

HEITOR MORENO JÚNIOR

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO
EM RATOS WISTAR: EFEITOS SOBRE A
MORFOLOGIA E A FUNÇÃO CARDÍACAS**

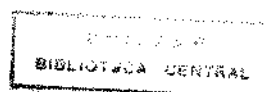
**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de doutor
em Clínica Médica**

Área de concentração: Farmacologia

**Orientador: Gilberto de Nucci
Departamento de Farmacologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de São Paulo**

Campinas

1995



UNIDADE	36
N.º CHAMADA	1/UNICAMP
	M 815
V.	5
P.º	26 000
PAGE	433/95
C	☐ ☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/11/95
N.º CPD	

CM-00079083-2

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP

Moreno Junior, Heitor

MS151

Inibicao da sintese de oxido nitrico em ratos Wistar :
efeitos sobre a morfologia e a funcao cardiacas / Heitor
Moreno Junior. Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Gilberto de Nucci

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciencias Medicas.

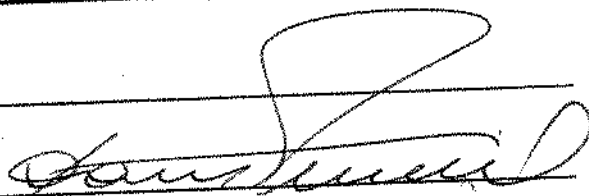
1. Endotelio. 2. Enalapril. 3. Hipertrofia. 4. Hiper-
tensao. 5. Isquemia. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciencias Medicas. III.
Titulo.

Banca examinadora da tese de Doutorado

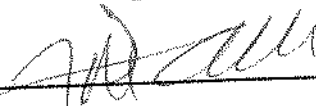
Orientador: Prof.Dr. Gilberto De Nucci

Membros:

1. Paulo José Ferreira Tucci



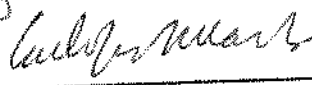
2. José Antonio FANCHINI Ramires



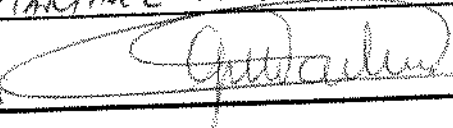
3. Gustavo Moraes Kneeger



4. Gylógio Emílio MARTINEZ Rêto



5. GILBERTO de NUCCI



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/09/95

Este trabalho é dedicado a Gilberto de Nucci, que personifica o mito "mestre-amigo", responsável por vitórias e frustrações, em ambas porém, propiciando o crescimento científico e pessoal de seus alunos.

*Agradeço a meus pais, Maria Luíza, Maria Hilda e Heitor, pela formação.
Às minhas irmãs, Juliana e Beth, pela felicidade na infância e juventude.
À Sílvia, Luiza e Beatriz, pela alegria do presente.*

"Os obstáculos são essas coisas terríveis que percebemos só quando desviamos os olhos de nossa meta"

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela carinhosa acolhida, e especialmente aos Professores Gun Birgitta Mendes, Marcos Dias Fontana e Nadin F. Heluany Sobrinho pela amizade e incentivo dispensados.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, na figura dos Professores Doutores Fernando F. Costa, Mario J. A. Saad e Eros A. de Almeida, pelo crédito e apoio que deram a este trabalho.

Ao Professores Doutores Edson Antunes e Stephen Hyslop do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela importante assessoria em todos os passos desta tese.

Ao Professor Doutor Konradin Metze do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela laboriosa realização das avaliações histológicas desta tese.

Aos colegas que participaram diretamente da realização dos estudos expostos nesta tese: Antonio Carlos Bento, Cléber Evandro Teixeira, Luciana Piovesan Nathan, Marta V. Medeiros e Soraia Kátia Pereira Costa.

Aos colegas que me propiciaram alternar períodos de árduo trabalho com outros de descontração: Ana Maria Trindade Grégio, Ana Sílvia Miguel, Anicleto Poli, Antonio Condino Neto, Dora M. G. Kassisse, Ernaldo A. Cajina, Flávio do Rego de Araújo Faro, Heidi B. Dias, Heloísa Helena de Araújo Ferreira, Herick José Stella, Iramaia M. Binhara, Leonardo Augusto Moraes, Maria Lúcia Martins, Luciana Bizeto, Luís Madaleno Franco, Moacir Serralvo Faria, Pamela Lillana M. Gonzales, Renato do Rego de Araújo Faro, Rodrigo A. B. L. Martins, Rogério Cardoso de Castro, Simone Teixeira, Sissi Marcondes, Sócrates Calvoso Penna e Suzana R. P. Mariani.

Aos colegas Aldete Zappellini, José Luiz Donato, Marcelo Nicolas Muscará e Wellington Ribeiro pelos profícuos momentos de discussão científica.

Aos colegas cujos laços transcenderam o aspecto profissional: Alister de Miranda Cará, Eduardo Abib Júnior, Elen Cristina Teizem Landucci e Ronílson Aguinaldo Moreno, este, responsável-maior pela fácil adaptação à vida universitária da UNICAMP.

À Maria das Dores M. Ponciano e ao Airton Fernando de Paula, pela imprescindível colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aqueles que auxiliaram com seus conhecimentos em determinadas áreas: Engenheiro José Otávio P. Penteado (Engenharia elétrica e Informática), Professora Juliana H. M. Rutigliano (Língua Portuguesa), Professor Stephen Shaw (Língua Inglês), Paulo Sérgio de Oliveira (Informática),

Às secretárias dos Departamentos de Farmacologia e de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção e gentileza habitual e eficiência em suas funções: Solange Aparecida dos Santos Basso, Ângela Marli Tissot, Gislaine Elias Alípio, Maria Rita de Lima, Marlene A. D. Pinto. À secretária da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Márcia Gnatos João, pelos mesmos atributos.

Aos auxiliares-técnicos, pelo importante apoio a este trabalho: Adílson J. Thomáz, Antonio Tadeu dos Santos, Antonio Vilson dos Santos, Evandro Luiz Miranda, Gildo Bernardo Leite, Guaracy da Silva Ribeiro, Ismael Vêncio e Miguel Borges da Silva.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro para a realização desta tese.

ÍNDICE

Assunto	página
Resumo	08
Lista de abreviações	11
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	16
Lista de materiais	20
 1. Introdução Geral	 21
 2. Efeitos da inibição crônica da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a morfologia e a função cardíacas	
2.1 Introdução	35
2.2 Material e Métodos	37
2.3 Resultados	48
2.4 Discussão	65
2.5 Conclusões	70
 3. Inibição da enzima conversora de angiotensina e seus efeitos sobre as alterações cardíacas induzidas pela inibição crônica de óxido nítrico	
3.1 Introdução	72
3.2 Material e Métodos	73
3.3 Resultados	77
3.4 Discussão	89
3.5 Conclusões	92
 4. Efeitos da inibição aguda da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a histologia do miocárdio e o fluxo coronariano	
4.1 Introdução	94
4.2 Material e Métodos	95
4.3 Resultados	100
4.4 Discussão	108
4.5 Conclusão	110
 5. Referências Bibliográficas	 111
 6. <i>Summary</i>	 124
 7. Anexo (Tabelas de valores individuais)	 127
 8. Trabalhos submetidos	 175

RESUMO

Esta tese tem por objetivos avaliar, em ratos Wistar, os efeitos das inibições aguda e crônica da síntese de óxido nítrico (NO) sobre a morfologia e a função cardíacas. Estudamos ainda os efeitos da inibição da enzima conversora de angiotensina pelo maleato de enalapril sobre as alterações cardíacas induzidas pela inibição crônica da síntese de NO.

Inibição crônica da síntese de NO: Foram estudados 5 grupos experimentais-CONTROLE; 2K-1C, ratos submetidos à estenose de artéria renal; L-NAME, ratos tratados com 65 mg/kg/dia via oral de N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da síntese de NO; 2K-1C+L-NAME: ratos submetidos à estenose de artéria renal e recebendo 65 mg/kg/dia de L-NAME via oral; D-NAME: ratos tratados com 65 mg/kg/dia de N^ω-nitro-D-arginina metil éster (D-NAME), enantiômero inativo do L-NAME, por via oral. Acompanhamos semanalmente o peso corporal (PCorp) e a pressão arterial de cauda (PAC). A massa cardíaca foi determinada em subgrupos de animais sacrificados após 2, 4 e 8 semanas de estudo. Na oitava semana, animais dos grupos CONTROLE e L-NAME tiveram seus corações isolados e, utilizando-se a preparação de Langendorff, avaliamos a capacidade de desenvolvimento de pressão intraventricular e o fluxo coronariano (ϕ Cor). Os corações dos animais dos 5 grupos foram também submetidos à avaliação histológica com microscopia ótica. Resultados: L-NAME induziu hipertensão que alcançou resposta máxima na 5ª semana de estudo. Somente após a 6ª semana, a PAC dos ratos 2K-1C foi significativamente maior que nos animais recebendo L-NAME. O desenvolvimento de pressão intraventricular foi significativamente menor no grupo L-NAME que no grupo CONTROLE, sugerindo menor capacidade contrátil no primeiro grupo. O grupo L-NAME apresentou fluxo coronariano diminuído em relação ao grupo CONTROLE. Não observamos diferenças quanto à pressão diastólica final do VE e à frequência cardíaca entre os dois grupos estudados. O PCRelat e o PVERelat foram maiores nos grupos 2K-1C e

2K-1C+L-NAME que nos grupos CONTROLE e L-NAME nas avaliações de 2 e 4 semanas. Na 8ª semana, o PCRelat e o PVERelat no grupo L-NAME foram maiores que nos animais CONTROLE e semelhantes aos dos grupos 2K-1C e 2K-1C+L-NAME. À avaliação histológica, nos grupos CONTROLE e D-NAME nenhum coração foi classificado como alterado. No grupo 2K-1C houve uma baixa incidência de alterações miocárdicas. Entretanto, os animais tratados com L-NAME desenvolveram alterações no miocárdio cuja severidade foi tanto maior quanto mais prolongado o tratamento. Embora a pressão arterial tenha aumentado de forma semelhante nos 3 grupos de animais hipertensos, os ratos tratados com L-NAME mostraram lesões cardíacas mais severas e extensas, indicando que não apenas os níveis de pressão arterial elevados devem ser responsáveis pelas mesmas. Áreas de necrose miocárdica foram encontradas precocemente (2ª semana) no grupo L-NAME, período em que a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) não havia ainda se desenvolvido neste grupo. Assim, estes achados e o fluxo coronariano diminuído ao final de 8 semanas de tratamento com L-NAME, apontam a isquemia como causa das alterações supra-citadas nos animais tratados com L-NAME. Concluimos que a inibição crônica da síntese de NO causa isquemia miocárdica por redução de fluxo coronariano com necrose de miofibrilas e fibrose intersticial que podem representar o substrato morfológico para a contratilidade miocárdica diminuída neste modelo experimental de HA.

Efeitos do enalapril sobre as alterações induzidas pela inibição crônica da síntese de NO: Foram estudados 4 grupos experimentais- CONTROLE; L-NAME, ratos tratados com 65 mg/kg/dia via oral de L-NAME; L-NAME+ENAL: ratos recebendo simultaneamente 65 mg/kg/dia de L-NAME e 25 ml/kg/dia de maleato de enalapril, por via oral; ENAL: ratos tratados com 25 mg/kg/dia de maleato por via oral. Acompanhamos o peso corporal (PCorp) e a pressão arterial de cauda (PAC) por 8 semanas, além de avaliarmos o peso cardíaco (PCRelat) e do ventrículo esquerdo (PVERelat) ao final da 8ª semana. Realizamos ainda o estudo funcional com o coração isolado e a avaliação

histológica, como descritos anteriormente. Resultados: Enalapril evitou a hipertensão arterial após a 2ª semana, bem como o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda. Não impediu o comprometimento do fluxo coronariano, nem o aparecimento de lesões isquêmicas no miocárdio. Entretanto, impediu a instalação da disfunção contrátil causada por L-NAME. Concluimos que, neste modelo, dois mecanismos fisiopatológicos distintos são responsáveis pelos achados: 1- a atividade aumentada do sistema renina angiotensina e/ou a menor produção de cininas relacionada(s) com os níveis de pressão arterial elevados e a HVE; 2- a inibição da síntese de NO relacionada com alterações a nível de circulação coronariana e provavelmente com as lesões miocárdicas encontradas.

Inibição aguda da síntese de NO: Visando esclarecer a origem (reparativa ou proliferativa) da intensa fibrose miocárdica observada na administração crônica da síntese de NO, realizamos experimentos agudos com os seguintes grupos de ratos: 1- Animais submetidos ao tratamento com L-NAME 65 mg/kg/dia por via oral por 2 dias, com avaliação histológica dos corações após esse período; 2- Animais submetidos à infusão endovenosa *in bolus* de diferentes doses de L-NAME: 0,5 - 1,5 - 5,0 - 15,0 e 45,0 mg/kg. Após 2 dias, os animais eram sacrificados e os corações submetidos a estudo histológico. Outros dois grupos de animais foram avaliados funcionalmente: 3- Ratos em que se avaliou o comportamento da pressão arterial (PAM) após a administração endovenosa *in bolus* de L-NAME nas mesmas doses crescentes utilizadas para estudo histológico e de D-NAME 45,0 mg/kg; 4- Ratos cujos corações foram estudados funcionalmente (preparação de Langendorff) para avaliação dos efeitos da administração de L-NAME e de D-NAME 45,0 mg/kg sobre o fluxo coronariano. Nossos resultados permitiram concluir ser a fibrose induzida pela inibição crônica da síntese de NO um fenômeno reparativo, tendo por causa primária a necrose miocárdica, provavelmente de origem isquêmica e secundária ao comprometimento do fluxo coronariano.

Descritores: Enalapril - Endotélio - Hipertensão - Hipertrofia - Isquemia .

LISTA DE ABREVIações

• Ach	Acetilcolina
• BK	Bradicinina
• DAG	Diacylglicerol
• D-NAME	N ^ω -nitro-D-arginina-metil éster
• DOCA-SAL	Acetato de desoxicorticosterona-sal, modelo de HA experimental
• EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
• FC	Frequência cardíaca
• ϕ Cor	Fluxo coronariano
• Gcs	Guanilato ciclase solúvel
• GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
• HA	Hipertensão arterial
• HE	Hematoxilina-eosina
• HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
• IP ₃	Inositol trifosfato
• L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil éster
• LNMMA	N ^ω -monometil-L-arginina
• NO	Óxido nítrico
• NORA 0.1	Noradrenalina 0.1 μ g
• PCorp	Peso corporal
• PCRelat	Peso cardíaco relativo
• PCTotal	Peso cardíaco total (peso cardíaco corrigido para o peso corporal)
• PD	Pressão desenvolvida
• PD/PVE	Pressão desenvolvida normalizada para a massa do ventrículo esquerdo

- PDFVE Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
- PSVE Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
- PVE Peso ventricular esquerdo
- PVERelat Peso ventricular esquerdo relativo (peso ventricular esquerdo corrigido para o peso corporal)
- RVT Resistência vascular total
- VE Ventrículo esquerdo
- Δ PD Variação da pressão desenvolvida
- 2K-1C *Two kidneys-one clip*, modelo de HA experimental

LISTA DE FIGURAS

Efeitos da inibição crônica da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a morfologia e a função cardíacas

Figura 1. Coração isolado. Balão de látex introduzido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo e aorta canulada para perfusão. *página 40*

Figura 2. Preparação de Langendorff para coração isolado. *página 40*

Figura 3. Curva dos valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão arterial de cauda, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg) nos 5 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME) durante as 8 semanas de estudo. *página 50*

Figura 4. Efeito da inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME sobre o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) após 2, 4 e 8 semanas de estudo nos grupos estudados (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME). *página 60*

Figura 5. Efeito da inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME sobre o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) após 2, 4 e 8 semanas de estudo nos grupos estudados (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME). *página 61*

Figura 6a. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo CONTROLE após 8 semanas de estudo. Aspectos normais das fibras miocárdicas e de duas artérias de pequeno calibre. Coloração HE, 10x. (Gentileza de Dra. Denise M. A. C. Malheiros, Laboratório de Fisiologia Renal, FMUSP) *página 63*

Figura 6b. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME após 8 semanas de estudo. Área de fibrose subendocárdica intensa e alterações vasculares características. Coloração HE, 10x. (Gentileza de Dra. Denise M. A. C. Malheiros, Laboratório de Fisiologia Renal, FMUSP) *página 63*

Figura 7a. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado com L-NAME por 8 semanas. Hipertrofia discreta da túnica média de uma artéria. Coloração HE, 10x. (Gentileza de Dra. Denise M. A. C. Malheiros, Laboratório de Fisiologia Renal, FMUSP) *página 64*

Figura 7b. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado com L-NAME por 8 semanas. Fibrose perivascular intensa e espessamento da parede de arteríolas. Coloração HE, 20x. (Gentileza de Dra. Denise M. A. C. Malheiros, Laboratório de Fisiologia Renal, FMUSP) *página 64*

Inibição da enzima conversora de angiotensina e seus efeitos sobre as alterações cardíacas induzidas pela inibição crônica de óxido nítrico

Figura 8. Curva dos valores médios + desvios-padrão da pressão arterial de cauda, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), dos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) durante as 8 semanas de estudo. *página 78*

Figura 9. Efeitos da administração de maleato de enalapril sobre o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) e o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) ao final de 8 semanas de inibição da síntese de óxido nítrico por L-NAME. *página 87*

Efeitos da inibição aguda da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a histologia do miocárdio

Figura 10. Curva dos valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão arterial média (PAM) expressa em milímetros de mercúrio (mmHg) nos 5 grupos experimentais (L-NAME 0.5, L-NAME 1.5, L-NAME 5.0, L-NAME 15.0 e L-NAME 45.0 mg/kg) após a administração de diferentes doses intravenosas de L-NAME.

página 101

Figura 11. Comportamento da pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a administração endovenosa de D-NAME e L-NAME 45,0 mg/kg.

página 102

Figura 12. Frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto, nos cinco grupos (L-NAME 0.5, L-NAME 1.5, L-NAME 5.0, L-NAME 15.0 e L-NAME 45.0 mg/kg), antes e após a administração intravenosa de diferentes doses de L-NAME.

página 104

Figura 13. Fluxo coronariano (ϕ_{cor}), em ml/min, nos grupos D-NAME e L-NAME, antes e após a administração intravenosa de 45 mg/kg das drogas (coração isolado, método de Langendorff).

página 105

Figura 14. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado agudamente com L-NAME. Área de necrose com infiltrado de macrófagos, caracterizando uma fase precoce de reabsorção de miócitos lesados. Coloração HE, 20x. (Gentileza de Dra. Denise M. A. C. Malheiros, Laboratório de Fisiologia Renal, FMUSP)

página 107

LISTA DE TABELAS

Efeitos da inibição crônica da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a morfologia e a função cardíacas

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal, expresso em gramas, dos cinco grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME) durante o período de estudo. *página 49*

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (NORA 0.1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado). *página 51*

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão desenvolvida (PD= PSVE-PDFVE, mmHg) pelo ventrículo esquerdo e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado). *página 53*

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Δ PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (Δ PD/ PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado). *página 54*

Tabela 5. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min) e da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm), antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (NORA 0.1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado). *página 55*

Tabela 6. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos cinco grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME) na 2ª, 4ª e 8ª semanas de estudo. *página 58*

Tabela 7. Classificação histológica das alterações miocárdicas nos grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME, D-NAME) após 2, 4 e 8 semanas de tratamento com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). *página 59*

Inibição da enzima conversora de angiotensina e seus efeitos sobre as alterações cardíacas induzidas pela inibição crônica de óxido nítrico

Tabela 8. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal, expressos em gramas, dos quatro grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) durante o período de estudo. *página 77*

Tabela 9. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (NORA), nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado). *página 80*

Tabela 10. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão desenvolvida (PD= PSVE-PDFVE, mmHg) pelo ventrículo esquerdo e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/PVE, mmHg/g) nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

página 83

Tabela 11. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Δ PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (Δ PD/ PVE, mmHg/g), após a administração de noradrenalina 0.1 μ g, nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

página 84

Tabela 12. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm) e do fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min), antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (NORA 0.1), nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

página 85

Tabela 13. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT), do peso cardíaco relativo (PCRelat), do peso ventricular esquerdo (PVE) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em gramas, dos quatro grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) na 8ª semanas de estudo.

página 86

Tabela 14. Classificação histológica das alterações miocárdicas nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME, ENAL, L-NAME+ENAL) após 8 semanas de tratamento com N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

página 88

Efeitos da inibição aguda da síntese de óxido nítrico e suas consequências sobre a histologia do miocárdio

Tabela 15. Análise classificatória dos achados histológicos nos corações dos animais dos 6 grupos experimentais (CONTROLE, L-NAME 0.5, L-NAME 1.5, L-NAME 5.0, L-NAME 15.0 e L-NAME 45.0 mg/kg), 48 horas após a administração intravenosa de crescentes doses de L-NAME *in bolus*. *página 106*

LISTA DE MATERIAIS

Substância	Procedência
•Maleato de enalapril	Biosintética (Brasil)
•N ^ω -nitro-L-arginina-metil éster	Sigma (EUA)
•N ^ω -nitro-D-arginina-metil éster	Bachen (Suíça)
•Noradrenalina	Sigma (EUA)
•Pentobarbital sódico	May & Baker (UK)

1.

INTRODUÇÃO GERAL

Endotélio

O conjunto das células endoteliais pode ser encarado como um órgão endócrino e metabólico altamente ativo com várias atividades biológicas. Interface entre o sangue e o meio extravascular, além da função de barreira seletivamente permeável, o endotélio desempenha várias funções regulatórias, entre as quais incluem-se a regulação da trombogênese e o controle do tônus vasomotor. Alguns dos fatores ligados à regulação da trombogênese estão também relacionados com a regulação vasomotora e vice-versa (BATLOUNI & RAMIRES, 1994). Neste sentido, a produção e a inativação, pelo endotélio, de substâncias vasoativas serve para ressaltar a importância da integridade funcional deste sistema (ALMEIDA PJ *et al.*, 1990; VANE JR *et al.*, 1990; BENJAMIN N & VALLANCE P, 1991; HENDERSON AH *et al.*, 1991). A síntese e a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs), em resposta a aumentos de fluxo e de pressão pulsátil, assim como estímulos pela acetilcolina (Ach), bradicinina (BK), histamina, difosfato de adenosina (ADP), e outros, evidenciam que o endotélio pode ser apresentado como um órgão transdutor de variações de estímulos mecânicos e químicos da corrente sanguínea (FURCHGOTT RF, 1984; GRYLEWSKI R, 1988; HENDERSON AH *et al.*, 1991).

O óxido nítrico (NO) como fator de relaxamento vascular

Há pouco mais de uma década, FURCHGOTT e ZAWADZKI (1980a), trabalhando com anéis e tiras de aorta isolados, descobriram acidentalmente que a presença do endotélio é o requisito indispensável para o relaxamento da musculatura lisa arterial produzido pela Ach. Nestes trabalhos pioneiros efetuados em coelhos, em que anéis e tiras foram isolados de aorta torácica descendente e pré-contraídos com noradrenalina (NORA), a perda da capacidade de relaxamento em resposta à Ach foi relacionada com a remoção

da camada de células endoteliais devido à fricção da superfície intimal durante o procedimento experimental de preparação do tecido, o que foi demonstrado anatomicamente (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980b). Inversamente, na presença do endotélio, a Ach produzia um relaxamento dose-dependente que não se verificava quando a superfície intimal não estava íntegra. A descoberta de Furchgott e Zawadzki contribuiu para a resolução de um antigo paradoxo acerca das ações da Ach, a qual, evocando um potente efeito vasodilatador *in vivo*, não produzia relaxamento em algumas preparações vasculares isoladas, ou mesmo produzia contração. Pelo fato do endotélio vascular ser a principal fonte de produção de prostaciclina no organismo, as primeiras investigações foram dirigidas no sentido de averiguar a participação desse eicosanóide nos relaxamentos vasculares dependentes do endotélio. A observação de que inibidores da ciclooxigenase não bloqueavam esses relaxamentos levou à exclusão da prostaciclina como mediador dos relaxamentos vasculares dependentes do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980a; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980b). Através de ensaios biológicos “em cascata” em vasos isolados, onde o efluente de uma preparação endotelizada perfundia uma artéria pré-contraída, foi demonstrada a produção endotelial de um EDRF (GRIFFITH TM *et al.*, 1985; RUBANYI GM *et al.*, 1985) caracterizado como uma substância instável, com meia vida da ordem de segundos (ENDERSON AH *et al.*, 1991). A elevação dos níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nas células da musculatura lisa vascular que ocorre durante os relaxamentos vasculares produzidos pela Ach, levou à hipótese de que o EDRF fosse o óxido nítrico (NO), um metabólito final dos nitrovasodilatadores com potente ação estimulante sobre a guanilato-ciclase solúvel (GCs) (DIAMOND J & BLISARD KS, 1976), que apresentava semelhança com o EDRF quanto aos seus efeitos biológicos. O achado de que ambas as substâncias ativam diretamente a GCs levou à hipótese de que o EDRF poderia ser o NO, ou uma substância precursora lábil, da qual o NO seria imediatamente liberado. Usando ensaios químicos e biológicos simultâneos, PALMER e col., em 1987, demonstraram

que o NO liberado pelas células endoteliais, sob estímulo pela BK responde pelas ações do EDRF, o que foi imediatamente confirmado por outros (IGNARRO LJ *et al.*, 1987). Permanece ainda a suspeita de que o EDRF possa não ser o NO, mas uma molécula precursora intimamente relacionada ao mesmo. Para fins práticos, nesta tese consideraremos o próprio NO como sendo o EDRF.

