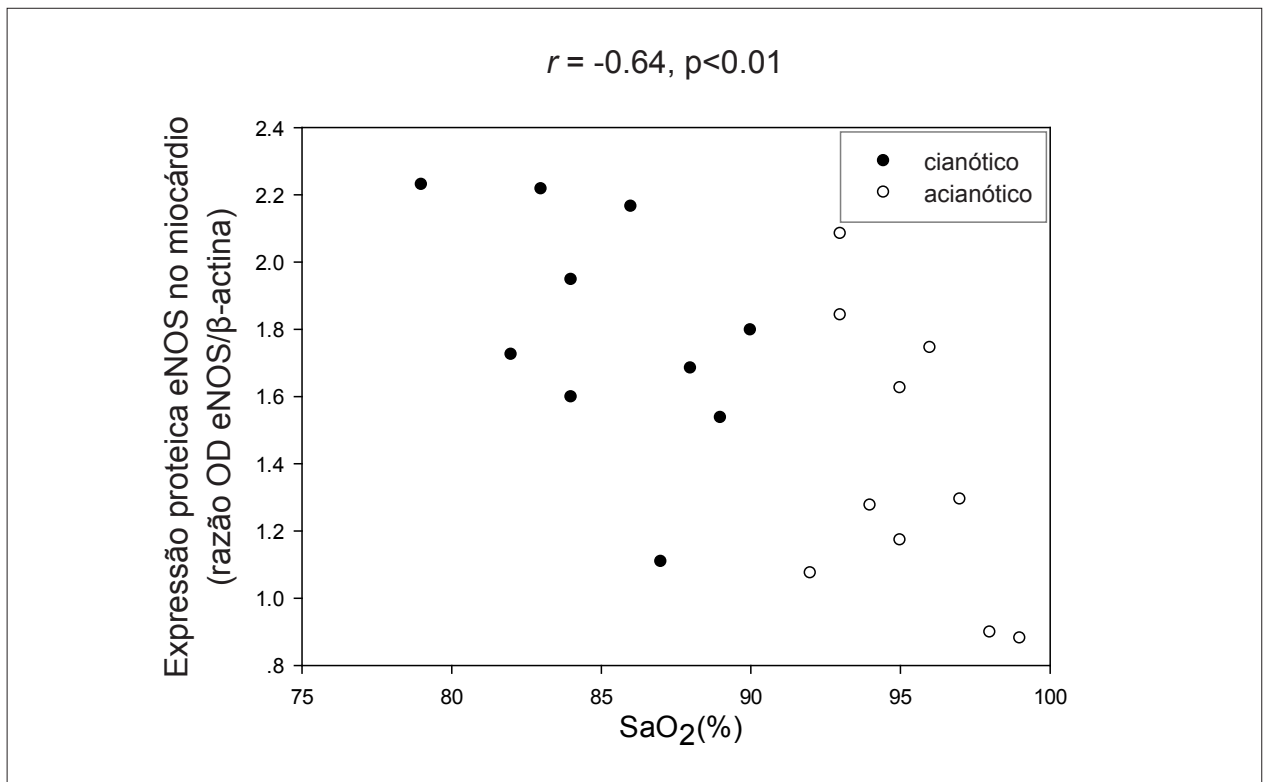


Fig. 6 - Correlação entre expressão proteica da eNOS no miocárdio e SaO<sub>2</sub>.