Mecanismo de Ação

O NO causa dilatação da musculatura lisa vascular, estimulando a guanilato ciclase solúvel, com o conseqüente aumento dos níveis intracelulares do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e ativação da proteína quinase dependente do GMPc (RAPAPORT RM *et al.*, 1983; FORSTERMANN V *et al.*, 1986). A elevação do GMPc reduz o influxo de Ca^{2+} através do sarcolema, bem como a liberação de Ca^{2+} de seus depósitos intracelulares, aumentando o seqüestro do íon. É provável ainda que o GMPc iniba a produção de inositol trifosfato (IP_3) e a concentração de Ca^{2+} citosólico e, simultaneamente, a produção de diacilglicerol (DAG), importante intermediário na ativação da proteína quinase (BENJAMIN N & VALLANCE P, 1991).

As ações do NO são inibidas pela hemoglobina, através de interação direta (seqüestro) (PALMER RMJ *et al.*, 1987); pelo azul de metileno, que bloqueia a estimulação da guanilato ciclase e o conseqüente aumento do GMPc; e por geradores de radicais superóxido (GRYLEWSKI RJ *et al.*, 1986). Por outro lado, são potencializadas pela superóxido dismutase, um removedor de radicais superóxido (GRYLEWSKI RJ *et al.*, 1986).

As ações do NO assemelham-se às da prostaciclina, sendo que ambos são potentes vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária (MOLHO-SABATIER P, 1987; THULESIUS O, 1988; DYNERMAN JL & MEHTA JL, 1990; VRINTS G & HERMAN AG, 1991). Entretanto, a meia-vida do NO é muito curta, da ordem de segundos, enquanto a da prostaciclina é da ordem de minutos; as

ações do NO são mediadas pelo GMPc e as da prostaciclina pelo AMPc (BATLOUNI & RAMIRES, 1994).

Síntese

O NO é sintetizado a partir da oxidação da L-arginina, reação mediada pela NO sintetase Ca^{2+} dependente, com formação simultânea de L-citrulina (PALMER RMJ *et al.*, 1988a). A importância da L-arginina como precursor imediato do NO é comprovada pelo bloqueio da produção desse fator por análogos da arginina, como a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA), a L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster) e a N^G -nitro-L-arginina (L-NOARG) que são bloqueadores da NO sintetase (PALMER RMJ *et al.*, 1988b). Ademais, como essa inibição ocorre por competição, a adição de grande quantidade de L-arginina reverte o bloqueio da enzima (REES DD *et al.*, 1988).

Em vasos normais, parece haver quantidade suficiente do substrato para conversão máxima em NO, uma vez que L-arginina é regenerada endogenamente a partir de outros aminoácidos e a adição de L-arginina exógena não aumenta o relaxamento dependente do endotélio nessa circunstância (PALMER RMJ *et al.*, 1988; REES DD *et al.*, 1988). Entretanto, em determinadas condições experimentais, a administração de L-arginina pode ser crítica para a restauração da resposta endotelial. Células endoteliais em meio de cultura deficiente em arginina liberam apenas pequena quantidade de NO, até que o substrato seja adicionado (PALMER RMJ *et al.*, 1988). Análogos estruturais da L-arginina inibem o relaxamento dependente do endotélio e essa inibição é revertida pela L-arginina exógena (PALMER RMJ *et al.*, 1988; REES DD *et al.*, 1988). Recentemente, demonstrou-se que a administração endovenosa de L-arginina (0,1 a 3mM) normaliza agudamente o relaxamento dependente do endotélio na aorta torácica de cobaias hipercolesterolêmicas, sugerindo que a hipercolesterolemia induz à redução reversível da disponibilidade ou metabolismo da L-arginina (COOKE *et al.*, 1991). Estudo

mais recente ainda demonstrou que a administração intracoronária de L-arginina, em pacientes com aterosclerose difusa não-obstrutiva da artéria descendente anterior, alivia a ação vasoconstritora da Ach, sugerindo melhora do relaxamento dependente do endotélio em artérias coronárias humanas (DUBOIS-RANDÉ *et al.*, 1992).

Secreção e Liberação

O NO é liberado em condições basais pelas células endoteliais, mantendo a vasculatura em estado de dilatação, e através de estimulação. Uma grande variedade de estímulos fisiológicos e substâncias vasoativas pode provocar a liberação de NO. Entre os primeiros incluem-se as alterações do fluxo sanguíneo, do *stress* parietal e da tensão de oxigênio.

Quando o fluxo sanguíneo aumenta nas grandes artérias, ocorre dilatação induzida por estimulação dos receptores de tensão da membrana das células endoteliais e aumento da liberação de NO fluxo-dependente (BASSENGE E & HEUSCH G, 1990). Essa vasodilatação fluxo-dependente é provavelmente de crucial importância na circulação coronária, para perfusão sanguínea miocárdica ótima durante o exercício, quando o fluxo coronário pode aumentar até 4 a 6 vezes, para suprir as demandas miocárdicas de oxigênio. A prostaciclina contribui para a regulação do tônus arterial coronário, porém não parece desempenhar papel significativo no controle da vasodilatação fluxo-dependente (VRINTS G & HERMAN AG, 1991). Mecanismos adicionais, como estimulação β -adrenérgica, metabólitos vasodilatadores e aumento da pressão de perfusão participam provavelmente da vasodilatação das artérias normais com o exercício (CHESEBRO JH *et al.*, 1989).

O aumento do *stress* parietal arterial (*shear stress*) -relação força/unidade de área que atua na superfície endotelial ou luminal do vaso, como resultado do fluxo sanguíneo- estimula a liberação de NO e ativa os canais de potássio, iniciando a hiperpolarização (OHESSEN SP *et al.*, 1988).

Esse efeito pode ter importância no mecanismo sensor do fluxo pelas células endoteliais (VRINTS G & HERMAN AG, 1991), as quais funcionam também como sensores de oxigênio e contribuem, dentro das variações fisiológicas da tensão de oxigênio, para a regulação local do fluxo sanguíneo, pela liberação concomitante de NO, prostaciclina e PGE₂ (BASSENGE E & BUSSE R, 1988; VRINTS G & HERMAN AG, 1991)

Entre as diversas substâncias que induzem à liberação de NO incluem-se neurotransmissores e hormônios - acetilcolina, noradrenalina e vasopressina - mediadores locais - bradicinina, histamina e substância P - e compostos liberados ou gerados durante a agregação plaquetária e formação do trombo - ADP, serotonina e trombina (BASSENGE E & BUSSE R, 1988; VANE JR *et al.*, 1990)

A resposta induzida pela Ach é o exemplo mais clássico do relaxamento dependente do endotélio em artérias isoladas (FURCHGOTT RF *and* ZAWADZKI JV, 1980a; FURCHGOTT RF, 1983). Quando a função endotelial está preservada, a Ach, atuando em receptores muscarínicos da membrana endotelial, estimula a liberação de NO pelas células endoteliais e provoca relaxamento das células musculares lisas vasculares. Em presença de disfunção endotelial, a Ach não induz à vasodilatação e pode desencadear vasoconstrição devido à falta de liberação de NO (NABEL EG *et al.*, 1990; McLENACHAN JM *et al.*, 1991). Assim, a Ach exerce duas ações, distintas e opostas, nos vasos sanguíneos: constrição direta da musculatura lisa vascular e vasodilatação indireta mediada pelo endotélio.

Modulação do Tônus Arteriolar Coronário

Experimentos com preparações isoladas de coração e em cães não anestesiados, demonstraram que a administração de análogos de arginina biologicamente inertes, como L-NOARG e L-NMMA, causa aumento imediato do tônus arteriolar, com redução da perfusão miocárdica (AMEZCUA JL *et al.*,

1989). Nesses experimentos, há liberação aumentada de lactato dos corações parcialmente isquêmicos, indicando que a estimulação metabólica e a liberação de metabólitos vasodilatadores não foi suficiente para compensar adequadamente a supressão da atividade dilatadora contínua dependente do endotélio. Esses achados sugerem que o controle do tônus arteriolar dependente do endotélio possa ser tão importante quanto a regulação metabólica local e que a disfunção endotelial seja responsável por inadequada regulação da perfusão miocárdica (BASSENGE E & HUCKSTORF CH, 1991; ÉVORA PRB, 1993).

Implicações fisiológicas e fisiopatológicas do óxido nítrico no controle do tônus vascular

Em várias situações experimentais, avaliando-se leitos vasculares distintos, de animais diferentes, tem-se constatado que os inibidores da NO sintetase, causam aumento na resistência vascular arterial, que é dose-dependente e atenuam parcialmente a ação hipotensora da Ach (REES DD *et al.*, 1989). Tais efeitos desaparecem lentamente, a não ser que doses elevadas de L-arginina sejam administradas, reforçando a idéia de que sejam inibidores competitivos da síntese de NO. Vários inibidores já foram descritos, alguns com potência muito maior que o L-NAME e L-NMMA (MONCADA S *et al.* 1991). Estes, porém, são efetivos oralmente, induzindo hipertensão arterial em ratos geneticamente deficientes em vasopressina, os ratos Brattleboro (GARDINER SM *et al.*, 1990).

Esses fatos sugerem que existe uma utilização contínua de L-arginina para a formação enzimática de NO pelos vasos de resistência (MONCADA S, 1990). O registro de que a pressão arterial não se altera ou se altera modestamente quando a NO sintetase não está inibida, mostra que em

condições normais, deve existir suficiente L-arginina endógena para saturar a enzima Ca^{2+} dependente geradora de NO (AISAKA *et al.*, 1989).

A importância maior, atribuída à geração de NO pelas estruturas vasculares, aparece com a demonstração de que uma única injeção de L-NMMA induz resposta vasoconstritora e vasopressora intensa e prolongada (REES DD *et al.*, 1989; VALLANCE P *et al.*, 1989; VALLANCE *et al.*, 1990). Pelo fato da substância não ser, ela própria, um agente vasoconstritor, mas sim um inibidor da síntese de um vasodilatador endógeno, o significado do fenômeno biológico transcende muito ao que dele inicialmente se esperava. Passou-se a admitir que o NO seria gerado constantemente na parede do vaso, afirmando que o sistema vascular em repouso refletiria em estado de vasodilatação ativa (MONCADA S, 1990). Essa nova visão passou a contradizer inteiramente o conceito prévio e clássico de que o leito vascular seria uma estrutura rígida, composta por vasos de resistência ou um sistema que equilibraria forças constritoras e dilatadoras para manter o fluxo. Em verdade, o que caracterizaria o sistema vascular seria a sua vasodilatação ativa e basal contra a qual influências constritoras agiriam.

Endotélio e hipertensão arterial

Quando submetidas a estímulos mecânicos, tais como estiramento, aumentos de fluxo e de pressão intraluminais e outras forças geradas hemodinamicamente, as células endoteliais adaptam-se, alterando a produção de mediadores vasoativos. A importância da modulação da resposta vascular aos estímulos endógenos pelo endotélio tem sido verificada, tanto em animais normotensos quanto em animais hipertensos. Na hipertensão arterial, o aumento da reatividade de vasos isolados aos estímulos vasoconstritores tem sido explicado por alterações na integridade funcional do endotélio (VAN DER VOORDE J & LEUSEN I, 1986; VANHOUTTE PM & LUSCHER TF, 1987; REES *et al.*, 1989; PEARSON PJ *et al.*, 1990). A diminuição do relaxamento dependente do endotélio por ação da Ach nos modelos de hipertensão arterial

genético, renovascular e DOCA-sal, reforça a idéia de que a redução (ou inibição) da liberação contínua de NO possa contribuir para a hipertensão arterial (DOHI Y et al., 1990; VANE JR et al., 1990). O aumento da reatividade vascular em vários modelos de hipertensão experimental tem sido atribuído, não só à redução da produção de fatores de relaxamento, como também ao aumento da produção de, pelo menos, um fator de contração derivado do endotélio. Sob estímulo do ADP, foi demonstrado recentemente que a inibição da produção endotelial de NO suprime totalmente o relaxamento endotélio-dependente induzido pelo nucleotídeo em vasos de resistência de ratos com hipertensão renovascular, o que não ocorre em ratos normotensos (ALMEIDA PJ, 1991). Isto indica que os vasos de resistência dos animais hipertensos, além de terem a produção de NO reduzida, praticamente não produzem um outro fator de relaxamento - possivelmente o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) - existente nos vasos dos animais normotensos (DOHI Y et al., 1990; ALMEIDA PJ, 1991). Por outro lado, a produção de um fator de contração derivado do endotélio (EDCF) identificado como um produto da via da ciclooxigenase tem sido evidenciada em diversos setores do organismo, incluindo os vasos de resistência. Esse fator certamente contribui para o aumento da resistência periférica, com a conseqüente manutenção da hipertensão arterial.

Hipertensão e sistema renina angiotensina

Em diferentes tipos de hipertensão experimental foram demonstradas, além da hipertrofia da média, alterações morfológicas do endotélio, como irregularidades da superfície celular, associadas a aumento da permeabilidade aos componentes sangüíneos e à redução do relaxamento dependente do endotélio (CHOBANIAN AV, 1986; LUSCHER TF *et al.*, 1991). De outra parte, em pacientes hipertensos, a dilatação vascular induzida pela Ach é menor do que a observada em indivíduos normotensos, sugerindo que na hipertensão

deva haver alguma disfunção endotelial que possa ser causa ou ainda, consequência da hipertensão.

A atividade aumentada do sistema renina angiotensina tem participação importante nas alterações vasculares encontradas na HA. A angiotensina II, além de potente vasoconstritor, é também fator mitogênico. Estudos indicam o envolvimento da angiotensina II na hipertrofia vascular associada à hipertensão e na hiperplasia mio-intimal (POWELL JS *et al.*, 1989; PRATT RE & DZAU VJ, 1993). Esta substância tem a propriedade de ativar fatores protooncogênicos e de estimular a produção de fatores de crescimento diversos, inclusive fatores autócrinos das células musculares lisas (LUSCHER TF *et al.*, 1991; PRATT RE & DZAU VJ, 1993)

A ativação dos receptores da angiotensina II das células musculares lisas vasculares resulta em aumento da atividade da fosfolipase C, a qual gera trifosfato de inositol e diacilglicerol (RAPAPORT RM *et al.*, 1983). Esses metabólitos iniciam uma série de eventos celulares, tais como aumento do cálcio intracelular e ativação da proteína quinase, a qual induz à contração de miofibrilas. Esses eventos medeiam também os efeitos tardios da angiotensina II, como regulação da expressão de genes, aumento de proteínas, síntese de DNA e RNA e o resultante aumento do crescimento celular e da estrutura vascular (PRATT RE *and* DZAU VJ, 1993).

O papel do endotélio nas ações de inibidores de enzima de conversão

Os efeitos hipotensores dos inibidores da enzima de conversão (ECA) dependem, além de sua intervenção direta sobre a geração de angiotensina II (GAVRAS *et al.*, 1974; McAREAVEY *et al.*, 1990), da não degradação de cininas vasodilatadoras a peptídios inativos (ERDÜS EG, 1990). Contudo, tais efeitos são muito mais complexos e relacionam-se a mecanismos dos quais participa o endotélio.

A administração de L-NMMA a ratos espontaneamente hipertensos atenua o efeito hipotensor agudo induzido pelo captopril ou ramipril, o que indica a contribuição do NO na redução da pressão arterial mediada por inibidores da ECA (CACHOFEIRO V *et al.*, 1992). Por outro lado, o captopril mostrou-se capaz não apenas de impedir o desenvolvimento de hipertensão crônica produzido pelo L-NAME como, também, de reverter os níveis elevados de pressão arterial induzidos por este tratamento (LEÃO MC, 1993).

Ainda que não se tenha esclarecido completamente como o NO contribui para a ação hipotensora dos inibidores da ECA admite-se que a redução da pressão arterial e o aumento do fluxo sanguíneo, resultantes do bloqueio da formação da angiotensina II e da não degradação da bradicinina, promovam um aumento do *shear stress* sobre o endotélio estimulando a produção de NO e aumentando o efeito hipotensor (CACHOFEIRO V, 1991).

A contribuição do NO aos efeitos hipotensores dos inibidores da ECA observa-se, também, quando se utiliza um antagonista de receptores AT₁ da angiotensina II, o losartam. Ressalte-se, porém, que esse papel do NO não é um fenômeno geral, inespecífico, comum a todos os anti-hipertensivos. CACHOFEIRO (1991) demonstrou que a administração, por exemplo, de L-NMMA a ratos espontaneamente hipertensos não modificou a redução da pressão induzida pelo nitroprussiato de sódio ou pelo prazosin. A elevação dos níveis endógenos de cininas, secundária à presença de inibidores da ECA, mediará a biossíntese de NO, já que o peptídeo estimula *in vitro* e *in vivo* a geração de NO. Além disso, antagonistas de cininas abolem, *in vitro*, os efeitos do ramipril sobre a produção de NO (WIEMER G *et al.*, 1991).

Nem todos os inibidores da ECA, porém, intervêm igualmente sobre a síntese de NO (FRANCISCHETTI *et al.*, 1995). O captopril é capaz de relaxar anéis de aorta de coelhos pré-contraídas com norepinefrina, desaparecendo, contudo, esse efeito quando se desnuda o vaso. Por sua vez, o enalapril não induz relaxamento vascular na presença ou ausência de endotélio (GOLDSCHIMIT & TALLARIDA, 1991). Já o cilazapril potencializa o

relaxamento dependente de endotélio na presença de bradicinina, em artérias femural e coronária de cães, mas não modifica o relaxamento provocado pela Ach ou trombina (MOMBOULI JV *et al.*, 1991).

A presença na molécula de um inibidor da ECA de um grupo sulfidrilo, como é o caso do captopril, parece explicar as diferenças entre os efeitos dos inibidores da ECA sobre o relaxamento induzido por agentes vasodilatadores. Sugere-se que apenas o grupo sulfidrilo potencializaria a síntese de um S-nitrosotiol, precursor lábil do NO derivado do endotélio (IGNARRO LJ, 1990, RUBANYI GM *et al.*, 1991). Outra possibilidade aventada é de que o grupo sulfidrilo impediria a degradação do NO, graças à sua capacidade em eliminar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (PALMER RMJ *et al.*, 1987; GOLDSCHIMIT & TALLARIDA, 1991)

2.

EFEITOS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS SOBRE A MORFOLOGIA E A FUNÇÃO CARDÍACAS

2.1. INTRODUÇÃO

A inibição crônica da síntese de óxido nítrico (NO) por administração diária de inibidores da NO-sintase, como o N⁰-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME; MOORE *et al.*, 1989) leva ao desenvolvimento de hipertensão arterial (HA; BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992; ARNAL *et al.*, 1993a). Verifica-se elevação da pressão arterial tempo- e dose-dependentes (RIBEIRO *et al.*, 1992; ARNAL *et al.*, 1993a), concomitantemente a uma diminuição do débito cardíaco (LOEB & LONGNECKER, 1992; JOVER *et al.*, 1993) e a um aumento na resistência vascular total (RVT; GARDINER *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1992). Os mecanismos que têm sido propostos para explicar o aumento na RVT estão relacionados a um desequilíbrio entre fatores vasoconstrictores endógenos e diminuição do efeito vasodilatador do NO (VANE *et al.*, 1990; ITO *et al.*, 1991a; ITO *et al.*, 1991b; TOLINS *et al.*, 1991; DE NICOLA *et al.*, 1992; LERMAN *et al.*, 1992; OHISHI *et al.*, 1992; OHYANAGI *et al.*, 1992; SIGMON *et al.*, 1992), além da retenção renal de água e sódio (LAHERA *et al.*, 1991; SALOM *et al.*, 1992). Por outro lado, esta condição de pós-carga aumentada tem sido descrita como principal responsável pelo comprometimento do débito cardíaco observado (GARDINER *et al.*, 1990; WIDDOP *et al.*, 1992; HERITY *et al.*, 1994). Curiosamente, estes efeitos cardiovasculares induzidos cronicamente pela L-NAME são revertidos apenas de forma parcial pela infusão de L-arginina (RIBEIRO *et al.*, 1992). Este fato sugere que a inibição crônica da síntese de NO promova outras alterações, funcionais e/ou estruturais, no sistema cardiovascular, que também contribuem para quadro hemodinâmico descrito neste modelo. Por exemplo, a nível de vasos coronarianos, aumento mantido da resistência ou fenômenos espásticos podem estar implicados na queda do débito cardíaco, causada por disfunção miocárdica de origem isquêmica. O desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) observado em outros modelos clássicos de hipertensão arterial, como o renovascular (GOLDBLATT II, 2K-1C) e o deoxicorticosterona acetato-sal (DOCA-SAL), pode ser outro fator

contribuinte para explicar o pior desempenho cardíaco neste novo modelo de HA. Em preparação de coração isolado de ratos, foi demonstrado o comprometimento de fluxo coronariano induzido por inibição aguda da síntese de NO, o qual foi mais drasticamente reduzido em corações hipertrofiados de ratos espontaneamente hipertensos (AMEZCUA *et al.*, 1988). No entanto, pouco se conhece a respeito do comportamento da vasculatura coronariana, e há controvérsias quanto à presença de HVE neste modelo de inibição crônica da síntese de NO (ARNAL *et al.*, 1992; JOVER *et al.*, 1993). Também não há relatos na literatura sobre possíveis alterações na estrutura miocárdica, frequentemente observadas em outras situações associadas à insuficiência coronariana crônica ou hipertrofia ventricular esquerda.

Esta tese tem por objetivos avaliar, em ratos Wistar, os efeitos da inibição aguda e crônica da síntese de óxido nítrico sobre a morfologia e a função cardíacas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 150 e 200 gramas, quando do início do estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 6 animais por unidade, no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e com 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Os animais serviam-se "ad libitum" de água e de ração Purina, contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração.

2.2.1. Grupos experimentais

Foram estudados 5 grupos experimentais:

- Grupo CONTROLE: incluiu 68 ratos submetidos à cirurgia simulada para produção de estenose de artéria renal recebendo somente água tépida;
- Grupo 2K-1C: incluiu 46 ratos submetidos à estenose de artéria renal;
- Grupo L-NAME: incluiu 78 ratos que receberam 65 mg/kg/dia de L-NAME (N⁰-nitro-L-arginina metil éster) acrescentados à água ingerida pelos animais (BAYLIS et al, 1992; RIBEIRO et al., 1992);
- Grupo K-1C+L-NAME: incluiu 42 ratos submetidos à estenose de artéria renal e que receberam 65 mg/kg/dia de L-NAME acrescentados à água ingerida.
- D-NAME: incluiu 12 ratos que também foram submetidos à cirurgia fictícia e receberam 65 mg/kg/dia de D-NAME (N⁰-nitro-D-arginina metil éster) acrescentados à água ingerida pelos animais (RIBEIRO et al., 1992);

Um balanço hídrico diário permitia a adequação do volume de água a ser ingerido pelos animais, visando à ingestão total das drogas pelos grupos tratados com L-NAME e D-NAME. O mesmo procedimento era realizado em relação aos grupos que não recebiam drogas.

Subgrupos destes animais foram sacrificados após duas semanas (CONTROLE, n=18; L-NAME, n=19; 2K-1C, n=13; 2K-1C+L-NAME, n=12), quatro semanas (CONTROLE, n=29; L-NAME, n=35; 2K-1C, n=18; 2K-1C+L-NAME, n=19) e oito semanas (CONTROLE, n=21; L-NAME, n=19; D-NAME, n=12; 2K-1C, n=15; 2K-1C+L-NAME, n=11).

2.2.2. Hipertensão arterial - Técnica de Goldblatt

Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico e submetidos à uma incisão látero-dorsal esquerda através da qual o rim esquerdo era exposto. Com auxílio de cotonetes, o pedículo renal era isolado e um clipe de prata (0,2 mm de diâmetro interno) era colocado em torno da artéria renal, como descrito por Goldblatt et al..(1934). Em seguida o rim era recolocado cuidadosamente no abdome do animal, após o que a incisão era fechada com fio de algodão número 8. Nos animais que serviram como controles, uma cirurgia fictícia era realizada, na qual o clipe era removido imediatamente após sua colocação em torno do vaso e o rim recolocado na cavidade abdominal. Os animais se recuperavam em gaiolas aquecidas e com livre acesso à água e à comida.

2.2.3. Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda

Previamente ao estudo, e durante 8 semanas após o início do mesmo, os animais eram pesados duas vezes por semana, utilizando-se balança Ohaus (Union N.J.,USA). Nos mesmos dias, a pressão arterial de cauda era avaliada, utilizando-se um manguito colocado em torno da cauda do animal o qual era

conectado a um microfone usado como sensor. O manguito era inicialmente insuflado a um valor superior à pressão arterial do animal, para em seguida ser desinsuflado até que as pulsações arteriais detectadas por método pletismográfico fossem visíveis ao osciloscópio. Os valores obtidos através deste método correlacionam-se melhor com a pressão média do que com a pressão sistólica medidas por cateterização intra-arterial (ZATZ, 1990). A medida da pressão arterial de cauda era obtida estando o animal em estado de vigília, após aquecimento em gaiola especial, para que se produzisse vasodilatação da artéria. Os valores médios das duas medidas semanais do peso corporal e da pressão arterial de cauda foram utilizados como representativos de cada semana.

2.2.4. Coração isolado

Ao término da 8ª semana, um pequeno contingente de animais dos grupos CONTROLE (n=8) e L-NAME (n=7), com peso corporal entre 410 e 440 g, foi anestesiado com pentobarbital sódico (30 mg/kg) por via intra-peritoneal e submetidos a uma toracotomia bilateral. O coração era então rapidamente retirado do tórax e mergulhado em solução fisiológica mantida a 0°C. Em seguida, introduzia-se a extremidade de uma cânula cardíaca na porção da aorta ascendente que fora retirada com o coração, sendo esta amarrada à cânula (Figura 1). Era realizada uma incisão no átrio esquerdo e através dela um balão de látex era introduzido no interior do ventrículo esquerdo (Figura 1). Este balão era preenchido com volume constante de salina (0,1 ml) para todos os animais e conectado por cateter de polietileno (Intramedic Polyethylene Tube PE 160, Clay Adams, Inc., New York, N.Y., USA) a um transdutor de pressão (7016, Ugo Basile, Varese, Itália) acoplado a um registrador de dois canais (Gemini 7070, Ugo Basile, Varese, Itália), previamente calibrado. Por estarmos avaliando funcionalmente corações de animais normotensos e hipertensos e modelos diferentes de hipertensão arterial, portanto com complacências ventrícu

Figura 1. Coração isolado. Balão de látex introduzido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo e aorta canulada para perfusão.

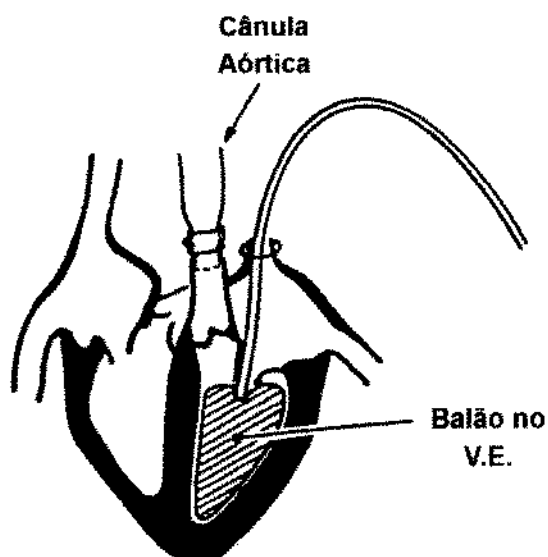
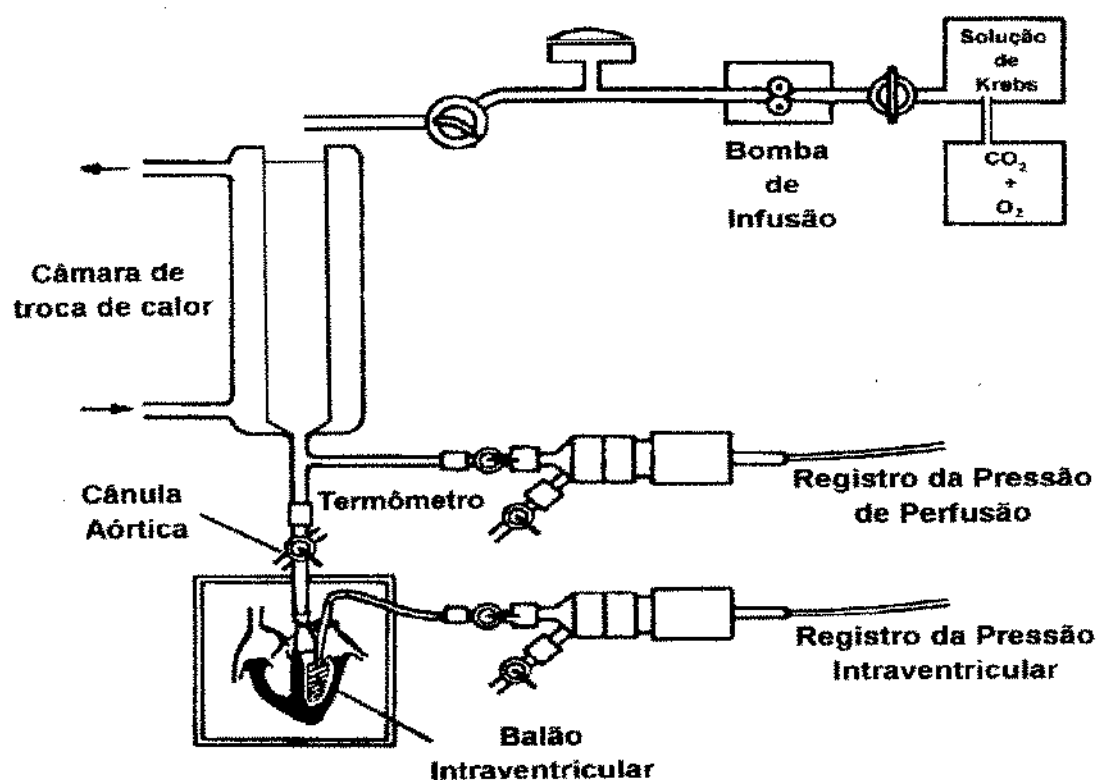


Figura 2. Preparação de Langendorff para coração isolado.



lares provavelmente distintas, fixamos o volume de salina no interior do balão intraventricular em 0,1 ml (BING *et al.*, 1995).

- Sistema de perfusão do coração isolado

O coração era perfundido pela técnica de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit (composição abaixo¹). Esta solução, mantida em frasco de Mariotte, era borbulhada continuamente com mistura gasosa de oxigênio 95% e gás carbônico (5%). A pressão no interior do frasco, que condicionava a pressão de perfusão do coração, era mantida constante, em aproximadamente 65 mmHg (pressão de perfusão). Antes de perfundir as coronárias do coração isolado, a solução era aquecida em um sistema permutador de calor. A cânula de perfusão (cânula cardíaca) era construída de modo a permitir: a) a colocação da aorta remanescente do coração isolado na sua extremidade distal; b) a entrada contínua da solução de Krebs-Henseleit¹; c) o acoplamento a um termômetro para aferição da temperatura da solução, mantida a 35° C; d) a conexão a um manômetro de mercúrio, para monitorização da pressão de perfusão; e) conexão a um dispositivo que permitisse a retirada de bolhas de que porventura surgissem no sistema ("cata-bolhas").

¹SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT: NaCl- 115 mM; KCL- 5,4 mM; CaCl₂- 1,25 mM; NaH₂PO₄- 1,15 mM, MgSO₄-1,2 mM; NaHCO₃- 25 mM; d-Glicose- 11 mM; Manitol- 2mM; Insulina- 10 UI para um total de 1000 ml da solução (pH= 7,2-7,4).

- Determinação do desenvolvimento de pressão intra-ventricular

Com este sistema foi possível determinar as pressões sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (PSVE e PDFVE, respectivamente, mmHg). O registro também permitiu a determinação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PD, mmHg), assim calculada:

$$PD = PSVE - PDFVE$$

Além dos valores absolutos da PD, calculamos seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo, ou seja, pela relação PD/PVE, expressa em mmHg/g. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar a capacidade contrátil do ventrículo esquerdo, já que nesta preparação o mesmo efetua contrações isovolumétricas, estando com a pré-carga e a pós-carga fixas. A relação PD/PVE é mais sensível para avaliar a capacidade contrátil intrínseca do miocárdio, pois esta depende da massa miocárdica participante da contração, refletindo melhor a tensão parietal desenvolvida durante a sístole ventricular (SASAYAMA et al., 1976). Os mesmos registros permitiram também a obtenção da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm).

- Determinação do fluxo coronariano

O fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min) foi medido manualmente, coletando-se o efluente drenado espontaneamente para o seio coronário e átrio direito, em períodos previamente estabelecidos. O fluxo coronariano foi avaliado antes e imediatamente após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA 0,1 μ g) em

forma de bolus, através da extremidade da cânula cardíaca conectada à aorta. Os valores de ϕCor foram normalizados para o peso do VE, sendo esta relação mais sensível para avaliar o fluxo coronariano por massa de tecido cardíaco.

- Avaliação da resposta do coração isolado à administração de noradrenalina.

Simultaneamente à determinação do ϕCor , obtivemos o registro da pressão intraventricular antes e após administração de noradrenalina como descrita anteriormente. Como valores de PSVE e PDFVE após noradrenalina, utilizamos os máximos atingidos entre 30 e 45 segundos após a administração da droga (resposta máxima). Calculamos, então, a variação da pressão desenvolvida (ΔPD) da seguinte forma:

$$\Delta\text{PD} = (\text{PSVE-PDFVE})_{\text{pós-NORA}} - (\text{PSVE-PDFVE})_{\text{pré-NORA}}$$

Calculamos, ainda, a variação de pressão desenvolvida (ΔPD) normalizada para o peso ventricular esquerdo (PVE), obtendo assim, a relação $\Delta\text{PD} / \text{PVE}$ (mmHg/g).

Estes parâmetros (ΔPD e $\Delta\text{PD}/\text{PVE}$) e a determinação simultânea da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm) foram utilizados, respectivamente, para avaliar as respostas contrátil e cronotrópica à estimulação beta agonista, promovidas pela noradrenalina.

2.2.5. Determinação da massa miocárdica

Foram sacrificados, sob anestesia com éter, subgrupos de animais após 2, 4 e 8 semanas de estudo. O coração era removido do tórax, lavado em salina e dissecado, sendo os átrios removidos e os ventrículos pesados em uma balança analítica Mettler (Instrument Corp Highstone N.J., USA) obtendo-se, assim, o peso cardíaco total (PCTotal, g). Em seguida, o peso ventricular esquerdo (PVE, g) era determinado extirpando-se a parede livre do ventrículo direito e pesando-se o tecido restante (ventrículo esquerdo e septo interventricular). O peso do coração e do ventrículo esquerdo foram normalizados para o peso corporal de cada animal ao final do estudo, obtendo-se assim, respectivamente, o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) e o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g).

2.2.6. Avaliação histológica

Após a determinação dos pesos cardíacos, os ventrículos esquerdo e direito eram imersos em solução de formalina a 10% por 24 horas, sendo após incluídos em parafina, cortados perpendicularmente ao seu maior eixo em 5 níveis equidistantes em secções de 5 μ m, as quais eram coradas com hematoxilina-eosina para estudo sob microscopia ótica. Os cortes histológicos eram considerados positivos quando uma pequena ou extensa área de necrose

e/ou fibrose miocárdica era encontrada. Os resultados positivos eram, então, classificados de acordo com os seguintes critérios (FACTOR *et al.*, 1981): (+) fracamente positivo: um ou dois pequenos focos de necrose e/ou fibrose, com diâmetro menor que 500 μm em uma dimensão; (++) moderadamente positivo: Mais que dois focos de necrose e/ou fibrose, com diâmetro menor que 500 μm em uma dimensão, sem confluência; (+++) fortemente positivo: focos confluentes de necrose e/ou fibrose, com diâmetro maior que 500 μm em uma dimensão ou infartos extensos.

2.2.7. Análise estatística

Os resultados são mostrados sob a forma de média $\pm$ erro-padrão da média. Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das distribuições dos valores ou a variabilidade das medidas efetuadas. Foram aplicados os seguintes testes:

1. Análise de variância para medidas repetidas foi aplicada para comparar as médias de peso corporal e de pressão arterial de cauda nos vários períodos em cada grupo experimental. Esta análise intra-grupo foi aplicada, em separado, para cada um dos grupos e, quando significativa, o teste de Duncan foi utilizado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

2. Análise de variância para amostras independentes foi aplicada para comparar as médias de peso corporal e de pressão arterial de cauda dos grupos experimentais ao final de 2, 4 e 8 semanas. O mesmo teste foi utilizado para comparar as médias de PCTotal e de PVE entre os grupos experimentais ao final de 2, 4 e 8 semanas. Quando esta análise inter-grupos resultava significativa, o teste de Duncan era aplicado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

3. Testes "t" de Student foram utilizados para comparar as médias da pressão sistólica e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, o desenvolvimento de pressão intraventricular, a variação do desenvolvimento da pressão intraventricular e o ϕ Cor, entre os grupos CONTROLE e L-NAME (não pareado), bem como antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (pareado) (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

4. Análise de variância por postos (teste H de Kruskal-Wallis¹) e a prova prova U de Mann-Whitney² foram aplicadas para comparar as médias das seguintes razões: PCRelat¹, PVERelat¹, PD/PVE², Δ PD/PVE² e ϕ Cor/PVE². O Teste H de Kruskal-Wallis também foi aplicado para comparar as áreas de necrose e/ou fibrose nos 4 grupos experimentais, avaliadas de forma semiquantitativa ao final de 2, 4 e 8 semanas. Quando o teste H de Kruskal-Wallis resultava significativa, o teste de Dunn era aplicado para definir as

superposições e contrastes nos valores confrontados (Software Stanton Glanz, Primer of Statistics, 1990)

Em todos os testes fixou-se em 5% (erro $\alpha < 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com os seguintes símbolos (*, **, #, §) os valores significantes.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Peso corporal (PCorp)

Os pesos corporais dos animais dos grupos CONTROLE, L-NAME, D-NAME, 2K-1C, 2K-1C+L-NAME não diferiram significativamente entre si em todo o curso do estudo (Tabela 1).

2.3.2. Pressão arterial de cauda (PAC)

A administração crônica de L-NAME induziu nos ratos hipertensão tempo-dependente que alcançou resposta máxima na 5ª semana de estudo. O inantiômero inativo D-NAME não apresentou efeito sobre a PAC quando comparada à dos animais do grupo CONTROLE. Os animais 2K-1C desenvolveram uma hipertensão tempo-dependente atingindo aumento máximo na 6ª semana. Após a 6ª semana, a PAC dos ratos 2K-1C foi significativamente maior que nos animais recebendo L-NAME. Os ratos 2K-1C que receberam L-NAME (grupo 2K-1C+L-NAME) desenvolveram hipertensão semelhante à observada nos animais tratados com L-NAME (Figura 3).

2.3.3. Avaliação funcional do coração isolado

- Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

Os valores médios de pressão sistólica (PSVE, mmHg) e diastólica do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após administração de noradrenalina 0.1µg, estão expostos na tabela 2. Os valores basais, ou seja, prévios à administração de noradrenalina 0,1 µg, da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) foram maiores no grupo L-NAME (111±6 mmHg) do que no grupo CONTROLE (96±5 mmHg) ($p < 0,00001$). A PDFVE não foi estatisticamente diferente nos dois grupos experimentais.

Em valores absolutos, o grupo L-NAME mostrou maior capacidade de desenvolvimento de pressão intra-ventricular em relação ao grupo CONTROLE

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal, expresso em gramas, dos quatro grupos experimentais durante o período de estudo.

Grupos	Basal	2^a semana	4^a semana	6^a semana	8^a semana
CONTROLE	162 $\pm$ 16	216 $\pm$ 10	288 $\pm$ 25	312 $\pm$ 18	354 $\pm$ 22
2K-1C	159 $\pm$ 10	202 $\pm$ 14	252 $\pm$ 16	295 $\pm$ 22	353 $\pm$ 26
L-NAME	173 $\pm$ 28	210 $\pm$ 12	271 $\pm$ 13	302 $\pm$ 27	330 $\pm$ 31
2K-1C+L-NAME	165 $\pm$ 13	192 $\pm$ 12	242 $\pm$ 16	292 $\pm$ 18	340 $\pm$ 24
D-NAME	-	-	-	-	320 $\pm$ 25

Análise de variância para medidas repetidas (intra-grupo)

Grupo Controle: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2^a semana < 4^a semana < 8^a semana;

Grupo 2K-1C: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2^a semana < 4^a semana < 8^a semana;

Grupo L-NAME: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2^a semana < 4^a semana < 8^a semana;

Grupo 2K-1C+L-NAME: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2^a semana < 4^a semana < 8^a semana.

Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

Basal: $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

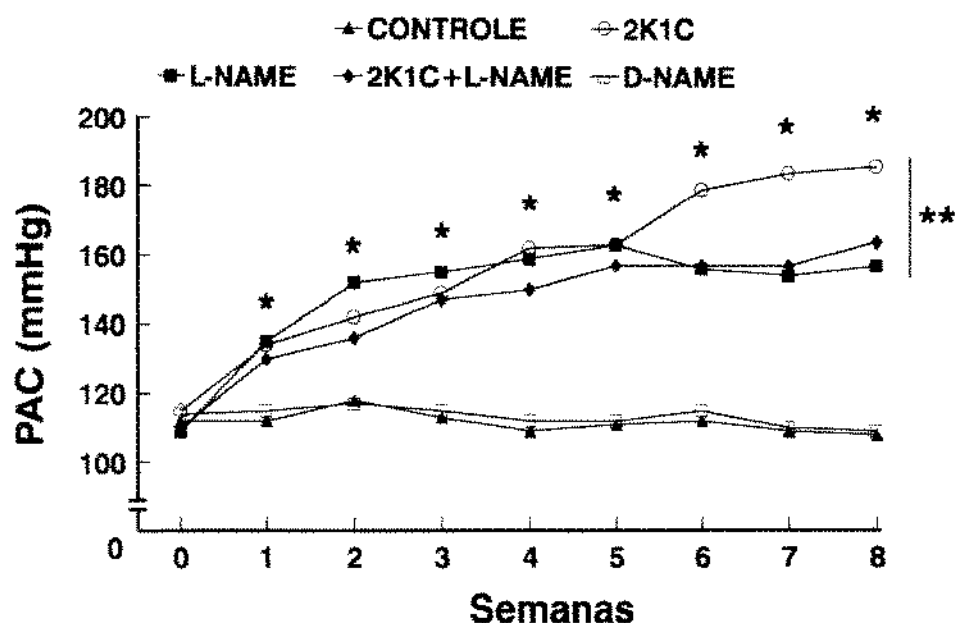
2^a semana: $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

4^a semana: $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

6^a semana: $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

8^a semana: $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME = D-NAME.

Figura 3. Curva dos valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão arterial de cauda, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), dos 5 grupos experimentais durante as 8 semanas de estudo.



Análise de variância para medidas independentes (inter-grupos)

* $p < 0.05$ vs. CONTROLE; CONTROLE = D-NAME < 2K-1C = L-NAME = 2K-1C+L-NAME, até a 5ª semana;

** $p < 0.05$; 2K-1C > L-NAME = 2K-1C+L-NAME, da 6ª semana até o final do estudo.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0.1 μ g (NORA 0.1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)		L-NAME (n=7)	
	pré-NORA 0.1	pós-NORA 0.1	pré-NORA 0.1	pós NORA 0.1
PSVE (mmHg)	96 $\pm$ 5	112 $\pm$ 5*	111 $\pm$ 6*	124 $\pm$ 5**,\$
PDFVE (mmHg)	5,2 $\pm$ 2,0	6,5 $\pm$ 1,7	3,5 $\pm$ 2,7	4,7 $\pm$ 1,4

Teste "t" de Student pareado

*p< 0,00001; CONTROLE, pré- vs pós-NORA 0,1

t =14,0678; graus de liberdade=7

**p< 0,0001; L-NAME, pré- vs pós-NORA 0,1

t =8,3269; graus de liberdade= 6

Teste "t" de Student não pareado

#p< 0,0001; CONTROLE vs L-NAME, pré-NORA

t = 6,1103; graus de liberdade= 13

\$p< 0,0001; CONTROLE vs L-NAME, pós-NORA

t = 5,3739; graus de liberdade= 13

(108 ± 6 e 91 ± 5 mmHg, respectivamente; $p < 0,00001$) (Tabela 3). Entretanto, a análise destes valores, quando normalizados para o PVE, mostrou resultado inverso, isto é, o grupo L-NAME apresentou relação PD/PVE menor que a do grupo CONTROLE (151 ± 10 e 162 ± 6 mmHg/g, respectivamente; $p < 0,001$) (Tabela 3). Tal resultado, deveu-se ao maior PVE apresentado no grupo L-NAME quando comparado ao grupo CONTROLE ($0,705 \pm 0,015$ e $0,565 \pm 0,036$ g, respectivamente; $p < 0,00001$) (Tabela 3).

- Resposta da pressão intra-ventricular à administração de noradrenalina $0,1 \mu\text{g}$

Após a administração de noradrenalina $0,1 \mu\text{g}$, as pressões sistólicas dos grupos CONTROLE e L-NAME elevaram-se significativamente para 112 ± 5 (16%) e 124 ± 5 (11%) mmHg, respectivamente ($p < 0,00001$) (Tabela 2).

A variação da pressão desenvolvida (ΔPD) com a administração de noradrenalina $0,1 \mu\text{g}$, foi significativamente menor no grupo L-NAME que no grupo CONTROLE, tanto em valores absolutos (12 ± 4 e 16 ± 3 mmHg, respectivamente; $p < 0,05$) quanto normalizados para o peso ventricular esquerdo (28 ± 7 e 17 ± 6 mmHg/g, respectivamente; $p < 0,001$) (Tabela 4)

Não observamos diferenças significantes na PDFVE após a administração de noradrenalina $0,1 \mu$ entre os grupos CONTROLE e L-NAME (Tabela 2).

- Frequência cardíaca

Ambos os grupos CONTROLE e L-NAME apresentaram resposta cronotrópica positiva à estimulação pela noradrenalina $0,1 \mu\text{g}$ (de 382 ± 14 para 417 ± 12 e 398 ± 19 para 430 ± 10 , respectivamente) (Tabela 5). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré e pós-NORA $0,1$ entre os grupos CONTROLE e L-NAME (Tabela 5).

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão desenvolvida (PD= PSVE-PDFVE, mmHg) pelo ventrículo esquerdo e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)	L-NAME (n=7)
PD (mmHg)	91 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6*
PVE (g)	0,565 $\pm$ 0,038	0,705 $\pm$ 0,019*
PD/ PVE (mmHg/g)	162 $\pm$ 9	151 $\pm$ 5**

Teste "t" de Student não pareado

*p< 0,0001; CONTROLE vs L-NAME

t =6,4156; graus de liberdade= 13

*p<0,0001; CONTROLE vs L-NAME

t= 8,8891; graus de liberdade= 13

Prova de Mann-Whitney

**p< 0,001; CONTROLE vs L-NAME

U =50,5000; graus de liberdade= 13

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Δ PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (Δ PD/ PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8) pós-NORA 0,1	L-NAME (n=7) pós-NORA 0,1
Δ PD (mmHg)	16,3 $\pm$ 3,0	12,3 $\pm$ 4,0*
PVE (g)	0,565 $\pm$ 0,038	0,705 $\pm$ 0,019 [#]
Δ PD/ PVE (mmHg/g)	28,8 $\pm$ 5,9	17,3 $\pm$ 5,7**

Teste "t" de Student para amostras independentes

*p< 0,05; CONTROLE vs L-NAME, pós-NORA 0,1

t =2,2025; graus de liberdade= 13

*p<0,0001; CONTROLE vs L-NAME

t= 8,8891; graus de liberdade= 13

Prova de Mann-Whitney

**p< 0,001; CONTROLE vs L-NAME, pós-NORA 0,1

U=50,5000; graus de liberdade= 13

Tabela 5. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min) e da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA 0,1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	FC (bpm)		ϕ Cor (ml/min)	
	pré-NORA 0,1	pós-NORA 0,1	pré-NORA 0,1	pós-NORA 0,1
CONTROLE (n=8)	382 $\pm$ 14	417 $\pm$ 12*	14,0 $\pm$ 1,4	11,6 $\pm$ 0,9 [#]
L-NAME (n=7)	398 $\pm$ 19	430 $\pm$ 10**	12,2 $\pm$ 1,2 ^{&}	9,5 $\pm$ 1,4 ^{##, \$}

Frequência cardíaca (FC)

1) Testes "t" de Student pareado

*p<0,0001; CONTROLE, pré vs pós-NORA; t =8,6338; graus de liberdade= 7

**p<0,001; L-NAME, pré vs pós-NORA; t =3,9720; graus de liberdade= 6

Fluxo coronariano (ϕ Cor)

1) Testes "t" de Student pareado

*p<0,001; CONTROLE, pré vs pós-NORA; t =5,6448; graus de liberdade= 7

**p<0,0001; L-NAME, pré vs pós-NORA; t =7,7914; graus de liberdade= 6

2) Testes "t" para amostras independentes

[&]p<0,05; CONTROLE vs L-NAME, pré-NORA; t =2,5879; graus de liberdade= 13

^{\$}p<0,01; CONTROLE vs L-NAME, pós-NORA; t =3,3023; graus de liberdade=13

- Fluxo coronariano

O grupo L-NAME apresentou fluxo coronariano (ϕ Cor) diminuído em relação ao grupo CONTROLE em condições basais ($12,2 \pm 1,2$ e $14,0 \pm 1,5$ ml/min, respectivamente) (Tabela 5). Os valores de ϕ Cor quando normalizados para o peso do VE (PVE) tornam mais clara esta diferença (CONTROLE= $24,8 \pm 1,9$ e L-NAME= $17,2 \pm 1,7$ ml/min/g; $p < 0,0001$). A administração de noradrenalina $0,1 \mu\text{g}$ reduziu o fluxo coronariano tanto no grupo CONTROLE ($14,0 \pm 1,5$ para $11,6 \pm 0,9$ ml/min; 17%) quanto no grupo L-NAME ($12,2 \pm 1,2$ para $9,5 \pm 1,4$ ml/min, 21%), não sendo observada uma redução significativamente maior no fluxo coronariano dos animais tratados com L-NAME (Tabela 5).