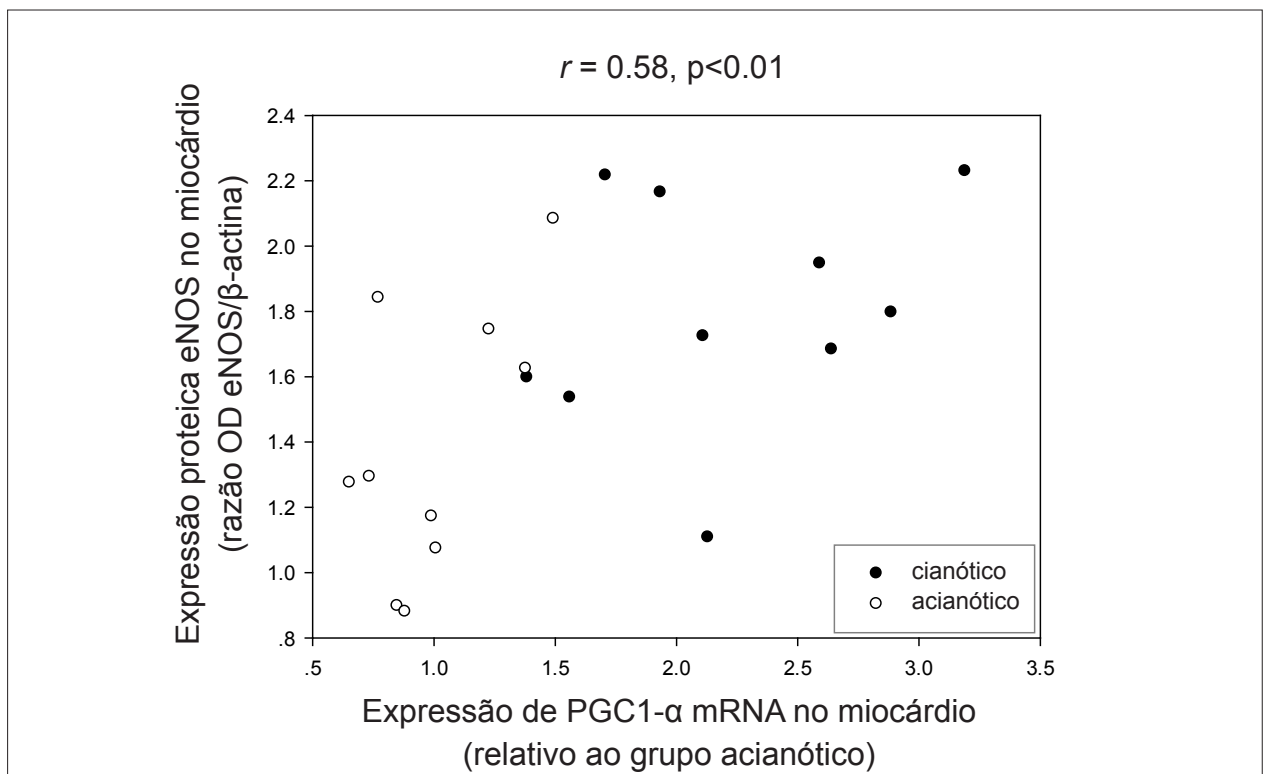


Fig. 7 - Correlação entre expressão proteica no miocárdio de PGC1-α mRNA e eNOS.

## Discussão

A capacidade para modular o número de mitocôndrias e a densidade de complexos de cadeia de transferência de elétrons por unidade mitocondrial tem sido demonstrada em níveis de regulação ultraestruturais, bioquímicos e moleculares. No coração, paralelamente às mudanças de desenvolvimento na tensão de oxigênio, carga hemodinâmica, preferência do substrato, a biogênese mitocondrial é acelerada no período perinatal, com um pico na idade adulta jovem, com um subsequente declínio durante a senescência<sup>12</sup>. A plasticidade adaptativa tem sido demonstrada pela massa mitocondrial cardíaca aumentada com uma indução paralela na capacidade geradora de energia após hipóxia hipobárica<sup>13</sup>. Neste estudo, demonstramos que a densidade volumétrica mitocondrial (Vv) e a densidade numérica (Nv) foram elevadas em pacientes com cianose em comparação com a cardiopatia congênita acianótica, sugerindo que havia mais mitocôndrias no miocárdio de pacientes com cardiopatia congênita cianótica. Essa resposta foi acompanhada por aumento significativo no número de cópias do mtDNA e na suprarregulação da mRNA na COXI e expressão proteica, que foi codificada pelo mtDNA. A indução de genes envolvidos na biogênese mitocondrial foi também observada no grupo cianótico. O aumento da massa mitocondrial, mtDNA, mRNA e proteína demonstrou que o programa de biogênese mitocondrial é suprarregulado em corações de pacientes cianóticos. Além disso, o mRNA de PGC-1  $\alpha$ , o regulador-chave do programa de biogênese mitocondrial, se correlaciona inversamente com a SaO<sub>2</sub>, sugerindo que a hipóxia é um gatilho importante para a biogênese mitocondrial em pacientes com cardiopatia congênita cianótica.

No músculo esquelético, a proliferação mitocondrial demonstra compensar parcialmente a disfunção respiratória, mantendo a produção de global de ATP<sup>14</sup>; o distintivo histopatológico desse fenômeno é a presença de um aumento do número de mitocôndrias, especialmente na região subsarcolemal. No entanto, no músculo cardíaco, a indução da biogênese mitocondrial tem sido proposta como uma resposta inadequada em cardiomiopatias mitocondriais<sup>15</sup>. De fato, a indução cardíaca específica do PGC-1  $\alpha$  em camundongos resulta em disfunção cardíaca com características morfológicas de proliferação mitocondrial dos miócitos e desorganização e perda miofibrilar. Curiosamente, tanto a proliferação mitocondrial quanto a cardiomiopatia são reversíveis após a cessação da expressão transgênica<sup>16</sup>. Nossos achados de que a biogênese mitocondrial foi suprarregulada nos corações dos pacientes cianóticos pode ser um mecanismo compensatório da mitocôndria no miocárdio. A proliferação mitocondrial pode melhorar a difusão e utilização de oxigênio limitado com o alargamento da superfície. No entanto, a proliferação mitocondrial também pode afetar espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas de vias mitocondriais e de apoptose. Então, se essa adaptação é benéfica para a função cardíaca permanece inexplicada, e trabalhos adicionais são necessários para resolver esse problema.