2.3.4. Pesos cardíacos

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 4 grupos experimentais, sacrificados após 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas, quando avaliados o peso cardíaco total (PCTotal) e o peso ventricular esquerdo (PVE), embora houvesse uma nítida tendência dos grupos 2K-1C, L-NAME e 2K-1C+L-NAME a apresentarem valores de PCT e PVE maiores que os demais grupos na avaliação de 8 semanas (Tabela 6). Entretanto, o peso cardíaco relativo (PCRelat) (Figura 4) e o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat) (Figura 5) foram significativamente maiores nos grupos 2K-1C e 2K-1C+L-NAME que nos grupos CONTROLE e L-NAME nas avaliações de 2 e 4 semanas. Ao final da 8ª semana, o PCRelat e o PVERelat no grupo L-NAME foram maiores que nos animais CONTROLE, não sendo diferentes estatisticamente dos valores observados nos grupos 2K-1C e 2K-1C+L-NAME (Figuras 4 e 5). Após 8

semanas, os animais tratados com D-NAME apresentaram PCRelat e PVERelat semelhantes aos animais CONTROLE (Figuras 4 e 5).

Tabela 6. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos quatro grupos experimentais na 2^a, 4^a e 8^a semanas de estudo.

	2 semanas			4 semanas			8 semanas		
	PCorp (g)	PCT (mg)	PVE (mg)	PCorp (g)	PCT (mg)	PVE (mg)	PCorp (g)	PCT (mg)	PVE (mg)
CONTROLE	216 $\pm$ 10	602 $\pm$ 26	434 $\pm$ 20	288 $\pm$ 25	628 $\pm$ 54	465 $\pm$ 49	354 $\pm$ 22	672 $\pm$ 14	482 $\pm$ 11
2K-1C	202 $\pm$ 14	587 $\pm$ 44	449 $\pm$ 24	252 $\pm$ 16	604 $\pm$ 57	457 $\pm$ 58	353 $\pm$ 26	749 $\pm$ 32	578 $\pm$ 27
L-NAME	210 $\pm$ 12	579 $\pm$ 39	441 $\pm$ 23	271 $\pm$ 13	577 $\pm$ 53	434 $\pm$ 58	330 $\pm$ 31	699 $\pm$ 18	527 $\pm$ 17
2K-1C $\pm$ L-NAME	192 $\pm$ 12	585 $\pm$ 23	452 $\pm$ 17	242 $\pm$ 16	580 $\pm$ 58	445 $\pm$ 45	340 $\pm$ 24	722 $\pm$ 37	534 $\pm$ 29
D-NAME	-	-	-	-	-	-	320 $\pm$ 25	624 $\pm$ 17	454 $\pm$ 18

2 sem.: CONTROLE, n=18; L-NAME, n=19; 2K-1C, n=13; 2K-1C+L-NAME, n=12;

4 sem.: CONTROLE, n=29; L-NAME, n=35; 2K-1C, n=18; 2K-1C+L-NAME, n=19;

8 sem.: CONTROLE, n=21; L-NAME, n=19; D-NAME, n=12; 2K-1C, n=15; 2K-1C+L-NAME, n=11

Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos) dos valores de Pcorp, PCT e PVE, para a 2^a semana, 4^a semana e 8^a semana:

Peso Corporal (PCorp): $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

Peso cardíaco total (PCT): $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME;

Peso ventricular esquerdo (PVE): $p > 0,05$; CONTROLE = 2K-1C = L-NAME = 2K1C+L-NAME.

Tabela 7. Classificação histológica das alterações miocárdicas nos grupos experimentais após 2, 4 e 8 semanas de tratamento com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

Grupos	2K-1C			L-NAME			2K-1C+L-NAME		
	2 sem.	4 sem.	8 sem.	2 sem.	4 sem.	8 sem.	2 sem.	4 sem.	8 sem.
Classificação	12	15	13	6	15	4	7	7	1
Negativo (-)	0	2	1	4	8	6	1	3	0
Positivo (+)	0	1	1	7	8	6	2	4	1
Positivo (++)	1	0	0	2	4	8	2	5	9

Nenhum coração foi classificado como positivo nos grupos CONTROLE (2^a semana, n=18; 4^a semana, n=29; 8^a semana, n=21) e D-NAME (8^a semana, n=12)

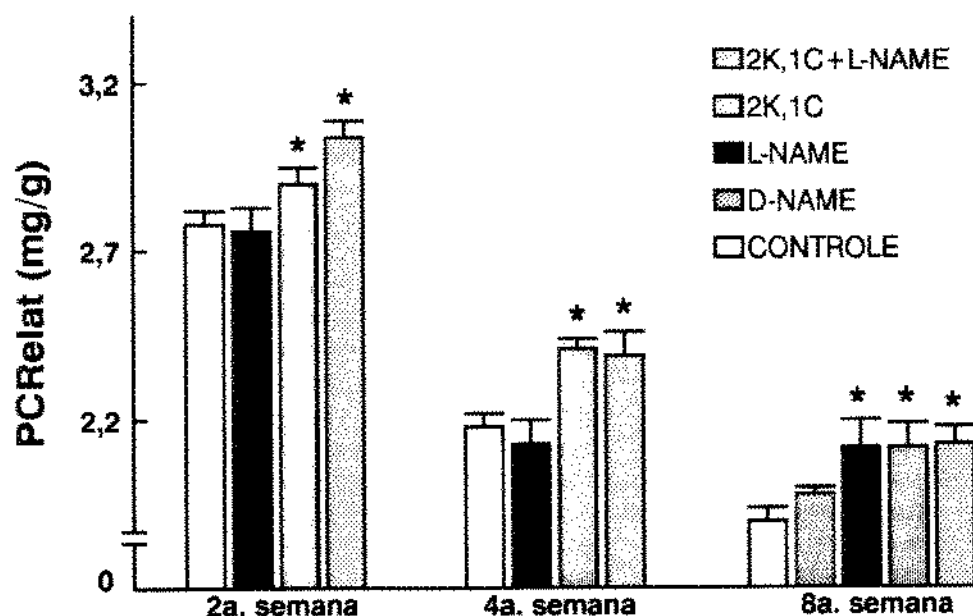
2^asemana: Kruskall-Wallis: H=8,490, p=0,014 (Teste de Dunn: 2K-1C vs L-NAME, p<0,05; L-NAME vs 2K-1C+L-NAME, p>0,05; 2K-1C vs 2K-1C+L-NAME, p>0,05).

4^asemana: Kruskall-Wallis: H=9,133, p=0,01 (Teste de Dunn: 2K-1C vs L-NAME, p<0,05; 2K-1C vs 2K-1C+L-NAME, p<0,05; L-NAME vs 2K-1C+L-NAME, p>0,05).

8^asemana: Kruskall-Wallis: H=24,756, p<0,001 (Teste de Dunn: 2K-1C vs L-NAME, p<0,05; 2K-1C vs 2K-1C+L-NAME, p<0,05; L-NAME vs 2K-1C+L-NAME, p>0,05).

A somatória dos valores de cada coluna representam o número de ratos (n) em cada semana avaliada.

Figura 4. Efeito da inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME sobre o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) após 2, 4 e 8 semanas de estudo. As barras representam os valores médios $\pm$ SEM.



Teste de Kruskal-Wallis

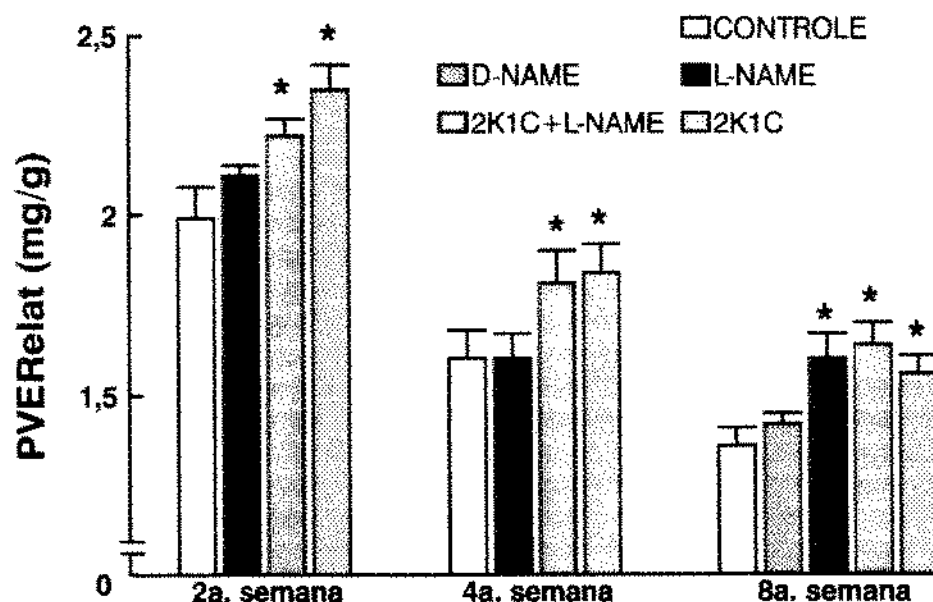
2 semanas: $H=9,1422$;

4 semanas: $H=15,2438$;

8 semanas: $H=12,1563$.

* $p < 0,05$ vs. CONTROLE; T. de Dunn: 2 e 4 semanas: $2K-1C = 2K-1C+L-NAME > CONTROLE = L-NAME$; 8 semanas: $2K-1C = 2K-1C+L-NAME = L-NAME > CONTROLE$.

Figura 5. Efeito da inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME sobre o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) após 2, 4 e 8 semanas de estudo. As barras representam os valores médios $\pm$ SEM.



Teste de Kruskal-Wallis

2 semanas: $H=11,1437$;

4 semanas: $H=16,8416$;

8 semanas: $H=15,1213$.

* $p < 0,05$ vs. CONTROLE; T. de Dunn: 2 e 4 semanas: $2K-1C = 2K-1C+L-NAME > CONTROLE = L-NAME$; 8 semanas: $2K-1C = 2K-1C+L-NAME = L-NAME > CONTROLE$.

2.3.5. Alterações miocárdicas

Nos animais CONTROLE (Figura 6a) sacrificados ao final da 2ª (n=18), 4ª (n=29) e 8ª semanas (n=21), assim como no grupo D-NAME (8 semanas, n=12), nenhum coração foi classificado como positivo. No grupo 2K-1C houve uma baixa incidência de alterações miocárdicas (Tabela 7). Entretanto os animais tratados com L-NAME desenvolveram alterações no miocárdio cuja severidade foi tanto maior quanto mais prolongado o tratamento (Tabela 7).

As lesões observadas foram, principalmente, densas áreas de fibrose intersticial (Figura 6b). Áreas de necrose miocárdica recente foram menos freqüentemente encontradas. Algum grau de perda da organização do miocárdio foi observado precocemente (2ª semana), mas as lesões foram mais freqüentes e extensas na 8ª semana. Houve maior acometimento das regiões subendocárdicas, onde infartos, algumas vezes, comprometiam até 80% da circunferência do ventrículo esquerdo. Metaplasia osteocartilaginosa foi raramente observada em áreas de necrose subendocárdica após 8 semanas de tratamento com L-NAME.

Nos animais tratados com L-NAME, foram encontradas espessamento da parede de artérias intramiocárdicas com fibrose perivascular (Figura 7a e 7b). A fibrose substitutiva na camada média dessas artérias é indicativa da presença prévia de necrose de células musculares lisas. Nos animais 2K-1C, a ocorrência de necrose fibrinóide de artérias intramiocárdicas foi infreqüente.

Não encontramos lesões miocárdicas em ventrículo direito em nenhum dos grupos estudados.

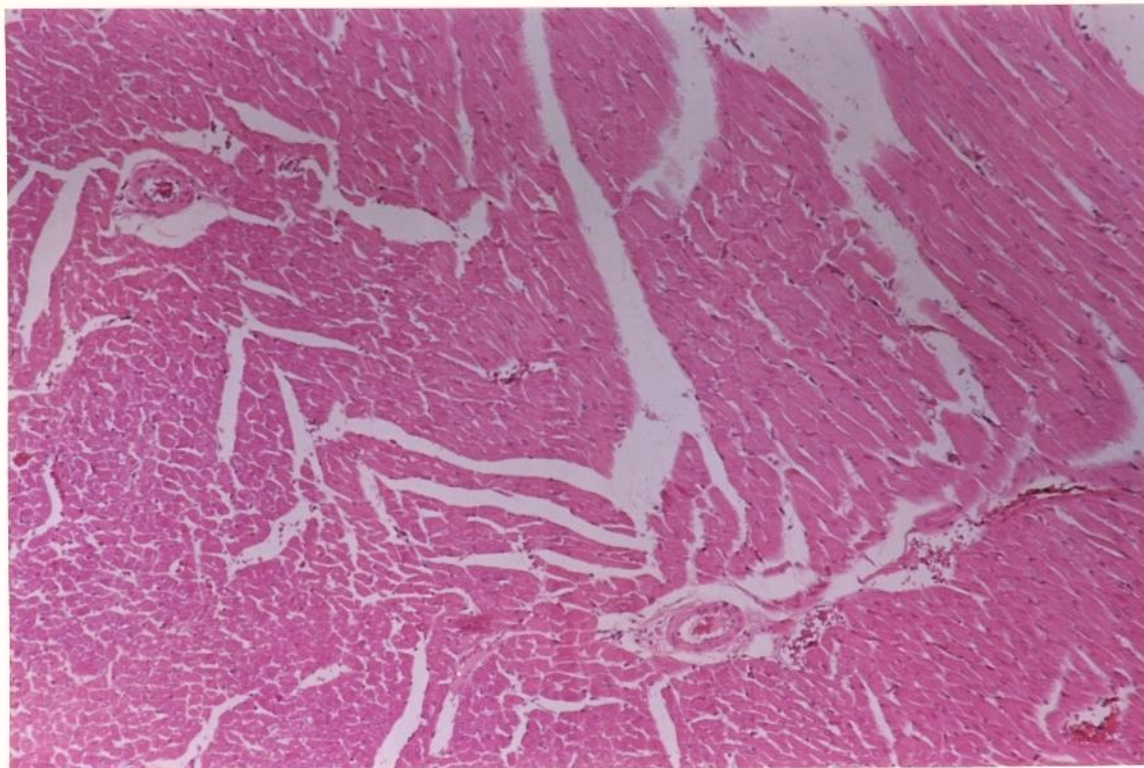


Figura 6a. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo CONTROLE após 8 semanas de estudo. Aspectos normais das fibras miocárdicas e de duas artérias de pequeno calibre. Coloração HE, 10x.

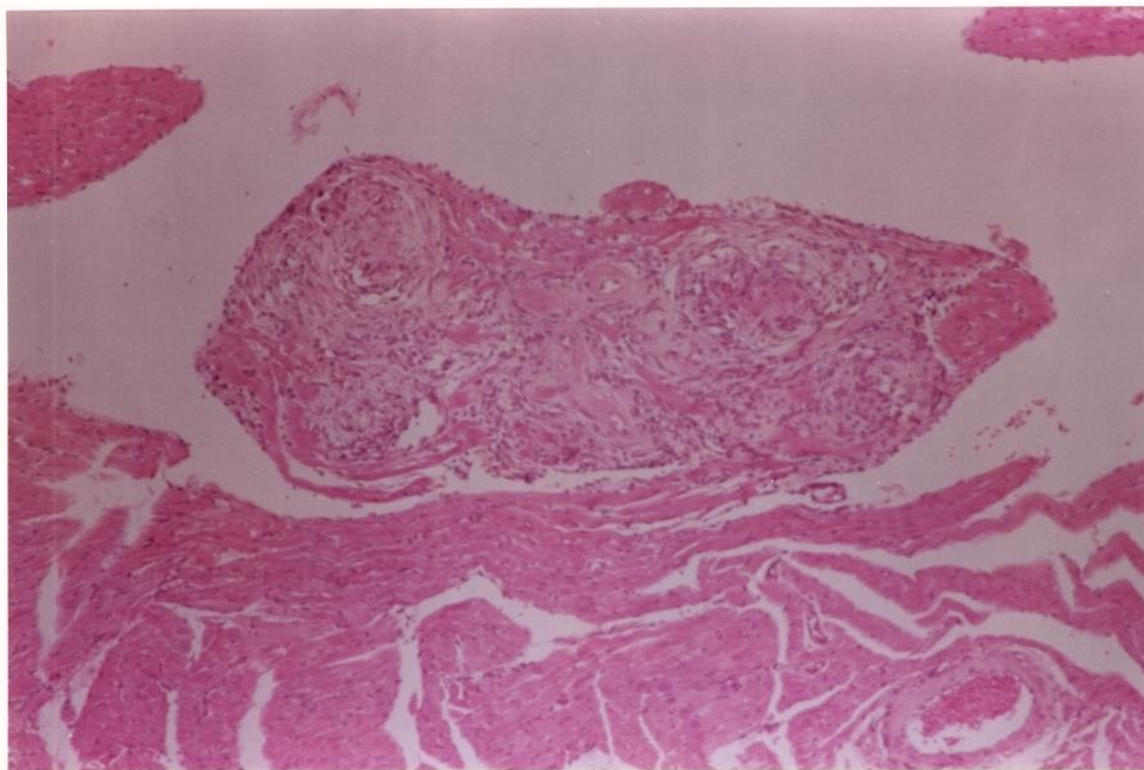


Figura 6b. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME após 8 semanas de estudo. Área de fibrose subendocárdica intensa e alterações vasculares características. Coloração HE, 10x.

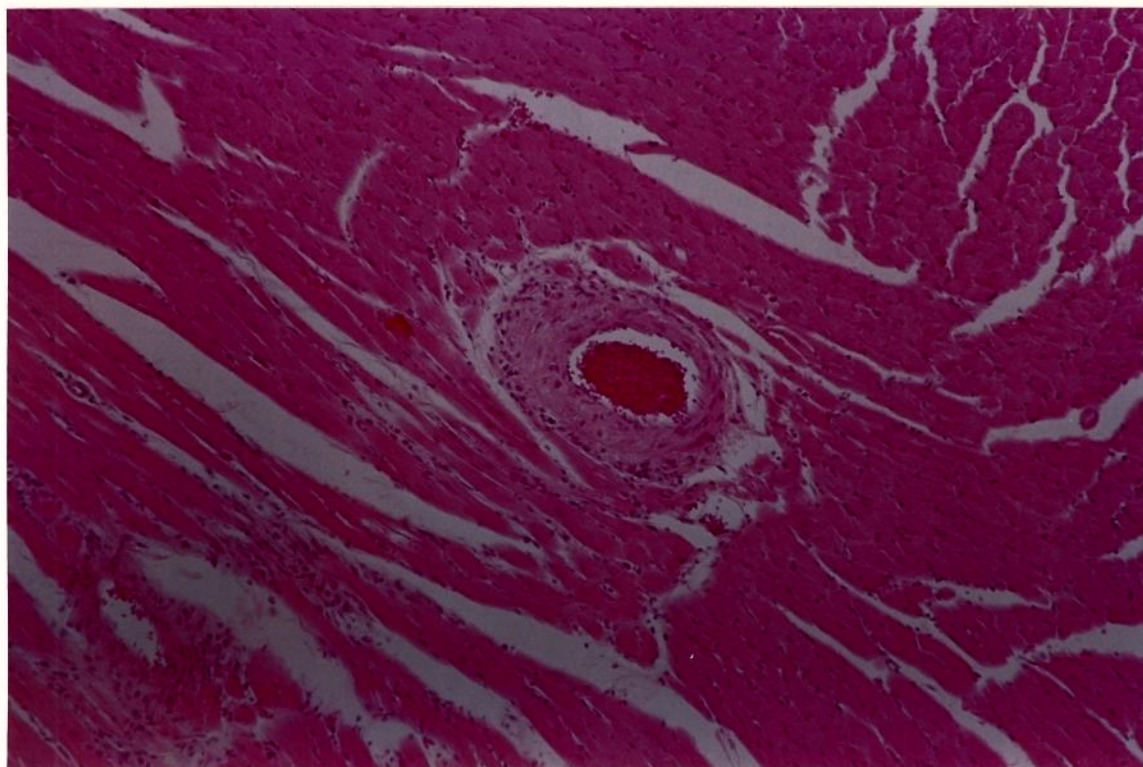


Figura 7a. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado com L-NAME por 8 semanas. Hipertrofia discreta da túnica média de uma artéria. Coloração HE, 10x.

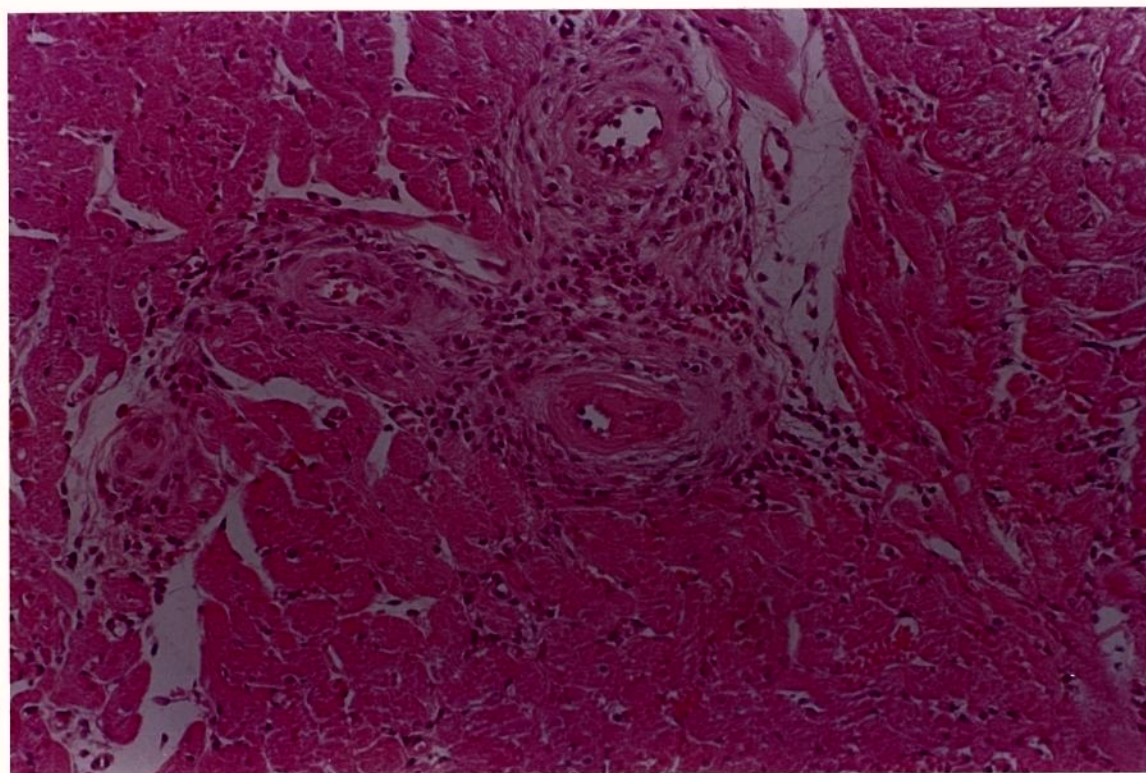


Figura 7b. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado com L-NAME por 8 semanas. Fibrose perivascular intensa e espessamento da parede de arteríolas. Coloração HE, 20x.

2.4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram que a inibição crônica da biosíntese de NO induzida por L-NAME causa alterações miocárdicas tais como fibrose intersticial e necrose subendocárdica semelhantes àsquelas encontradas em pacientes portadores de hipertensão arterial. Em humanos, estas alterações são, provavelmente, resultantes de aumento de consumo de oxigênio pelo miocárdio com ou sem hipertrofia de fibras. É interessante notar que, embora a pressão arterial tenha aumentado de forma semelhante nos 3 grupos de animais hipertensos, os ratos tratados com L-NAME mostraram lesões cardíacas mais severas e extensas, indicando que não apenas os níveis de pressão arterial devem ser responsáveis pelas mesmas. Estas alterações parecem estar relacionadas com a inibição da síntese de NO, posto que os ratos tratados com o enantiômero inativo D-NAME não apresentaram alterações histológicas semelhantes. Por outro lado, tem sido descrita necrose focal na camada média de vasos intramiocárdicos em ratos hipertensos, após a administração de drogas vasoativas (CARLTON & ENGELHARDT, 1991; KERNS *et al.*, 1991). Embora lesões vasculares semelhantes tenham sido encontradas ocasionalmente, tanto nos grupos que receberam L-NAME quanto nos ratos 2K1C, as mesmas não poderiam explicar o dano miocárdico severo observado. Assim, nossos dados apontam a diminuição crítica do fluxo coronariano, especialmente nas regiões subendocárdicas, como causa das alterações supracitadas nos animais tratados com L-NAME. A ausência de hipertrofia cardíaca nos ratos com inibição da síntese de NO após duas e quatro semanas, apesar de confirmar o achado de outros autores (ARNAL *et al.*, 1992), não pode ser utilizada como argumento para reforçar a importância do NO na gênese das lesões. Os estudos até o momento realizados neste modelo de hipertensão arterial (ARNAL *et al.*, 1992; ARNAL *et al.*, 1993; JOVER *et al.*, 1993), inclusive o presente, utilizam apenas a pesagem do coração e do VE para avaliação da hipertrofia cardíaca, não sendo correta portanto, a afirmação de ausência de

HVE, pois ocorre concomitantemente perda de massa resultante de isquemia e necrose miocárdicas. Estudos com histometria das fibras miocárdicas poderão melhor esclarecer a participação da hipertrofia cardíaca na gênese das lesões isquêmicas no coração.

Em humanos, conjuntamente com a idade, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) representa o mais importante fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovasculares (KOREN *et al.*, 1991), fato atribuído à redução da reserva coronariana associada à HVE (HULTGREN & BOYE, 1978; GASCHO *et al.*, 1982). Além da participação de fatores responsáveis pelo crescimento dos miócitos, o fenômeno de hipertrofia cardíaca envolve o remodelamento do compartimento não-miocítico, este inclusive com mecanismo regulatório distinto (SEN and BUPUS, 1979; RUSKOAHO & SAVOLAINEN, 1985; WEBER *et al.*, 1987; WEBER, 1989). Por exemplo, no modelo experimental de hipertensão arterial Goldblatt II (2K1C), fatores hemodinâmicos do ventrículo determinam a hipertrofia miocárdica, enquanto a elevação de angiotensina II circulante é responsável pelo remodelamento do compartimento não-miocítico (WEBER *et al.*, 1990). No modelo de hipertensão arterial DOCA (acetato de desoxicorticosterona) -SAL, os níveis de renina plasmática estão muito baixos, indicando que o sistema renina angiotensina não tem participação importante no desenvolvimento de HVE (GAVRAS *et al.*, 1975). No modelo de inibição crônica da síntese de NO, têm sido relatados níveis normais ou baixos de atividade de renina plasmática nas primeiras semanas de administração de L-NAME (ARNAL *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992), enquanto observações feitas após 4 semanas de tratamento revelam níveis elevados de atividade de renina plasmática (RIBEIRO *et al.*, 1992; MORTON *et al.*, 1993; FUJIHARA *et al.*, 1994). Em contraste, o modelo 2K1C é caracterizado pelo precoce desenvolvimento de hiperreninemia e HVE (CARRETERO & GULATI, 1978). Em conjunto, estes resultados sugerem a existência de correlação entre a atividade do sistema renina angiotensina e o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, tanto na hipertensão arterial induzida por inibição da síntese de NO como nos

outros modelos citados. Deve-se ressaltar a presença de HVE no grupo L-NAME após oito semanas de estudo quando a atividade de renina plasmática neste modelo de hipertensão é elevada (RIBEIRO *et al.*, 1992; SIGMON and BEIERWALTES, 1993). Estes achados sugerem uma correlação entre a atividade do sistema renina angiotensina e o desenvolvimento de HVE na hipertensão induzida pela inibição crônica da síntese de NO.

Não houve diferenças significantes nos níveis de pressão arterial entre os três grupos de animais hipertensos até a sexta semana do estudo quando o grupo 2K1C passou a apresentar medidas de PAC significativamente maiores que os grupos L-NAME e 2K1C+L-NAME. A não elevação tardia da PAC nestes últimos grupos pode refletir o desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda com diminuição do débito cardíaco (Jover *et al.*, 1993). Nossos achados reforçam esta hipótese, pois observamos uma menor capacidade de desenvolvimento de pressão intraventricular, ou seja, contratilidade prejudicada, dos corações isolados dos animais tratados com L-NAME, quando comparados com os dos animais CONTROLE. Sem dúvida esta condição de desempenho cardíaco prejudicado deva ser agravada *in vivo*, com pós-carga e consumo miocárdico de oxigênio aumentados. A menor resposta da variação da pressão desenvolvida à estimulação por noradrenalina do grupo L-NAME também pode indiretamente sugerir esse déficit contrátil, embora outros fatores ligados à expressão do receptor e à transdução do sinal para o interior da célula possam ser responsáveis por este achado, inclusive na ausência de disfunção contrátil. Estudos agudos em ratos, com infusões de L-NAME mostram deterioração do débito cardíaco relacionada com aumento da pós-carga (GARDINER *et al.*, 1990) e com redução da perfusão coronariana com conseqüente prejuízo da função contrátil do ventrículo esquerdo (AMRANI *et al.*, 1992). Também a administração oral de L-NAME por 25 dias causa uma queda de 25 % no débito cardíaco devida a uma diminuição no volume sistólico (JOVER *et al.*, 1993). Nossos dados são indicativos de uma redução de fluxo coronariano no grupo L-NAME causando a disfunção contrátil do VE, conclusão semelhante à descrita

por outros autores, com método de avaliação semelhante ao por nós utilizado (AMRANI *et al.*, 1992). Assim, a superposição de dois mecanismos de isquemia miocárdica, o consumo de oxigênio aumentado pelo miocárdio hipertrofiado e a diminuição do fluxo coronariano associada à vasoconstrição por L-NAME, pode ter sido o fator determinante do grau de comprometimento do débito cardíaco nas últimas semanas do estudo. Tal disfunção pode ter como substrato anátomo-patológico principal as extensas áreas de fibrose intersticial e as lesões miocárdicas encontradas nos corações dos grupos que receberam L-NAME. A redução do fluxo coronariano à estimulação pela NORA observada nos corações do grupo L-NAME, paradoxal aos aumentos de cronotropismo e inotropismo cardíacos, poderia sugerir um distúrbio da auto-regulação da circulação coronariana. Apesar de bastante atraente esta hipótese, nossos dados não permitem aceitá-la como verdadeira, posto que os corações dos animais do grupo CONTROLE apresentaram comportamento da FC, do ϕ Cor e da Δ PD similar aos dos animais L-NAME. Talvez a dose de NORA (0.1 mM) administrada nos experimentos, embora farmacologicamente correta, seja do ponto de vista fisiológico elevada, causando assim efeitos inespecíficos sobre o coração.

Outro aspecto a ser abordado é a possibilidade de toxicidade direta de inibidores da síntese de NO sobre as fibras miocárdicas como causa para o pior desempenho contrátil dos corações dos animais tratados com L-NAME. A hipótese não encontra respaldo em estudo de outros autores (AMRANI *et al.*, 1992) no qual a L-N^o-monometilarginina (L-NMMA) não causou alteração na contratilidade de cardiomiócitos isolados.

A fibrose pode ocorrer tanto em ventrículos hipertrofiados por aumento do trabalho cardíaco quanto em ventrículos não-hipertrofiados com trabalho normal, indicando que a regulação da síntese do tecido fibroso é distinta daquela que modula o crescimento miocárdico (WEBER *et al.*, 1990). Neste modelo de hipertensão arterial, observamos fibrose em ventrículos não-

hipertrofiados associada a uma redução do débito cardíaco, como descrito por outros autores (JOVER *et al.*, 1993), como resultado de isquemia miocárdica. As lesões isquêmicas são semelhantes às aquelas encontradas nos rins neste mesmo modelo (RIBEIRO *et al.*, 1992). Este modelo pode representar a situação clínica na qual cardiomiopatias são classificadas como idiopáticas (sem diagnóstico de hipertensão ou outras causas de comprometimento miocárdico), quando, na realidade, refletiriam o comprometimento cardíaco secundário à disfunção endotelial crônica de etiologia não aparente. Nossas observações podem também explicar melhor o comprometimento cardíaco em doenças como o *diabetes mellitus* e a hipertensão arterial (FEIN *et al.*, 1989; VANHOUTTE & SHIMOKAWA, 1989), nas quais a disfunção endotelial pode ser causa do mesmo, independentemente da presença de doença coronariana aterosclerótica.

2.5. CONCLUSÕES

A inibição crônica da síntese de NO causa redução do fluxo coronariano, levando a isquemia miocárdica com necrose de miofibrilas e fibrose intersticial. Estas lesões podem representar o substrato morfológico para a contratilidade miocárdica diminuída neste modelo experimental de hipertensão arterial.

Este modelo consiste em importante ferramenta para o aprofundamento na melhor compreensão do comprometimento cardíaco em condições nas quais supõe-se haver uma disfunção endotelial associada (*diabetes mellitus*, hipertensão, tabagismo, etc) ou outras, tidas como idiopáticas (cardiomiopatias, síndrome X, etc).

3.

***INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA E SEUS EFEITOS
SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS
INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO CRÔNICA
DE ÓXIDO NÍTRICO***

3.1. INTRODUÇÃO

A inibição crônica da síntese de óxido nítrico, em ratos, causa hipertensão arterial acompanhada de alterações funcionais e lesões estruturais nos rins (BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992). Estas alterações renais e os níveis de pressão arterial elevados são parcialmente prevenidos pela administração do antagonista de angiotensina II, losartan potássico (RIBEIRO *et al.*, 1992; FUJIHARA *et al.*, 1994). Nossos resultados expostos anteriormente mostram que a hipertrofia ventricular esquerda neste modelo é detectável apenas a partir de 8 semanas de inibição da síntese de NO. Isto sugere uma associação com uma elevação da atividade da renina plasmática também tardia na hipertensão induzida por L-NAME, observada por outros autores (RIBEIRO *et al.*, 1992). Além disso, as observações de que a angiotensina II causa necrose em miócitos e de que captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, previne o surgimento dessas lesões no modelo renovascular (TAN *et al.*, 1991), reforçam a hipótese da participação do sistema renina angiotensina na gênese das alterações morfológicas e funcionais cardíacas induzidas pela inibição crônica de óxido nítrico.

O objetivo deste estudo é avaliar o impacto da inibição do sistema renina angiotensina pelo maleato de enalapril sobre a hipertrofia ventricular esquerda, as alterações funcionais cardíacas e as lesões isquêmicas no miocárdio de ratos tratados cronicamente com L-NAME.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Grupos experimentais

Ratos Wistar machos provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 150 e 200 gramas, quando do início do estudo foram divididos nos seguintes grupos: (1) CONTROLE (n=10): ratos que receberam somente água tépida; (2) L-NAME (n=8): ratos que receberam N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 65 mg/kg/dia; BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992); (3) L-NAME+ENAL (n=12): ratos que receberam L-NAME e maleato de enalapril (65 and 25 mg/kg/dia, respectivamente); (4) ENAL (n=12): ratos que receberam maleato de enalapril (25 mg/kg/dia; CHILDS *et al.*, 1990). L-NAME e maleato de enalapril foram dissolvidos na água ingerida pelos animais. As condições do biotério e cuidados com os animais (balanço hídrico, alimentação, disposição nas gaiolas etc) foram as mesmas já descritas anteriormente. Os animais foram sacrificados após 8 semanas de tratamento.

3.2.2. Peso corporal (PCorp) e pressão arterial de cauda (PAC)

Previamente ao estudo, e durante 8 semanas após o início do mesmo, os animais eram pesados duas vezes por semana, utilizando-se balança Ohaus (Union N.J., USA). Nos mesmos dias, a pressão arterial de cauda era avaliada utilizando-se o método já descrito anteriormente.

3.2.3. Avaliação funcional (coração isolado, preparação de Langendorff)

Ao término da 8ª semana, animais dos grupos CONTROLE (n=9) e L-NAME (n=8), ENALAP (n=5) e L-NAME+ENALAP (n=6) tiveram seus corações isolados e avaliados pela preparação de Langendorff, conforme procedimento descrito às páginas 39 a 41.

Parâmetros avaliados

Avaliamos os mesmos parâmetros, descritos detalhadamente às páginas 42 a 43 e listados a seguir:

- PSVE e PDFVE, mmHg.
- Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PD, mmHg):

$$PD = PSVE - PDFVE$$

- Relação pressão desenvolvida/peso ventricular esquerdo (PD/PVE, mmHg/g).

- Frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm).

- Fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min).

- Variação da pressão desenvolvida (Δ PD, mmHg) à estimulação com noradrenalina 0,1 μ g:

$$\Delta PD = (PSVE-PDFVE)_{\text{pós-NORA}} - (PSVE-PDFVE)_{\text{pré-NORA}}$$

- Relação variação de pressão desenvolvida / peso ventricular esquerdo (Δ PD / PVE, mmHg/g).

3.2.4. Determinação da massa miocárdica

Os animais eram sacrificados sob anestesia com éter. Os procedimentos de remoção do coração do tórax e de determinação do peso cardíaco total (PCTotal, g) e do peso ventricular esquerdo (PVE, g), bem como destes valores normalizados para o peso corporal (PCRelat, mg/g e PVERelat, mg/g) já foram descritos à página 44.

3.2.5. Avaliação histológica

Após a determinação dos pesos cardíacos, o ventrículo esquerdo era imerso em solução de formalina a 10% por 24 horas, sendo após incluído em parafina, cortado perpendicularmente ao seu maior eixo em 5 níveis equidistantes em secções de 5 μm , as quais eram coradas com hematoxilina-eosina para estudo sob microscopia ótica. Os ventrículos eram considerados positivos quando uma pequena ou extensa área de necrose e/ou fibrose miocárdica era encontrada. Os resultados positivos eram, então, classificados de acordo com os critérios (FACTOR et al., 1981) já expostos anteriormente: (+) fracamente positivo: um ou dois pequenos focos de necrose e/ou fibrose, com diâmetro menor que 500 μm em uma dimensão; (++) moderadamente positivo: Mais que dois focos de necrose e/ou fibrose, com diâmetro menor que 500 μm em uma dimensão, sem confluência; (+++) fortemente positivo: focos confluentes de necrose e/ou fibrose, com diâmetro maior que 500 μm em uma dimensão ou infartos extensos.

3.2.6. Drogas e procedência

N^o-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foi adquirido de Sigma (U.S.A.).

Maleato de Enalapril foi fornecido por Biosintética Laboratórios (Brasil)

3.2.7. Análise estatística

Os resultados são mostrados sob a forma de média $\pm$ desvio-padrão da média. Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das distribuições dos valores ou a variabilidade das medidas efetuadas. A escolha dos testes utilizados neste estudo seguiu os mesmos critérios descritos na secção anterior (páginas 46 a 48).

Em todos os testes fixou-se em 5% (erro $\alpha < 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com os seguintes símbolos (*, **, †, §) os valores significantes.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Peso corporal e pressão arterial de cauda

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de peso corporal dos grupos CONTROLE, L-NAME, ENAL and L-NAME+ENAL ao final do estudo (Tabela 8). O grupo L-NAME apresentou aumento progressivo da PAC até a 6ª semana, após o que os níveis de pressão mantiveram-se estáveis (Figura 8). O tratamento com Enalapril preveniu a hipertensão arterial no grupo L-NAME+ENAL após a 2ª semana de estudo (Figura 8). Enalapril administrado isoladamente reduziu significativamente a PAC após a segunda semana de tratamento (Figura 8).

Tabela 8. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal, expressos em gramas, dos quatro grupos experimentais durante o período de estudo.

Grupos	Basal	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
CONTROLE	197 $\pm$ 10	260 $\pm$ 10	280 $\pm$ 8	319 $\pm$ 8	335 $\pm$ 14
L-NAME	196 $\pm$ 10	262 $\pm$ 21	279 $\pm$ 19	300 $\pm$ 38	339 $\pm$ 32
ENAL	200 $\pm$ 16	243 $\pm$ 12	270 $\pm$ 15	284 $\pm$ 17	318 $\pm$ 19
L-NAME+ENAL	190 $\pm$ 13	223 $\pm$ 12	256 $\pm$ 16	267 $\pm$ 18	319 $\pm$ 19

Análise de variância para medidas repetidas (intra-grupo)

CONTROLE: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2ª semana = 4ª semana < 8ª semana;

L-NAME: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2ª semana = 4ª semana < 8ª semana;

ENAL: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2ª semana < 4ª semana < 8ª semana;

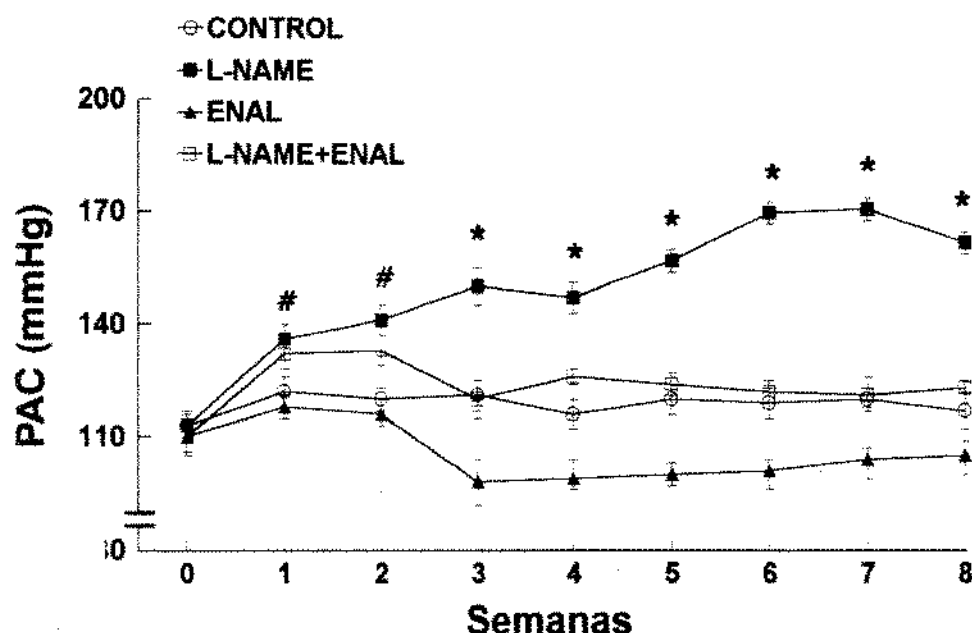
L-NAME+ENAL: $p < 0,05$; Duncan: Basal < 2ª semana < 4ª semana < 8ª semana.

Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

Basal: $p > 0,05$; CONTROLE = L-NAME = ENAL = L-NAME+ENAL;

8ª semana: $p > 0,05$; CONTROLE = L-NAME = ENAL = L-NAME+ENAL.

Figura 8. Curva dos valores médios + desvios-padrão da pressão arterial de cauda, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), dos 4 grupos experimentais durante as 8 semanas de estudo.



Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

* $p < 0,05$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL > ENAL;

* $p < 0,05$; L-NAME = L-NAME+ENAL > CONTROLE = ENAL.

Análise de variância para medidas repetidas (intra-grupos)

CONTROLE: $p > 0,05$;

L-NAME: $p < 0,000001$, $F = 12,5484$; Duncan: Basal < 2ª semana < 4ª semana < 6ª semana = 6ª semana;

ENAL: $p < 0,00001$, $F = 13,3241$; Duncan: Basal = 2ª semana > 4ª semana > 6ª semana = 8ª semana;

L-NAME+ENAL: $p < 0,0001$, $F = 5,1423$; Duncan: 1ª semana = 2ª semana > Basal = 3ª semana = 4ª semana = 5ª semana = 6ª semana = 7ª semana = 8ª semana.

3.3.2. Avaliação funcional do coração isolado

Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

Os valores médios de pressão sistólica (PSVE, mmHg) e diastólica do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após administração de noradrenalina 0.1µg, estão expostos na tabela 9. A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) foi maior no grupo L-NAME (111±6 mmHg) do que nos demais grupos experimentais, entre os quais a mesma não diferiu (CONTROLE= 96±5, ENAL= 91±4, L-NAME+ENAL= 100±4 mmHg). Não houve diferenças estatisticamente significantes na PDFVE dos 4 grupos experimentais.

Em valores absolutos, os grupos que receberam L-NAME (L-NAME e L-NAME+ENAL) mostraram maior capacidade de desenvolvimento de pressão intra-ventricular em relação aos grupos CONTROLE e ENAL (Tabela 10). Entretanto, a análise destes valores, quando normalizados para o PVE, mostrou que o grupo L-NAME apresentou capacidade de desenvolvimento de pressão menor que a do grupo CONTROLE (151±10 e 162±6 mmHg/g, respectivamente; $p<0.001$), sendo a mesma no grupo L-NAME+ENAL semelhante à observada no CONTROLE (165±8 e 162±9 mmHg/g, respectivamente) (Tabela 10). O grupo ENAL (151±13 mmHg/g) também apresentou desenvolvimento de pressão menor que o CONTROLE, com valor semelhante ao grupo L-NAME. Apenas o grupo L-NAME teve PVE significativamente maior que o grupo CONTROLE (0,705±0,015 e 0,565±0,036, respectivamente; $p<0,00001$) (Tabela 10).

Resposta da pressão intra-ventricular à administração de noradrenalina 0,1 µg

Após a administração de noradrenalina 0,1 µg, as pressões sistólicas dos 4 grupos experimentais elevaram-se significativamente (CONTROLE, de 96±5 para 112±5 mmHg; L-NAME, de 111±6 para 124±5 mmHg; ENAL, de 91±4 para 105±3 mmHg; L-NAME+ENAL, de 100±4 para 113±5 mmHg) (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA), nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)		L-NAME (n=7)		ENAL (n=5)		L-NAME+ENAL (n=6)	
	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA
PSVE (mmHg)	96 $\pm$ 5	112 $\pm$ 5	111 $\pm$ 6*	124 $\pm$ 5	91 $\pm$ 4	105 $\pm$ 3	100 $\pm$ 4	113 $\pm$ 5
PDFVE (mmHg)	5,2 $\pm$ 2,0	6,5 $\pm$ 1,7	3,5 $\pm$ 2,7	4,7 $\pm$ 1,4	3,6 $\pm$ 1,2	4,4 $\pm$ 1,6	3,3 $\pm$ 1,6	4,3 $\pm$ 1,4

Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE)

1) Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

* $p < 0,000001$; pré-NORA: L-NAME > CONTROLE = ENAL = L-NAME+ENAL;
F= 25,4698; graus de liberdade= 3.

2) Teste "t" de Student pareado

CONTROLE: pré vs pós- NORA: $p < 0,0001$; $t=7,4592$; graus de liberdade=7;

L-NAME: pré vs pós- NORA: $p < 0,001$; $t= 5,2350$; graus de liberdade=6;

ENAL: pré vs pós- NORA: $p < 0,001$; $t= 4,9697$; graus de liberdade=4;

L-NAME+ENAL: pré vs pós- NORA: $p < 0,001$; $t= 5,0627$; graus de liberdade=5

A variação da pressão desenvolvida (ΔPD) após a administração de noradrenalina 0,1 μg , foi significativamente menor no grupo L-NAME que nos demais grupos, somente quando os valores absolutos foram para o peso ventricular esquerdo (L-NAME= $17,3 \pm 5,7$; CONTROLE= $28,8 \pm 5,9$; ENAL= $23,6 \pm 5,0$ e L-NAME+ENAL= $22,0 \pm 4,6$ mmHg/g; $p < 0,05$) (Tabela 10).

Não observamos diferenças significantes na PDFVE após a administração de noradrenalina 0,1 μ entre os 4 grupos experimentais (Tabela 9)

Frequência cardíaca

Todos os grupos apresentaram resposta cronotrópica positiva à estimulação pela noradrenalina 0,1 μg (CONTROLE, de 382 ± 14 para 417 ± 12 mmHg; L-NAME, de 398 ± 19 para 430 ± 10 mmHg; ENAL, de 383 ± 10 para 418 ± 13 mmHg; L-NAME+ENAL, de 403 ± 15 para 425 ± 10 mmHg) (Tabela 12). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores pré- e pós-NORA 0,1 entre os 4 grupos experimentais (Tabela 12).