No presente estudo, descobrimos que os níveis intramiocárdicos de eNOS foram significativamente elevados em pacientes com cardiopatia congênita cianótica, e se

correlacionaram negativamente com a SaO<sub>2</sub>. Embora em um estudo anterior os níveis de eNOS-mRNA tenham sido reduzidos e os níveis de iNOS-mRNA tenham aumentado no tecido atrial direito de crianças com cianose em comparação com aquelas com cardiopatia congênita acianótica<sup>17</sup>, vários estudos já confirmaram que a hipóxia pode ativar a eNOS e aumentar a expressão da eNOS no coração<sup>18</sup>. Recentemente, um elemento de resposta à hipóxia foi identificado no promotor de eNOS humano<sup>8</sup>, ligando assim a expressão da eNOS ao HIF, o principal responsável na mediação de respostas adaptativas à hipóxia.

Outro resultado interessante do estudo é a observação uma associação entre os níveis de transcrição de PGC-1  $\alpha$ , que estavam presentes no nível de biogênese mitocondrial e níveis miocárdicos de eNOS em pacientes com doença cardíaca congênita. A proteção induzida por hipóxia crônica do miocárdio contra a lesão de reperfusão isquêmica foi confirmada por vários grupos<sup>19</sup>. Consistente com a capacidade bioenergética aumentada como consequência da biogênese mitocondrial, as mitocôndrias extraídas de corações hipóxicos mostram aumento das taxas de síntese de ATP<sup>20</sup>. Além disso, a cardioproteção induzida por hipóxia é associada à suprarregulação da óxido nítrico sintase (NOS) e é eliminada pela inibição da NOS<sup>21</sup>. Uma vez que a capacidade do NO para ativar a maquinaria transcricional que dirige a biogênese mitocondrial tem sido estabelecida, nossa observação da associação entre os níveis de transcrição de PGC-1  $\alpha$  e os níveis miocárdicos da eNOS pode implicar que a eNOS e a biogênese mitocondrial desempenham papéis importantes na proteção do miocárdio induzida por hipóxia crônica contra lesão de reperfusão isquêmica<sup>22</sup>.

## Conclusões

O presente estudo sugere que a biogênese mitocondrial é ativada no miocárdio da via de saída ventricular na cardiopatia congênita com cianose, que poderia ser a resposta adaptativa à hipóxia crônica e possivelmente envolve suprarregulação da eNOS.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela National Natural Science Foundation Program (30972957).

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por National Natural Science Foundation Program (30972957).

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Juan Xiao pela Third Military Medical University, Chongqing, PR China.



## Referências

1. McLeod CJ, Pagel I, Sack MN. The mitochondrial biogenesis regulatory program in cardiac adaptation to ischemia--a putative target for therapeutic intervention. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(3):118-23.
2. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 2004;18(4):357-68.
3. Pearl JM, Laks H, Barthel SW, Kaczer EM, Loo DK, Drinkwater DC, et al. Quantification of flow through an interatrial communication: application to the partial Fontan procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104(6):1702-8.
4. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):16507-12.
5. Strijdom H, Friedrich SO, Hattingh S, Chamane N, Lochner A. Hypoxia-induced regulation of nitric oxide synthase in cardiac endothelial cells and myocytes and the role of the PI3-K/PKB pathway. *Mol Cell Biochem.* 2009;321(1-2):23-35.
6. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(4):343-65.
7. Forkel J, Chen X, Wandinger S, Keser F, Duschin A, Schwanke U, et al. Frede S, Massoudy P, Schulz R, Jakob H, Heusch G. Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(2):H545-51.
8. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46230-40.
9. Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, et al. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res.* 2005;66(1):132-40.
10. Cervos Navarro J, Kunas RC, Sampaolo S, Mansmann U. Heart mitochondria in rats submitted to chronic hypoxia. *Histol Histopathol.* 1999;14(4):1045-52.
11. Trinei M, Berniakovich I, Pelicci PG, Giorgio M. Mitochondrial DNA copy number is regulated by cellular proliferation: a role for Ras and p66(Shc). *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):624-30.
12. Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Agrawal N, Goldenthal MJ. Mitochondrial gene expression during bovine cardiac growth and development. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(8):1029-36.
13. Ou LC, Tenney SM. Properties of mitochondria from hearts of cattle acclimatized to high altitude. *Respir Physiol.* 1970;8(2):151-9.
14. Wredenberg A, Wibom R, Wilhelmsson H, Graff C, Wiener HH, Burden SJ, et al. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):15066-71.
15. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchetti E, Zani M, et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(14):1362-9.
16. Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res.* 2004;94(4):525-33.
17. Ferreira CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Jatene MB, Bento De Souza LC, et al. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation.* 2001;103(18):2272-6.
18. Qing M, Gorchach A, Schumacher K, Woltje M, Vazquez-Jimenez JF, Hess J, et al. The hypoxia-inducible factor HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects. *Basic Res Cardiol.* 2007;102(3):224-32.
19. Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW, Pritchard KA Jr. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann NY Acad Sci.* 1999;874:236-53.
20. Eells JT, Henry MM, Gross GJ, Baker JE. Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: Is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res.* 2000;87(10):915-21.
21. Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, et al. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H62-68.
22. Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(1):1-15.