Fluxo coronariano

Os animais que receberam L-NAME (L-NAME, $12,2 \pm 1,2$; L-NAME+ENAL, $11,7 \pm 1,3$ ml/min) apresentaram fluxo coronariano (ϕCor) diminuído em relação ao grupo CONTROLE ($14,0 \pm 1,4$ ml/min) e ao grupo ENAL ($14,7 \pm 1,0$ ml/min) em condições basais (Tabela 12). A normalização dos valores de ϕCor para o peso do VE (PVE) confirmou, tornando até mais evidentes, as diferenças do ϕCor entre os grupos estudados (CONTROLE= $24,8 \pm 1,9$, L-NAME= $17,2 \pm 1,7$, ENAL= $25,4 \pm 3,0$ e L-NAME+ENAL= $20,1 \pm 2,7$ ml/min/g; $p < 0,001$). A administração de noradrenalina 0,1 μg reduziu o fluxo coronariano proporcionalmente nos 4 grupos experimentais (CONTROLE, de $14,0 \pm 1,4$ para $11,6 \pm 0,9$ ml/min; L-NAME, de $12,2 \pm 1,2$ para $9,5 \pm 1,4$ ml/min; ENAL, de $14,7 \pm 1,0$

para $12,2 \pm 0,8$ ml/min; L-NAME+ENAL, de $11,7 \pm 1,3$ para $9,0 \pm 1,0$ ml/min) (Tabela 12).

3.3.3. Pesos cardíacos

O grupo L-NAME apresentou PCTotal e PVE maiores que o demais grupos experimentais (Tabela 13). O tratamento crônico com L-NAME também aumentou significativamente o PCRelat em relação ao CONTROLE ($2,12 \pm 0,19$ e $1,89 \pm 0,04$ mg/g, respectivamente; $p < 0,000001$) e aos demais grupos (L-NAME+ENAL= $1,84 \pm 0,06$ e ENAL= $1,89 \pm 0,08$ mg/g; $p < 0,000001$) (Tabela 13). Da mesma forma, o PVERelat foi significativamente maior no grupo L-NAME ($1,60 \pm 0,18$ mg/g) que nos grupos CONTROLE ($1,36 \pm 0,05$ mg/g), L-NAME+ENAL ($1,48 \pm 0,06$ mg/g) e ENAL ($1,50 \pm 0,08$ mg/g) (Tabela 13). Estes dados demonstram a presença de hipertrofia ventricular esquerda apenas no grupo L-NAME, isto é, a administração de maleato de enalapril impediu o desenvolvimento de HVE no grupo L-NAME+ENAL (Figura 9).

3.3.4- Alterações miocárdicas

Nos grupos CONTROLE e ENAL, nenhum coração foi classificado como positivo (Tabela 14). Os animais tratados com L-NAME desenvolveram alterações miocárdicas as quais não foram prevenidas pelo tratamento simultâneo com maleato de enalapril (Tabela 14). As lesões não diferiram das lesões induzidas por L-NAME, descritas anteriormente. Consistiam, principalmente, de fibrose intersticial reparativa com focos de necrose fresca no miocárdio, com acometimento preferencial das regiões subendocárdicas do VE. As alterações vasculares (espessamento da parede com fibrose peri-vascular e focos de necrose fibrinóide da camada média) foram encontradas tanto no grupo L-NAME quanto no grupo L-NAME+ENAL.

Tabela 10. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão desenvolvida (PD= PSVE-PDFVE, mmHg) pelo ventrículo esquerdo e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/PVE, mmHg/g) nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)	L-NAME (n=7)	ENAL (n=5)	L-NAME+ENAL (n=6)
PD (mmHg)	91 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6*	87 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5*
PVE (g)	0,565 $\pm$ 0,038	0,705 $\pm$ 0,019*	0,579 $\pm$ 0,032	0,583 $\pm$ 0,023
PD/ PVE (mmHg/g)	162 $\pm$ 9	151 $\pm$ 5**	151 $\pm$ 13**	165 $\pm$ 8

Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

1- Pressão desenvolvida (PD)

* $p < 0,000001$; L-NAME > L-NAME+ENAL > CONTROLE = ENAL;

F= 29,7085; graus de liberdade= 3.

2- Peso ventricular esquerdo (PVE)

* $p < 0,000001$; L-NAME > CONTROLE = ENAL = L-NAME+ENAL;

F= 34,3883; graus de liberdade= 3.

Teste de Kruskal-Wallis

1- Pressão desenvolvida / peso ventricular esquerdo (PD/PVE)

** $p < 0,05$; CONTROLE = LNAME+ENAL > L-NAME = ENAL;

H= 11,0664; graus de liberdade= 3.

Tabela 11. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Δ PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (Δ PD/ PVE, mmHg/g), após a administração de noradrenalina 0,1 μ g, ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)	L-NAME (n=7)	ENAL (n=5)	L-NAME+ENAL (n=6)
ΔPD (mmHg)	16,3 $\pm$ 3,0	12,3 $\pm$ 4,0	13,8 $\pm$ 3	12,8 $\pm$ 3
PVE (g)	0,565 $\pm$ 0,038	0,705 $\pm$ 0,019*	0,579 $\pm$ 0,032	0,583 $\pm$ 0,023
ΔPD/ PVE (mmHg/g)	28,8 $\pm$ 5,9	17,3 $\pm$ 5,7**	23,6 $\pm$ 5,0	22,0 $\pm$ 4,6

Variação da pressão desenvolvida (Δ PD)

1) Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

CONTROLE vs L-NAME vs ENAL vs L-NAME+ENAL: $p > 0,05$

F= 2,1633; graus de liberdade= 3.

Peso ventricular esquerdo (PVE)

1) Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

* $p < 0,000001$; L-NAME > CONTROLE = ENAL = L-NAME+ENAL;

F= 34,3883; graus de liberdade= 3.

Pressão desenvolvida / peso ventricular esquerdo (PD/PVE)

1) Teste de Kruskal-Wallis

** $p < 0,05$; CONTROLE = LNAME+ENAL = ENAL > L-NAME;

H= 8,4205; graus de liberdade= 3.

Tabela 12. Valores médios $\pm$ desvios-padrão da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm) e do fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA 0,1), nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	FC (bpm)		ϕ Cor (ml/min)	
	pré-NORA 0,1	pós-NORA 0,1	pré-NORA 0,1	pós-NORA 0,1
CONTROLE	382 $\pm$ 14	417 $\pm$ 12*	14,0 $\pm$ 1,4	11,6 $\pm$ 0,9
L-NAME	398 $\pm$ 19	430 $\pm$ 10*	12,2 $\pm$ 1,2**	9,5 $\pm$ 1,4
ENAL	383 $\pm$ 10	418 $\pm$ 13*	14,7 $\pm$ 1,0	12,2 $\pm$ 0,8
L-NAME+ENAL	403 $\pm$ 15	425 $\pm$ 10*	11,7 $\pm$ 1,3**	9,0 $\pm$ 1,0

Frequência cardíaca (FC)

1) Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

CONTROLE vs L-NAME vs ENAL vs L-NAME+ENAL: $p > 0,05$ (pré-NORA 0,1 μ g); $F = 3,0914$; graus de liberdade= 3.

2) Teste "t" de Student pareado

* $p < 0,01$, pré vs pós-NORA, para CONTROLE ($t = 8,6338$; g.l.=7), L-NAME ($t = 3,9720$; g.l.=6), ENAL ($t = 6,5202$; g.l.=4) e L-NAME+ENAL ($t = 5,5351$; g.l.=5)

Fluxo coronariano (ϕ Cor)

1) Análise de variância para amostras independentes (inter-grupos)

** $p < 0,01$; CONTROLE = ENAL > L-NAME = L-NAME + ENAL;

$F = 7,4049$; graus de liberdade= 3.

2) Teste "t" de Student pareado

* $p < 0,01$, pré vs pós-NORA, para CONTROLE ($t = 5,6448$; g.l.=7), L-NAME ($t = 7,7914$; g.l.=6), ENAL ($t = 6,7055$; g.l.=4) e L-NAME+ENAL ($t = 5,9464$; g.l.=5)

Tabela 13. Valores médios $\pm$ desvios-padrão do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT), do peso cardíaco relativo (PCRelat), do peso ventricular esquerdo (PVE) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em gramas, dos quatro grupos experimentais na 8ª semanas de estudo.

	PCorp (g)	PCT (mg)	PCRelat (mg/g)	PVE (mg)	PVERelat (mg/g)
CONTROLE	335 $\pm$ 13	631 $\pm$ 18	1,89 $\pm$ 0,04	458 $\pm$ 19	1,36 $\pm$ 0,05
L-NAME	339 $\pm$ 32	715 $\pm$ 46	2,12 $\pm$ 0,19	538 $\pm$ 37	1,60 $\pm$ 0,18
L-NAME+ENAL	319 $\pm$ 19	586 $\pm$ 29	1,84 $\pm$ 0,06	475 $\pm$ 37	1,48 $\pm$ 0,06
ENAL	318 $\pm$ 13	599 $\pm$ 19	1,89 $\pm$ 0,08	479 $\pm$ 19	1,50 $\pm$ 0,08

Análise de variância para amostras independentes dos valores de Pcorp, PCT e PVE ao final do estudo.

PCorp: $p > 0,05$; CONTROLE = L-NAME = L-NAME+ENAL = ENAL; $F = 3,1087$; g.l.= 3;

PCT: $p < 0,000001$; L-NAME > CONTROLE > L-NAME+ENAL = ENAL; $F = 37,5691$; g.l.=3;

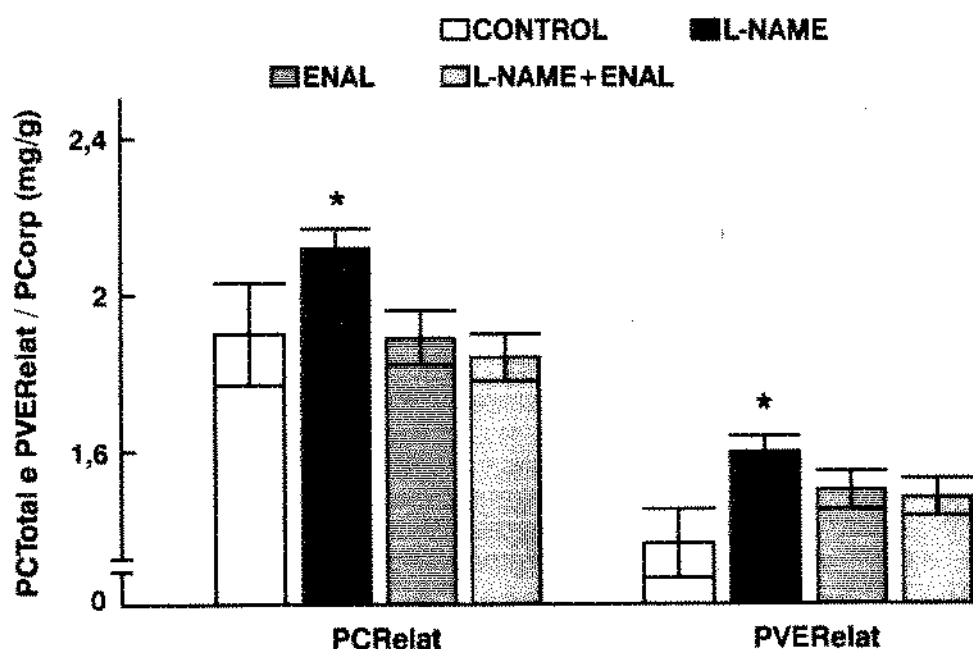
PVE: $p < 0,000001$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL = ENAL; $F = 12,8790$; g.l.=3;

Teste de Kruskal-Wallis

PCRelat: $p < 0,005$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL = ENAL; $H = 16,9151$; g.l.=3;

PVERelat: $p < 0,001$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL = ENAL; $H = 17,0209$; g.l.=3.

Figura 9. Efeitos da administração de maleato de enalapril sobre o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) e o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) ao final de 8 semanas de inibição da síntese de óxido nítrico por L-NAME. As barras representam os valores médios $\pm$ SD.



* $p < 0,001$ vs CONTROLE;

Teste de Kruskal-Wallis

PCRelat: $p < 0,005$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL = ENAL;

H= 16,9151; g.l.=3;

PVERelat: $p < 0,001$; L-NAME > CONTROLE = L-NAME+ENAL = ENAL;

H= 17,0209; g.l.=3.

Tabela 14. Classificação histológica das alterações miocárdicas nos 4 grupos experimentais após 8 semanas de tratamento com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

GRUPOS	Alterações miocárdicas			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
CONTROLE (n=11)	11	0	0	0
L-NAME (n=8)	4	2	0	2
L-NAME+ENALAP (n=9)	5	2	0	2
ENAL (n=12)	9	0	0	0

Crítérios para classificação: (-), ausentes; (+), fracamente positivo; ++, moderadamente positivo; +++, fortemente positivo.

1) Teste exato de Fisher

$p > 0,05$; L-NAME = L-NAME+ENALAP.

3.4 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram claramente que, embora a administração de enalapril tenha prevenido o desenvolvimento tanto de hipertensão arterial (HA) quanto de hipertrofia ventricular esquerda (HVE), não evitou o aparecimento de lesões miocárdicas induzidas por L-NAME. Concomitantemente, enalapril também não normalizou o fluxo coronário (ϕ Cor) diminuído por L-NAME, o que reforça a hipótese de que as lesões isquêmicas observadas no miocárdio tenham origem vascular, e não sejam apenas decorrentes de níveis de pressão arterial elevada (pós-carga) e/ou da HVE associada. No entanto, mesmo sem preservar o fluxo coronariano normal e não evitando as lesões isquêmicas, se considerado o desenvolvimento de pressão normalizado para o peso cardíaco como o parâmetro mais fidedigno para avaliar-se capacidade contrátil do coração (SASAYAMA *et al.*, 1976), enalapril impediu a instalação da disfunção contrátil induzida por L-NAME. A resposta à estimulação por agonista adrenérgico (NORA 0,1 μ g) foi normalizada pelo inibidor da enzima conversora de angiotensina, o que pode estar refletindo também um efeito positivo do enalapril sobre a função cardíaca deteriorada pela inibição crônica da síntese de NO. A interpretação deste último parâmetro está sujeita às mesmas críticas discutidas no capítulo anterior.

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) reduzem os níveis de pressão arterial e a massa cardíaca quando utilizados em terapêutica clínica e em modelos de HA experimental (DUNN *et al.*, 1984). No modelo de hipertensão induzida por inibição da síntese de NO, tem se demonstrado que o enalapril previne a hipertensão e a hipertrofia ventricular esquerda (NEMOTO *et al.*, 1994; UEKI *et al.*, 1994). Também o bloqueador de receptores de angiotensina losartan evita a HA e o desenvolvimento de HVE (JOVER *et al.*, 1993), o que demonstra um importante papel da angiotensina II na gênese

destas alterações neste modelo experimental. Estudos farmacológicos e clínicos possibilitaram o conhecimento de que os inibidores da ECA possuem ações adicionais locais, as quais não estão relacionadas a alterações hemodinâmicas e que também não podem ser explicadas simplesmente pela interferência com o sistema renina angiotensina (SRA) e subsequente de inibição da formação de angiotensina II. Como a ECA é idêntica à cininase II, a qual inativa a bradicinina (BK), o acúmulo desta última pode ser responsável por esses efeitos adicionais dos inibidores da ECA. De fato, recentemente, foi observado em ratos com HA induzida por bandagem da aorta, que os inibidores da enzima conversora de angiotensina, ou cininase II, previnem e reverterem a HVE mesmo em dose insuficientes para controle da hipertensão, efeitos estes que são abolidos pela administração de HOE 140, um antagonista de receptores de bradicinina (LINZ *et al.*, 1994). Os autores concluíram ser o acúmulo de cininas derivadas do endotélio com subsequente liberação de NO e prostaciclina o responsável pelos efeitos benéficos do inibidor da ECA utilizado (ramipril) sobre o coração. Por outro lado, outros autores (RHALEB *et al.*, 1994) demonstraram nesse mesmo modelo de HA que somente doses antihipertensivas de ramipril tem efeito sobre a hipertrofia cardíaca, não sendo as cininas as responsáveis pelos efeitos antihipertensivos e antihipertróficos dos inibidores da ECA. Nossos resultados demonstram que o enalapril impede o desenvolvimento de níveis elevados de pressão arterial e de HVE no modelo de HA por inibição crônica de NO, o que a princípio sugere uma hiperatividade do sistema renina angiotensina na instalação dessas alterações, porém a importância relativa da redução de angiotensina e do aumento de cininas pelo inibidor da ECA não pode ser avaliada com base em nossos dados.

Estudos anteriores (LUND & TOMANEK, 1978; BUTTRICK *et al.*, 1986) demonstraram que a hipertrofia ventricular esquerda devida à hipertensão arterial está associada à limitação da reserva coronariana vasodilatadora e que esta situação predispõe ao desenvolvimento de isquemia miocárdica. Curiosamente, a atividade do sistema renina angiotensina aumentada leva ao

desenvolvimento de HVE (WEBER *et al.*, 1991) e a angiotensina II causa lesões agudas em miócitos de ratos (TAN *et al.*, 1991). Embora estes achados indiquem uma estreita relação entre a atividade aumentada do SRA e isquemia miocárdica, a não prevenção de lesões isquêmicas pela administração de enalapril por nós observada indica uma dissociação entre a inibição da ECA ou cininase II e o fenômeno isquêmico neste modelo de inibição crônica da síntese de NO. Além disso, resultados apresentados no capítulo anterior desta tese mostram que, ao final de 8 semanas, ratos com hipertensão renovascular (2K-1C) e induzida por inibição crônica da síntese de NO desenvolveram hipertrofia cardíaca de grau semelhante, porém as lesões isquêmicas miocárdicas constituíram achado infrequente nos primeiros animais ao contrário do observado nos animais tratados com L-NAME. Isto valida para este modelo, conceito prévio de que na hipertensão arterial o processo isquêmico miocárdico não deve estar associado ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (BRUSH *et al.*, 1988). Por outro lado, a não prevenção de isquemia miocárdica pelo enalapril de forma alguma opõe-se à hipótese de que as cininas, promovendo maior liberação de NO e prostaciclina ou mesmo por ação direta própria, teriam participação fundamental na regulação do fluxo coronariano. Apenas reforça a importância fundamental do NO na regulação do fluxo coronariano, pois neste modelo em que a produção do mesmo encontra-se severamente comprometida, tornam-se ineficazes o aumento dos níveis de cininas e/ou a redução da produção de angiotensina II induzidos pelo inibidor da ECA visando a preservação do fluxo coronariano adequado.

Finalmente, além de ratificar a importância do NO na manutenção do tônus vasodilatador a nível de circulação coronariana, nossos achados sugerem a possibilidade da participação do NO no mecanismo de autoregulação do fluxo coronariano, independentemente de outros mecanismos sistêmicos, nervosos ou humorais.

3.5. CONCLUSÕES

Pelo exposto acima, concluímos que dois mecanismos fisiopatológicos distintos podem ser responsáveis pelos achados cardiovasculares descritos neste modelo (capítulo anterior):

- 1- a atividade aumentada do sistema renina angiotensina e/ou a menor produção de cininas relacionada(s) com os níveis de pressão arterial elevados e a HVE;
- 2- a inibição da síntese de NO relacionada com as alterações na circulação coronariana e provavelmente com as lesões miocárdicas encontradas.

4.

Efeitos da inibição aguda da síntese de óxido nítrico sobre a histologia do miocárdio e o fluxo coronariano

4.1. INTRODUÇÃO

Nossos resultados descritos nos capítulos anteriores desta tese apontam o processo isquêmico como maior responsável pela disfunção contrátil no modelo de HA induzida pela inibição crônica da síntese de NO. A avaliação histológica do miocárdio mostrou, associadas a alterações crônicas (densas áreas de fibrose intersticial e alterações vasculares), áreas de necrose miocárdica recentes (escassas), não relacionadas com a presença de HVE, mas associadas a um fluxo coronariano reduzido. Ainda assim, a presença da fibrose maciça poderia refletir um processo proliferativo associado à HA induzida por fatores de crescimento descritos nesta condição, como a angiotensina II (DZAU VJ, 1986; DZAU VJ & GIBBONS GH, 1987) e a aldosterona (CAMPBELL SE *et al.*, 1993), mais que um quadro reparativo à necrose miocárdica. Também o achado de escassas áreas de necrose poderia ser interpretado como secundário à HVE tardiamente instalada.

O objetivo deste estudo é avaliar se a inibição aguda e de curta duração da síntese de NO causam ou não lesões isquêmicas miocárdicas (necrose) que possam sugerir origem reparativa para a fibrose observada no modelo crônico.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Grupos experimentais

- Efeitos de doses crescentes endovenosas de L-NAME sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca

Ratos Wistar, pesando entre 300 e 350 gramas, foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) por via intra-peritoneal e submetidos à dissecação e cateterização da artéria carótida direita, através da qual introduzia-se um cateter de polietileno (Intramedic Polyethylene Tube PE 50, Clay Adams, Inc., New York, N.Y., USA). Este era então conectado a um transdutor de pressão (7016, Ugo Basile, Varese, Itália) acoplado a um registrador de dois canais (Gemini 7070, Ugo Basile, Varese, Itália), previamente calibrado. Em seguida, realizávamos uma incisão na região femoral direita dos animais, expondo assim a veia femoral, a qual era puncionada com uma agulha 25x7 conectada a outro cateter de polietileno (Intramedic Polyethylene Tube PE 10, Clay Adams, Inc., New York, N.Y., USA), possibilitando assim a administração intravenosa de salina, D-NAME ou de L-NAME. Ambos os cateteres de polietileno eram mantidos com solução de salina heparinizada (5 U/ml) em seu interior, visando evitar a obstrução da via. Aguardava-se o período necessário para a estabilização da pressão arterial, e a seguir procedia-se à administração de salina, D-NAME 45,0 mg/kg ou de L-NAME *in bolus* nas seguintes doses, constituindo-se assim os seguintes grupos experimentais:

- (1) CONTROLE (n=8): salina 0,1 ml;
- (2) L-NAME 0,5 (n=6): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 0,5 mg/kg em 0,1ml de solução salina;
- (3) L-NAME 1,5 (n=6): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 1,5 mg/kg em 0,1ml de solução salina;
- (4) L-NAME 5,0 (n=7): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 5,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina;

(5) L-NAME 15,0 (n=7): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 15,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina;

(6) L-NAME 45,0 (n=9): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 45,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina.

(7) D-NAME 45,0 (n=6): N^ω-nitro-D-arginina metil éster, 45,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina.

Registrávamos a curva de pressão arterial na condição basal em velocidades de registro de 10 e 600 mm/min, e em seguida administrávamos salina ou a dose de L-NAME ou D-NAME 45,0 mg/kg, conforme o grupo ao qual pertencesse o animal. Imediatamente após a infusão, registrávamos a curva pressórica na velocidade de 600 mm/min para avaliarmos possíveis efeitos sobre a frequência cardíaca, para em seguida mantermos o registro à velocidade de 10 mm/min até atingir-se a resposta máxima de pressão arterial. Após o experimento, os animais eram sacrificados. Os corações dos animais deste grupo não foram submetidos à avaliação histológica.

- Administração de L-NAME 45,0 mg/kg e efeitos sobre o fluxo coronariano em coração isolado

Conforme o procedimento descrito nos capítulos anteriores, estudamos pelo método de Langendorff o efeito da dose de 45,0 mg/kg de L-NAME (n=7) administrada *in bolus* ao coração isolado de outro grupo de ratos Wistar, com peso entre 290 e 310 gramas. D-NAME 45,0 mg/kg foi administrado da mesma forma a corações de outro grupo de animais (n=4), como controle para o grupo que recebeu L-NAME. O efluente da preparação do coração isolado, ou seja o fluxo coronariano (ϕ_{cor} , ml/min) era coletado na situação basal e após 15, 30, 45, 60, 75 e 90 segundos, 2, 5, 10, 30 minutos. Os valores de ϕ_{cor} não foram normalizados para o peso cardíaco devido à pequena variação no peso corporal e do coração dos animais utilizados.

4.2.2. Avaliação histológica

- Efeitos da administração oral de L-NAME por 2 dias sobre a histologia do miocárdio

Administramos por via oral, adicionado à água ingerida, L-NAME na mesma dose utilizada no estudo crônico (65 mg/kg/dia) para ratos Wistar machos (150-200 g) (n=10). Estes animais, e outros que não tiveram qualquer droga acrescentada à água ingerida constituindo o grupo controle (n=10), foram sacrificados após 2 dias de tratamento e seus corações, após fixação em formalina 10% e preparação histológica idêntica à descrita nos capítulos anteriores, foram estudados à microscopia ótica. Para a avaliação de lesões miocárdicas, utilizamos os mesmos critérios descritos anteriormente (FACTOR *et al.*, 1981). As condições do biotério e cuidados com os animais (alimentação, disposição nas gaiolas, etc) foram as mesmas já descritas nas seções anteriores.

- Efeitos de doses crescentes endovenosas de L-NAME sobre a histologia do miocárdio

Ratos Wistar, pesando entre 300 e 350 gramas quando do início do estudo, foram anestesiados superficialmente com éter, e divididos nos seguintes grupos, conforme a solução infundida através da veia caudal, *in bolus*:

- (1) CONTROLE (n=18): salina 0,1 ml;
- (2) L-NAME 0,5 (n=18): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 0,5 mg/kg em 0,1ml de solução salina;
- (3) L-NAME 1,5 (n=19): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 1,5 mg/kg em 0,1ml de solução salina;
- (4) L-NAME 5,0 (n=18): N^ω-nitro-L-arginina metil éster, 5,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina;

(5) L-NAME 15,0 (n=19): N^o-nitro-L-arginina metil éster, 15,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina;

(6) L-NAME 45,0 (n=18): N^o-nitro-L-arginina metil éster, 45,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina.

(7) D-NAME 45,0 (n=11): N^o-nitro-D-arginina metil éster, 45,0 mg/kg em 0,1ml de solução salina.

A recuperação anestésica dos animais se deu em gaiolas sob aquecimento. As condições do biotério e cuidados com os animais (alimentação, disposição nas gaiolas, etc) foram as mesmas já descritas nas seções anteriores. Os animais foram sacrificados após 48 horas por inalação de éter e os corações submetidos à avaliação histológica, seguindo a mesma preparação histológica e critérios de avaliação utilizados anteriormente.

4.2.3. Análise estatística

- Análise de variância para amostras independentes foi aplicada para comparar as médias de pressão arterial média e de frequência cardíaca dos 7 grupos experimentais, antes e após a administração intravenosa de salina ou das diferentes doses de L-NAME. Quando esta análise inter-grupos resultava significativa, o teste de Duncan era aplicado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

- Análise de variância para amostras repetidas foi aplicada para comparar as médias de fluxo coronariano nos grupos L-NAME e D-NAME após a administração intravenosa de uma das drogas. Quando esta análise inter-grupos resultava significativa, o teste de Duncan era aplicado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

- Teste “t” de Student pareado foi utilizado para comparar as médias da pressão arterial média e da frequência cardíaca antes e após a administração venosa de salina ou das diferentes doses de L-NAME em cada um dos 7 grupos estudados (Software True Epistat, Epistat Services, 1991).

- Teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar as áreas de necrose nos 7 grupos experimentais, avaliadas de forma semiquantitativa. Quando esta análise inter-grupos resultava significativa, o teste de Dunn era aplicado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados (Software Stanton Glanz, Primer of Statistics, 1990)

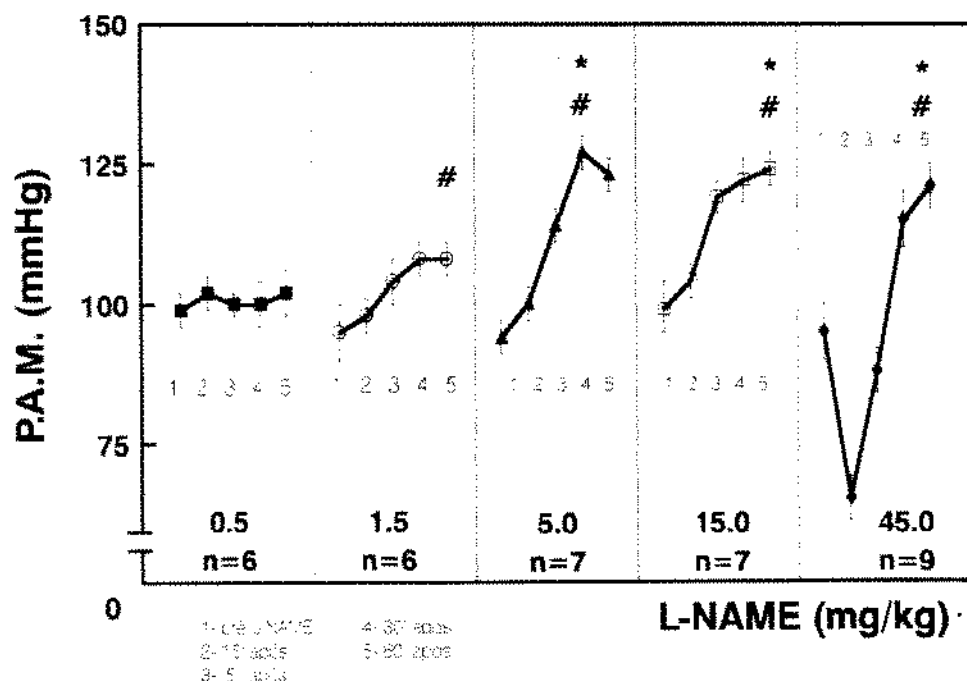
Fixou-se em 5% (erro $\alpha < 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com os seguintes símbolos (*, **, †, §) os valores significantes.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Pressão arterial média

Os sete grupos estudados não diferiam entre si quanto à pressão arterial média (PAM) basal (CONTROLE= 97 ± 5 mmHg, L-NAME 0,5= 99 ± 9 mmHg, L-NAME 1,5= 95 ± 6 mmHg, L-NAME 5,0= 94 ± 8 mmHg, L-NAME 15,0= 99 ± 12 mmHg, L-NAME 45,0= 95 ± 8 mmHg, D-NAME 45,0= 92 ± 5 mmHg; $p > 0,05$; $F = 0,4276$). A Figura 10 mostra o comportamento da PAM nos 5 grupos que receberam L-NAME e a Figura 11, o mesmo para os grupos L-NAME e D-NAME 45,0. A administração de L-NAME 0,5 e 1,5 mg/kg causou aumentos discretos da PAM (L-NAME 0,5= 102 ± 13 e L-NAME 1,5= 109 ± 13 mmHg, respectivamente), porém estes não foram estatisticamente diferentes do valor de PAM atingida pelo grupo CONTROLE (97 ± 5 mmHg) e nem diferentes entre si (Figura 10). Os animais que receberam L-NAME 5,0, 15,0 e 45,0 mg/kg elevaram a PAM significativamente (L-NAME 5,0= 123 ± 14 , L-NAME 15,0= 124 ± 16 e L-NAME 45,0= 121 ± 16 mmHg, respectivamente) em relação aos animais que receberam salina ou L-NAME 0,5 e 1,5 mg/kg. A PAM máxima atingida por estes 3 grupos (L-NAME 5,0, 15,0 e 45,0) não foi estatisticamente diferente, mas o grupo L-NAME 45,0 apresentou um comportamento inicial da PAM diferente dos demais grupos estudados (Figura 10). A PAM sofreu queda imediata (início aos 15 segundos) e acentuada (aproximadamente 35 mmHg) em 7 dos 9 animais, seguida por óbito em 2 deles. No entanto, 30 minutos após a administração de L-NAME 45,0 mg/kg, todos os animais sobreviventes mostravam-se hipertensos em relação à sua própria condição basal de PAM e ao grupo CONTROLE. Quando feita a análise estatística comparando os valores de PAM basal (pré-L-NAME) e máxima (30 a 60 minutos após L-NAME) em cada grupo experimental tratado com L-NAME, apenas a dose de 0,5 mg/kg não elevou significativamente a PAM. D-NAME 45,0 não promoveu alterações na PAM.

Figura 10. Curva dos valores médios $\pm$ desvios-padrão da pressão arterial média (PAM) expressa em milímetros de mercúrio (mmHg) nos 5 grupos experimentais após a administração de diferentes doses intravenosas de L-NAME.



1) Análise de variância para amostras independentes

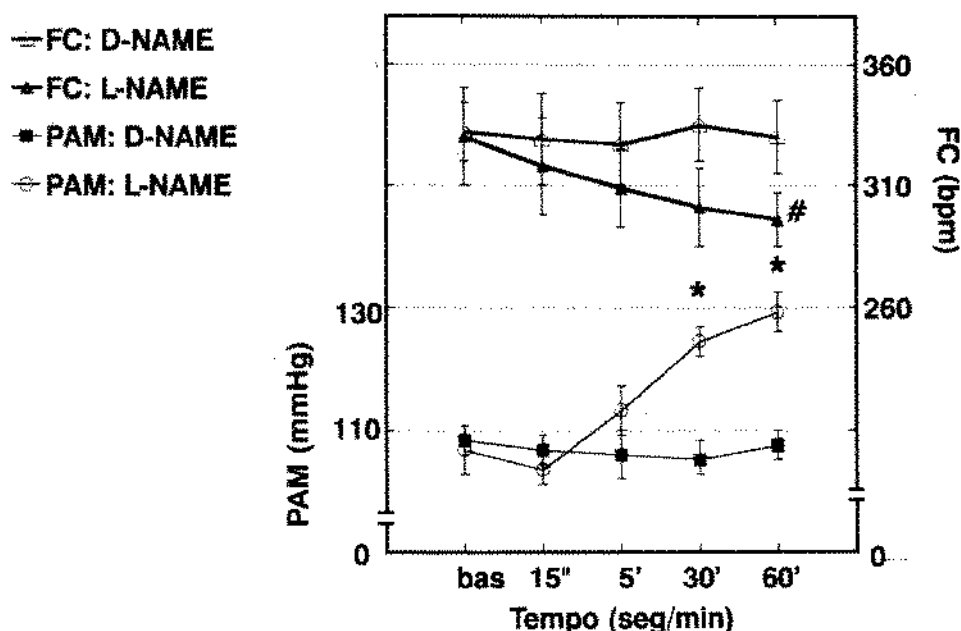
* $p < 0.05$, $F=3.1457$;

Duncan: L-NAME 0.5 = L-NAME 1.5 < L-NAME 5.0 = L-NAME 15.0 = L-NAME.

2) Teste "t" de Student pareado

* $p < 0.05$, pré- vs pós- L-NAME para cada grupo: L-NAME 1.5, $t= 1.9435$; L-NAME 5.0, $t= 4.4309$; L-NAME 15.0, $t=4.0035$; L-NAME 45.0, $t= 4.6019$.

Figura 11. Comportamento da pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a administração endovenosa de D-NAME e L-NAME 45,0 mg/kg.



$p < 0,05$; FC: L-NAME vs basal.

* $p < 0,05$; PAM: L-NAME vs basal.

4.3.2. Frequência cardíaca (FC)

Embora todos os grupos apresentassem tendência imediata à redução da FC após a administração de L-NAME em relação aos seus próprios valores iniciais (L-NAME 0,5, de 415 ± 40 para 397 ± 39 bpm; L-NAME 1,5, de 439 ± 36 para 416 ± 37 bpm; L-NAME 5,0, de 393 ± 57 para 361 ± 61 bpm; L-NAME 15,0, de 427 ± 37 para 394 ± 51 bpm), isto alcançou significância estatística somente para a dose de 45,0 mg/kg (de 415 ± 28 para 370 ± 26 bpm) (Figura 12). Também apenas para o grupo L-NAME 45,0 foi possível identificar uma redução significativa de FC ao atingir-se a PAM máxima para cada grupo, o que ocorreu

entre 30 e 60 minutos após a administração da droga. Os valores de FC comparados ao atingir-se a PAM máxima entre os 5 grupos tratados com -NAME não diferiram estatisticamente entre si.

O comportamento da FC no grupo D-NAME 45,0 foi semelhante ao observado no CONTROLE, sendo portanto diferente do grupo L-NAME 45,0 (Figura 11).

4.3.3. Fluxo coronariano

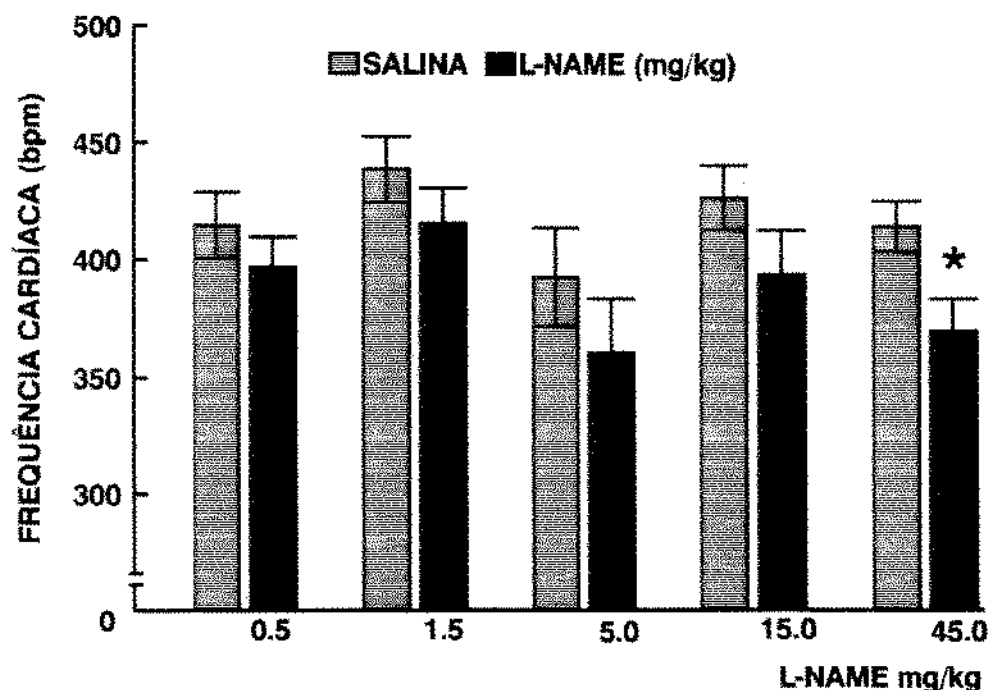
O fluxo coronariano (ϕ_{cor}) foi reduzido por L-NAME 45,0 mg/kg, mas não por seu enantiômero D-NAME na mesma dose (Figura 13). Houve uma queda inicial do ϕ_{cor} entre 15 e 60 segundos, com retorno à normalidade após isso que perdurou até 2 minutos, quando nova redução de ϕ_{cor} ocorreu, persistindo até o término dos experimentos (30 minutos).

4.3.3. Alterações miocárdicas

- Administração oral por 48 horas de L-NAME

Os corações dos animais que receberam L-NAME (65 mg/kg/dia) por via oral durante 48 horas, apresentaram áreas de necrose, principalmente em regiões subendocárdicas, com infiltrado de macrófagos, caracterizando uma fase precoce de reabsorção de miocárdio lesado (Figura 14). A avaliação do grau das lesões teve a seguinte distribuição: (-) 5 corações; (+) 3 corações; (++) 2 corações e (+++) nenhum coração.

Figura 12. Frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto, nos cinco grupos, antes e após a administração intravenosa de diferentes doses de L-NAME. As barras representam as médias e os desvios-padrão.



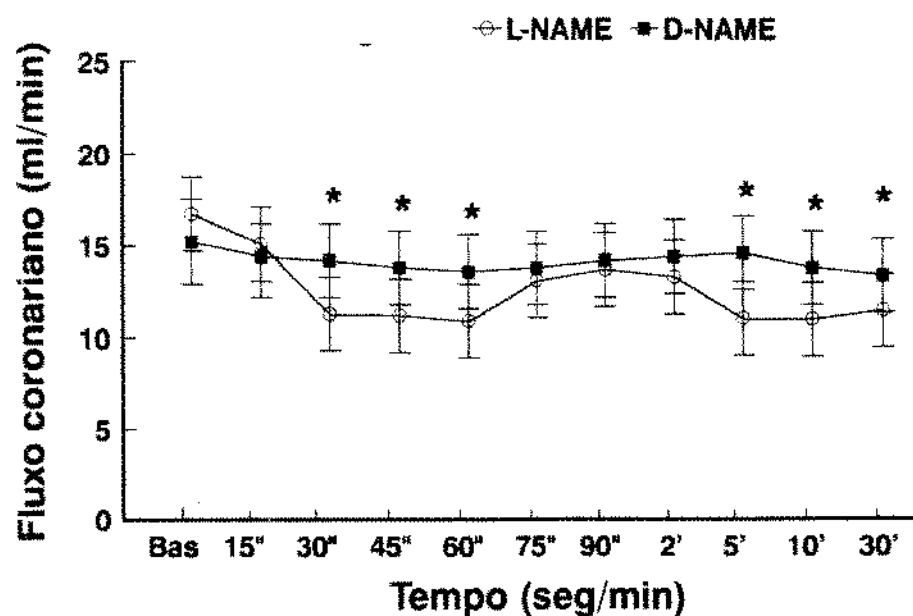
Teste "t" de Student pareado

* $p < 0,05$. $t = 4,6019$; pré- vs pós- L-NAME 45,0.

• Doses crescentes endovenosas de L-NAME

Em doses superiores a 1,5 mg/kg de L-NAME, foram encontradas áreas de necrose semelhantes àsquelas observadas no tratamento oral por 48 horas. O comprometimento em alguns casos atingia até 80% da circunferência da região subendocárdica do ventrículo esquerdo (L-NAME 45,0 mg/kg). L-NAME não causou necrose no ventrículo direito dos animais tratados com a droga. Todos os corações do grupo D-NAME foram negativos. As áreas de necrose foram tanto mais frequentes e extensas quanto maior a dose de L-NAME administrada (Tabela 15).

Figura 13. Fluxo coronariano (ϕ_{cor}), em ml/min, nos grupos D-NAME e L-NAME, antes e após a administração intravenosa de 45 mg/kg das drogas (coração isolado, método de Langendorff).



ANOVA para medidas repetidas

* $p < 0,05$ vs basal (somente para L-NAME); $F=3,45638$.

Tabela 15. Análise classificatória dos achados histológicos nos corações dos animais dos 6 grupos experimentais, 48 horas após a administração intravenosa de crescentes doses de L-NAME *in bolus*.

Classificação histológica	L-NAME (mg/kg)					
	Administração intravenosa <i>in bolus</i>					
	CONTROLE (n=18)	0,5 (n=18)	1,5 (n=19)	5,0 (n=18)	15,0 (n=19)	45,0 (n=18)
0	18	18	19	13	3	0
+	0	0	0	1	4	3
++	0	0	0	3	7	6
+++	0	0	0	1	5	9

Critérios para classificação: (-), ausentes; (+), fracamente positivo; ++, moderadamente positivo; +++, fortemente positivo

Kruskall-Wallis: L-NAME 5,0 vs L-NAME 15,0 vs L-NAME 45,0; $p < 0,05$; $H = 7,7310$; Dunn: L-NAME 45,0 > L-NAME 15,0 > L-NAME 5,0.

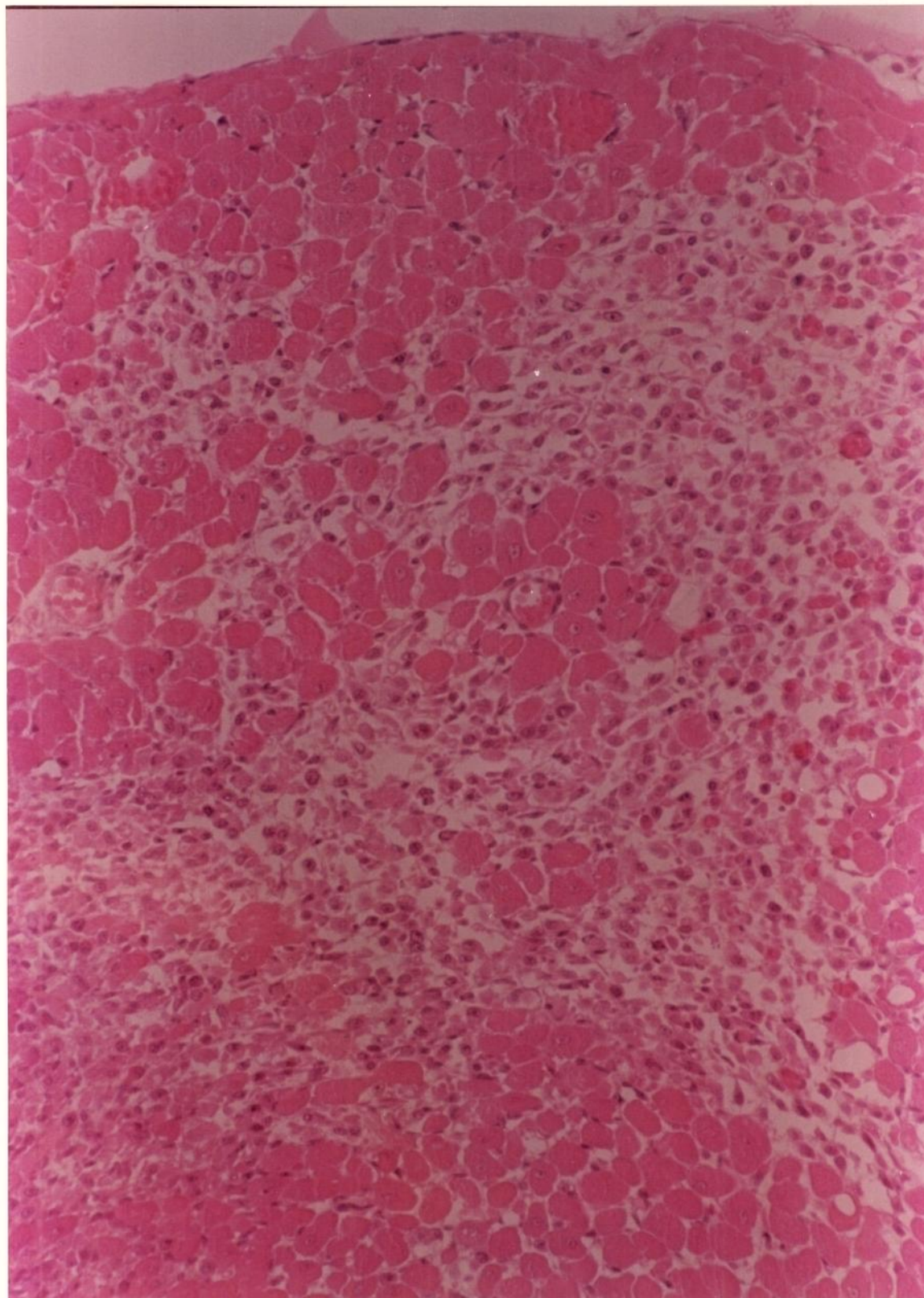


Figura 14. Corte histológico do ventrículo esquerdo de animal do grupo tratado com L-NAME 45 mg/kg e.v.. Área de necrose com infiltrado de macrófagos, caracterizando uma fase precoce de reabsorção de miócitos lesados. Coloração HE, 20x.

4.4. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a inibição aguda da síntese de NO em ratos causa necrose miocárdica e também que a maior severidade das lesões não está associada a níveis de pressão arterial mais elevados. As lesões mais extensas foram encontradas em animais que receberam L-NAME 45,0 mg/kg, ou seja, a mesma dose que, em outro grupo de animais, causou imediatas hipotensão e redução da FC, com óbito de 2 animais. As áreas de necrose também constituíram o achado principal no coração dos animais que foram submetidos ao tratamento com L-NAME por via oral durante 48 horas, embora com menor expressão em termos de extensão das áreas de miocárdio atingidas. Quando avaliado o coração isolado, observamos uma redução de ϕ cor após a administração de L-NAME 45,0 mg/kg, mas não com D-NAME, o que caracteriza a ação específica do enantiômero L sobre a NO-sintase, inibindo a produção de NO.

Podemos interpretar a hipotensão observada com L-NAME 45,0 mg/kg como decorrente de uma disfunção cardíaca aguda consequente à redução do fluxo coronariano. Também em estudos realizados com coração isolado de ratos, foi demonstrado que a administração de N^{ω} -monometil-L-arginina (L-NMMA), outro inibidor da síntese de NO, induz isquemia miocárdica por redução do fluxo coronariano, associada a uma diminuição da função mecânica do órgão (ARMANI *et al.*, 1992). Em cães, a infusão intra-aórtica de L-NMMA causa queda do débito cardíaco atribuída à isquemia miocárdica (KLABUNDE *et al.*, 1991). Ainda em cães, a infusão intracoronária de L-NAME reduz a perfusão miocárdica com redução do diâmetro da artéria e do fluxo sanguíneo (HUCKSTORF *et al.*, 1994). Em nosso material, na preparação de Langendorff, observamos a ocorrência de acentuado prejuízo da função contrátil em alguns corações isolados imediatamente após a administração de L-NAME 45,0 mg/kg (dados não mostrados). Entretanto, essas disfunções não guardaram correlação

temporal com a redução de ϕ cor e também foram observadas em 2 corações que receberam D-NAME 45,0 mg/kg, fatos que sugerem um efeito inespecífico de ambos os isômeros, não relacionado à inibição da síntese de NO. Finalmente, observamos em nosso material necrose miocárdica após a administração endovenosa de L-NAME, principalmente na região subendocárdica, mesmo local em que observamos o predomínio de fibrose no modelo de inibição crônica da síntese de NO. Como também a administração oral do inibidor causou lesões muito semelhantes, apenas em menores proporções, podemos concluir que a fibrose miocárdica documentada no modelo crônico é de resultante de fenômeno reparativo, cicatricial. Nossos dados sugerem também ser a redução do fluxo coronariano a responsável pelas lesões miocárdicas encontradas, porém não excluem a possibilidade de ação direta, tóxica do inibidor L-NAME.

4.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem ser a fibrose induzida pela inibição crônica da síntese de NO um fenômeno reparativo, tendo por causa primária a necrose miocárdica, provavelmente de origem isquêmica e secundária ao comprometimento do fluxo coronariano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISAKA K, GROSS S, GRIFFITH OW, LEVI R. N^G-Methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Comm*, **160**:881-886, 1989.
- ALMEIDA PJ. Fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio em vasos mesentéricos isolados de ratos normotensos e hipertensos renovasculares. *Tese de Mestrado*. Universidade Federal do Espírito Santo, 1991.
- ALMEIDA PJ, PIRES JGP, MARQUEZINI AJ. Platelets, vessels and coagulation: basic mechanisms and drug actions. *J Drug Dev*, **2**:227-240, 1990.
- AMEZCUA JL, PALMER RMJ, DE SOUZA BM, MONCADA S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*, **97**:1119-1124, 1989.
- AMRANI M, O'SHEA J, ALLEN NJ, HARDING SE, JAYAKUMAR J, PEPPER JR, MONCADA S. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol*, **456**:681-687, 1992.
- ARNAL JF, EL AMRANI AI, CHATELIER G, MÉNARD J, MICHEL JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension*, **22**:380-387, 1993.
- ARNAL JF, WARIN L, MICHEL JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, **90**:647-652, 1992.
- BASSENGE E, BUSSE R. Endothelium modulation of coronary tone. *Progr Cardiovasc Dis*, **30**:349-380, 1988.

- BASSENGE E, HEUSCH G - Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116:77-165.
- BASSENGE E, HUCKSTORF CH. Endothelium-mediated control of coronary circulation. *Acta Cardiol*, 46:419-424, 1991.
- BATLOUNI B, RAMIRES JAF. Importância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. *Arq Bras Cardiol*, 62(4):255-269, 1994.
- BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 90:278-281, 1992.
- BENJAMIN N, VALLANCE P. Local control of human peripheral vascular tone: implications for drug therapy. *Clin Sci*, 80:183-190, 1991.
- BING OHL, BROOKS WW, ROBINSON KG, SLAWSKY MT, HAYES JA, LITWIN SE, SEN S, CONRAD CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*, 27:383-396, 1995.
- BRILLA CG, PICK R, TAN LB, JANICKI JS, WEBER KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*, 67:1355-1364, 1990.
- BRUSH JE, CANNON III R, WH SCHENKE. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy, *N Engl J Med* 319:302, 1988.
- BUTTRICK PM, MALHOTRA A, MCDERMITT L. Isomyosin distribution in overloaded human atrial myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 7:86A, 1986.
- CACHOFEIRO V. Farmacos antihipertensivos y endotelio. *Hypertension*, 5:221-230, 1991.
- CACHOFEIRO V, SAKAKIBARA T, NASJLETTI A. Role of kinin and nitric oxide in the hypotensive effects of captopril and ramiprilat. *Hypertension*, 19:138-145, 1992.

- CAMPBELL SE, JANICKI JS, MATSUBARA BB, WEBER KT. Myocardial fibrosis in the rat with mineralocorticoid excess. Prevention of scarring by amiloride. *Am J Hypertens*, **6**:487-495, 1993.
- CARLTON WW, ENGELHARDT JA. Polyarterites, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. *Cardiovascular and musculoskeletal systems*. pp 71-76. Berlin: Springer-Verlag. 1991.
- CARRETERO OA, GULATI OP. Effects of angiotensin antagonist in rats with acute, subacute and chronic two-kidney renal hypertension. *J Lab Clin Med*, **91**:264-271, 1978.
- CHESEBRO JH, FUSTER V, WEBSTER MWI. Endothelial injury and coronary vasomotion. *J Am Coll Cardiol*, **14**:1191-1192, 1989.
- CHOBANIAN AV. Hypertensive drugs and atherogenesis: mechanisms and clinical implications. *J Clin Hypertens*, **13**:1485-1575, 1986.
- CHILDS TJ, ADAMS MA, MAK AS. Regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by enalapril and the expression of contractile proteins. *Hypertension*, **16**:662-668, 1990.
- COOKE JP, ANDON NA, GIRERD XJ, HIRSH AT, CREAGER MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation*, **83**:1057-1062, 1991.
- DE NICOLA L, BLANTZ RC, GABBAI FB. Nitric oxide and angiotensin II. *J Clin Invest*, **89**:1248-1256, 1992.
- DIAMOND J, BLISARD KS. Effects of stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. *Mol Pharmacol*, **12**:688-692, 1976.
- DOHI Y, THIEL MA, BUHLER, FR. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension*, **15**:170-179, 1990.
- DUBOIS RANDÉ JL, ZELINSKY R, ROUDOT F. Effects of infusion of L-arginine in the left anterior descending coronary artery on acetylcholine-

- induced vasoconstriction of human atheromatous coronary arteries. *Am J Cardiol*, **70**:1269-1275, 1992.
- DUNN, FG, W OIGMAN, HO VENTURA, FH MESSERLI, I KOBRIN, ED FROHLICH. Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Cardiol*, **53**:105, 1984.
- DUSSAULE JC, MICHEL JB, AUZAN K, SCHWARTZ P, CORVOL J, MENARD J. Effect of antihypertensive treatment on the left ventricular isomyosin profile in one-clip, two kidney hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **236**:512-518, 1986.
- DYNERMAN JL, MEHTA JL. Endothelial, platelet and leucocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*, **16**: 207-222, 1990.
- DZAU VJ. Significance of vascular renin-angiotensin pathways. *Hypertension*, **8**:553-559, 1986.
- DZAU VJ, GIBBONS GH. Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *Am J Cardiol*, **67**:991-1031, 1987.
- ERDŐS EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension*, **16**:365-370, 1990.
- ÉVORA PRB. O Impacto científico da descoberta do óxido nítrico como vasodilatador e antitrombótico endógeno. *Arq Bras Cardiol*, **61**:3-5, 1993.
- FACTOR SM, BHAN R, MINASE T, WOLINSKY H, SONNENBLICK E. Hypertensive-diabetic cardiopathy in the rat, *Am J Pathol* **102**:219-228, 1981.
- FEIN FS, CHO S, ZOLA BE, MILLER B, FACTOR SM. Cardiac pathology in the hypertensive diabetic rat. *Am J Pathol*, **134**:1159-1166, 1989.
- FORSTERMANN U, MULSCH A, BOHME E, BUSSE R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res*, **58**:531-538, 1986.

- FRANCISCHETTI EA, FAGUNDES VGA, FRANÇA MF. Endotélio vascular. Um importante sistema cibernético vaso-modulador e modulador cuja disfunção participa do processo hipertensivo. *Arq Bras Cardiol*, **64**(1):53-68, 1995.
- FURCHGOTT RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, **53**:557-573, 1983.
- FURCHGOTT RF. The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **24**:175-197, 1984.
- FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**:373-376, 1980a.
- FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JV. Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells. *Fed Proc*, **39**:581A, 1980b.
- FUJIHARA CK, MICHELLAZZO SM, DE NUCCI G, ZATZ R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol*, **266**:F697-F705, 1994.
- GARDINER SM, COMPTON AM, KEMP PA, BENNETT T. Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*, **101**:746-752, 1990.
- GASCHO J, MUELLER TM, EASTHAM CL, MUIESAN ML. Abnormalities of the coronary circulation in normotensive dogs with volume-induced left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res*, **16**:288-292, 1982.
- GAVRAS H, BRUNNER HR, LARAGH JF. An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N Engl J Med*, **291**:817-821, 1974.
- GAVRAS H, BRUNNER HR, LARAGH JR, VAUGHAN ED, KOSS M, COTE LJ, GAVRAS I. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess. *Circ Res*, **36**:300-309, 1975.

- GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, **59**:347-379, 1934.
- GOLDSCHMIT JE, TALLARIDA RJ. Pharmacological evidence that captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilation: effect of sulphhydryl groups on endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther*, **257**:1136-1145, 1991.
- GRIFFITH TM, EDWARDS DH, LEWIS MJ. Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium relaxation. *Eur J Pharmacol*, **112**:195-202, 1985.
- GRYGLEWSKI RJ, PALMER RMJ, MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **320**:454-456, 1986.
- HENDERSON AH. Endothelium in control. *Br Heart J*, **65**:116-125, 1991.
- HERITY NA, ALLEN JD, SILKE B, ADGEY AAJ. Comparison of the ability of nicardipine, theophylline and zaprinast to restore cardiovascular haemodynamics following inhibition of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*, **112**:423-428, 1994.
- HUCKSTORF C, ZANZINGER J, FINK B, BASSENGE E. Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Arch Pharmacol*, **349**:367-373, 1994.
- HULTGREN PB, BOYE AA. Myocardial blood flow at rest and during exercise in dogs with volume overload induced left ventricular hypertrophy. *Fed Proc*, **37**:647-649, 1978.
- IGNARRO LJ. Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*, **16**:477-483, 1990.

- IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, **61**:866-879, 1987.
- ITO S, JUNCOS LA, NUSHIRO N, JOHNSON CS, CARRETERO OA. Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin action in afferent arterioles. *Hypertension*, **17**:1052-1056, 1991.
- JOVER B, HERIZI A, VENTRE F, DUPONT M, MIMRAN A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension*, **21**:944-948, 1993.
- KERNS WD, JOSEPH EC, MORGAN G. Drug-induced lesions, arteries, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. *Cardiovascular and musculoskeletal systems*. pp 76-83. Berlin:Springer-Verlag. 1991.
- KLABUNDE RE, RITGER RC, HELGREN MC. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol*, **199**:51-59, 1991.
- KOREN MJ, DEVEREUX RB, CASALE PN, SAVAGE DD, LARAGH JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*, **114**:345-352, 1991.
- LAHERA V, SALOM MG, MIRANDA-GUARDIOLA F, MONCADA S, ROMERO JC. Effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol*, **261**:F1033-F1037, 1991.
- LEÃO MC. Efeito do captopril na hipertensão arterial e na resposta pressora induzida pelo L-NAME (inibidor de síntese de óxido nítrico). *Tese Doutorado*. Rio de Janeiro, Instituto de Biologia - UERJ, 1993.
- LERMAN A, SANDOK EK, HILDEBRAND FL JR, BURNNET JC JR. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation*, **85**:1894-1898, 1992.

- LEVY D, ANDERSON KM, SAVAGE DD, KANNEL WB, CHRISTIANSEN JC, CASTELLI WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. *Ann Intern Med*, **108**:7-13, 1989.
- LEVY D, GARRISON RJ, SAVAGE DD, KANNEL WB, CASTELLI WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, **332**:1561-1566, 1990.
- LINZ W, WIEMER G, SCHÖLKENS BA. Contribution of bradykinin to the cardiovascular effects of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22**(9):S1-S8, 1993.
- LOEB AL, LONGNECKER DE. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor-dependent circulatory control in intact rats. *Am J Physiol*, **262**:H1494-H1500, 1992.
- LUND DD, TOMANEK RJ. Myocardial morphology in spontaneously hypertensive and aortic-constricted rats. *Am J Anat*, **152**: 141, 1978.
- LÜSCHER TF, VANHOUTTE PM, BOULANGER C, DOHI Y, BÜHLER FR. Endothelial dysfunction in hypertension. In: Rubanyi GM, ed. *Cardiovascular significance of endothelium-derived vasoactive factors*. pp. 221- . Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co. 1991.
- MARTIN W, VILLANI GM, JOTHIANANDAN D, FÜRCHGOTT RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, **232**:708-716, 1985.
- MCAREAVEY D, ROBERTSON JIS. Angiotensin converting enzyme inhibitors and moderate hypertension. *Drugs*, **40**:326-345, 1990.
- MCLLENACHAN JM, WILLIAMS JK, FISH RD, SELWYN AP. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation*, **84**:1273-1278, 1991.
- MOLHO-SABATIER P. Endothélium et thrombose. *Rev Méd Intern*, **8**:389-394, 1987.

- MOMBOULI JV, NEPHTALI M, VANHOUTTE PM. Effects of the converting enzyme inhibitor cilazaprilat on endothelium-dependent responses. *Hypertension*, **18**:1122-1129, 1991.
- MONCADA S. The first Robert Furchgott Lecture: from endothelial-dependent relaxation to the L-arginine:NO pathway. *Blood Vessels*, **27**:208-217, 1990.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **43**:100-142, 1991.
- MOORE PK, AL SWAYEH OA, CHONG NWS, EVANS R, MIRZAZADEH S, GIBSON A. L-N^G-Nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. *Br J Pharmacol*, **176**: 219-223, 1989.
- MORTON JJ, BEATTIE EC, SPEIRS A, GULLIVER F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J Hypertens*, **11**:1083-1088, 1993.
- NABEL EG, SELWYN AP, GANZ P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: An endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, **16**:349-356, 1990.
- NEMOTO T, MATSUOKA H, HASEGAWA H, UEKI K, KIMURA H, KAWAMURA K, MASUDA H, MIURA M. Effect of enalapril and E4177 on the heart under chronic nitric oxide suppression in in vivo rat model. *J Mol Cell Cardiol*, **26**:228, 1994.
- NEWBY AC, HENDERSEN AH. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann Rev Physiol*, **52**:661-674, 1990.
- OHESSEN SP, CLAPHAM DE, DAVIES P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*, **331**:168-170, 1988.
- OHISHI K, CARMINES PK, INSCHO EW, NAVAR LG. EDRF-angiotensin II interactions in rat juxtamedullar afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol*, **263**:900-906, 1992.

- OHYANAGI M, NISHIGAKI K, FABER JE. Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res*, **71**:188-200, 1992.
- PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**: 664-666, 1988a.
- PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**:524-526, 1987.
- PALMER RMJ, REES DD, ASHOTON DS, MONCADA S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, **153**:1251-1256, 1988b.
- PEARSON PJ, SCHAFF HV, VANHOUTTE PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circ Res*, **67**:385-393, 1990.
- POWELL JS, CLOZEL JP, MULLER KM. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*, **245**:186-188, 1989.
- PRATT RE, DZAU VJ. Trophic effects of angiotensin on blood vessels and heart. In: Roberstson JI, Nicholls MG, eds. *The renin-angiotensin system*. Vol.1. pp 31.1-31-7. London:Gower Medical Publishing. 1993.
- RHALEB N-E, YANG X-P, SCICLI AG, CARRETERO OA. Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophy effect of ramipril. *Hypertension*, **23**(2):865-868, 1994.
- RAPAPORT RM, DRAZNIN MB, MURAD F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, **306**:174-176, 1983.
- REES DD, PALMER RMJ, MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxid in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**:2334-2338, 1988.

- REES DD, PALMER MJ, MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:3375-3378, 1989.
- REES DD, PALMER RMJ, HODSON HF. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*, **96**:418-424, 1989.
- RIBEIRO MO, ANTUNES E, DE NUCCI G, LOVISOLO SM, ZATZ R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, **20**:298-303, 1992.
- RUBANYI GM, JOHNS A, WILCOX D, *et al.* Evidence that a S-nitrosothiol, but not nitric oxide, may be identical with endothelium-derived relaxing factor. *J Cardiovasc Pharmacol*, **17**:S41-S45, 1991.
- RUBANYI GM, LORENZ RR, VANHOUTTE PM. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol*, **249**: H95-H100, 1985.
- RUSKOAHO HJ, SAVOLAINEN ER. Effects of long-term verapamil treatment on blood pressure, cardiac hypertrophy and collagen metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, **19**:355-362, 1985.
- SALOM MG, LAHERA V, MIRANDA-GUARDIOLA F, ROMERO JC. Blockade of pressure natriuresis induced by inhibition of renal synthesis of nitric oxide in dogs. *Am J Physiol*, **262**:F718-F722, 1992.
- SASAYAMA S, FRANKLIN D, ROSS J JR. Dynamic changes in left ventricular wall thickness and their use in analyzing function in the conscious dog. *Am J Cardiol*, **38**:870-879, 1976.
- SEN S, BUMPUS FM. Collagen synthesis in development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Cardiol*, **44**:954-958, 1979.
- SIGMON DH, BEIERWALTES WH. Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension*, **22**:237-242, 1993.

- SIGMON DH, CARRETERO OA, BEIERWALTES WH. Plasma renin activity and the renal response to nitric oxide synthesis inhibition. *J Am Soc Nephrol*, **3**:1288-1294, 1992.
- TAN LP, JALIL JE, PICK R, JANICKI JS, WEBER KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res*, **69**:1185- , 1991.
- THULESIUS O. Vasodilation and the endothelial cell. *ACE Report*, **53**:1-5, 1988.
- TOLINS JP, SHULTZ PJ, RAIJ L. Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of vascular tone and remodeling. *Hypertension*, **17**:909-916, 1991.
- UEKI K, MATSUOKA H, HASEGAWA H, NEMOTO T, KIMURA H, KAWAMURA K, MASUDA H, MIURA M. Comparison of the effects of long-term nitric oxide suppression on the heart between young and old rats. *J Mol Cell Cardiol*, **26**: 228- . 1994.
- VALLANCE P, COLLIER J, MONCADA S. Nitric oxide synthesized from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human veins. *Cardiovasc. Res.*, **23**:1053-1057, 1989.
- VALLANCE P, COLLIER J, MONCADA S. Endothelium-dependent responses and nitric oxide production in human vasculature in vivo. In: Moncada S, Higgs EA, eds. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. pp Amsterdam:Elsevier. 1990.
- VAN DE VOORDE J & LEUSEN I. Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am J Physiol*, **250**:H711-H717, 1986.
- VANE JR, ANGGARD EE, BOTTING RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, **323**:27-36, 1990.
- VANHOUTTE PM & LUSCHER TF. Vascular endothelium and hypertension. *J Pharmacol*, **10 (suppl 4)**:S19-S24, 1987.
- VANHOUTTE PM & SHIMOKAWA H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*, **80**:1-9, 1989.

- VRINTS G, HERMAN AG. Role of endothelium in the regulation of coronary artery tone. *Acta Cardiol*, **46**:399-418, 1991.
- WANG YX, GAVRAS I, WIERZBA T, LAMMEK B, GAVRAS H. Inhibition of nitric oxide, bradykinin, and prostaglandins in normal rats. *Hypertension*, **19(suppl II)**:II-255-II-261, 1992.
- WEBER WB, CLARK WA, JANICKI JS, SHROFF SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overload myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*, **10**:537-549, 1987.
- WEBER KT. Cardiac interstitium in health and disease: remodeling of the fibrillar collagen matrix. *JACC*, **13**:1637-1652, 1989.
- WEBER KT, BRILLA CG, JANICKI JS. Signals for the remodeling of the cardiac interstitium in systemic hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **17(Suppl 2)**: 14- , 1991.
- WEBER KT, JANICKI JS, PICK R, CAPASSO J, ANVERSA P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am J Cardiol*, **65**:1-7, 1990.
- WIDDOP RE, GARDINER SM, KEMP PA, BENNETT T. The influence of atropine and atenolol on the cardiac haemodynamic effects of N^G -nitro-L arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*, **105**:653-656, 1992.
- WIEMER G, SCHOLKENS BA, BECKER RH, BUSSE R. Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension*, **18**:558-563, 1991.
- ZATZ R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab Animal Sci*, **40**:98-201, 1990.

6- SUMMARY

This thesis examines the effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide (NO) biosynthesis on cardiac function and morphology in Wistar rats. The contribution of angiotensin II to the cardiac changes observed following chronic NO inhibition was evaluated by treating the animals with enalapril, an angiotension converting enzyme inhibitor.

Chronic inhibition of NO biosynthesis: The five groups of rats employed in this first part of the study included a control group (C), a two kidney-one clip (2K-1C) group, an L-NAME (N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester, 65 mg/kg/day, orally) group, a 2K-1C+L-NAME (same dose as above) group, and a D-NAME (N^{ω} -nitro-D-arginine methyl ester, 65 mg/kg/day, orally) group. The body weight (BW) and caudal arterial blood pressure (CAP) of each rat were measured weekly. In selected animals from each of these groups, the cardiac mass was also determined two, four and eight weeks after the start of the study. At the eighth week, the control and L-NAME-treated animals were sacrificed and their hearts isolated and perfused by the method of Llangendorff. For each heart, the left ventricular developed pressure (LVDP) and coronary flow (CF) were determined. The hearts of rats from each group were also examined histologically by light microscopy.

The oral administration of L-NAME produced hypertension which was maximal after five weeks. Only after the sixth week was the arterial tail cuff pressure in the 2K-1C rats significantly greater than in the animals receiving L-NAME. Both the LVDP and CF of L-NAME-treated rat hearts were significantly less than those of the control animals. The lower LVDP suggests a decreased contractile capacity in the former group. There were no significant differences in the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) or in the heart rate between the L-NAME-treated and control groups.

The relative body weight (BW_r) and the relative left ventricular weight (LVW_r) were greater in the 2K-1C and 2K-1C+L-NAME groups than in the control and L-NAME alone groups after two and four weeks. By the eighth week, the BW_r and LVW_r of the L-NAME group were higher than in the control animals but similar to those of the two 2K-1C groups.

Histologically, none of the hearts in the control and D-NAME groups was classified as having necrosis and in the 2K-1C group the incidence of cardiac alterations was low. In contrast, the rats treated with L-NAME developed myocardial changes the severity of which increased with the length of treatment. Although arterial pressure was elevated to a similar extent in the three groups of hypertensive animals, those receiving L-NAME showed the most severe and extensive lesions. This observation indicates that an elevated arterial pressure alone cannot explain the changes encountered. Areas of myocardial necrosis appeared early in the L-NAME group (by the second week), at which time left ventricular hypertrophy (LVH) had not yet developed. These findings, together with the decreased CF, suggest ischemia as the cause for the changes occurring in L-NAME-treated animals.

Based on the foregoing results, it is concluded that the chronic inhibition of NO biosynthesis leads to myocardial ischemia with myofibrillar necrosis and interstitial fibrosis. These alterations may represent the morphological correlate of the functional deficit in myocardial contractility described above. The principal factor involved in initiating this ischemia is likely to be the decrease in the oxygen supply to myocardial tissue as a consequence of a reduced CF. This suggestion is supported by the observation that the ischemic lesions preceded the onset of LVH.

Effect of enalapril (ENAL) on the cardiovascular alterations induced by the chronic inhibition of NO biosynthesis: The animals used in this part of the study were divided into four groups as follows: control, L-NAME-treated (same dose as used above), L-NAME+ENAL-treated (25 mg of enalapril maleate/kg/day, orally), and ENAL-treated (same dose as in the foregoing group). The changes

in BW and CAP were monitored over a period of eight weeks after which time the BW, and LVW, were determined. In addition, the functional activity and histology of the hearts were examined as described above.

Enalapril abolished the L-NAME-induced arterial hypertension after the second week and prevented both the development of left ventricular hypertrophy and the loss of myocardial contractility. This drug did not, however, interfere with either the decrease in CF or the appearance of ischemic myocardial lesions. These results suggest that two distinct pathophysiological mechanisms are involved in the L-NAME-induced effects, namely, (1) an increased activity of the renin-angiotensin system associated with the elevated arterial blood pressure and LVH, and (2) the appearance of structural and or functional coronary vascular alterations which lead to the ischemic lesions observed.

Keywords: enalapril, endothelium, hypertension, hypertrophy, ischemia.

7.

Anexo (Tabelas de valores individuais)

Anexo 1. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=68)	2ª semana (n=68)	4ª semana (n=50)	6ª semana (n=21)	8ª semana (n=21)
rato 1	112	118	116	118	114
rato 2	116	124	116	124	116
rato 3	114	112	112	112	112
rato 4	112	112	112	112	110
rato 5	114	116	114	116	114
rato 6	116	116	116	116	116
rato 7	114	118	114	118	112
rato 8	114	114	114	114	114
rato 9	112	118	110	118	110
rato 10	120	102	100	100	102
rato 11	104	104	104	104	104
rato 12	120	108	120	100	116
rato 13	120	120	120	120	120
rato 14	104	124	100	124	98
rato 15	102	122	100	98	96
rato 16	100	120	100	100	100
rato 17	102	126	104	126	102
rato 18	102	118	102	102	100
rato 19	102	126	102	122	102
rato 20	106	106	102	102	102
rato 21	108	98	100	108	98
rato 22	100	112	100	-	-
rato 23	98	118	98	-	-
rato 24	100	114	98	-	-
rato 25	100	123	94	-	-
rato 26	120	120	120	-	-
rato 27	122	120	124	-	-
rato 28	124	122	124	-	-
rato 29	120	118	116	-	-
rato 30	116	116	116	-	-
rato 31	114	120	112	-	-
rato 32	116	118	110	-	-
rato 33	100	106	100	-	-
rato 34	106	108	106	-	-
rato 35	108	118	106	-	-
rato 36	108	118	106	-	-

Anexo 1 (continuação). Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=68)	2ª semana (n=68)	4ª semana (n=50)	6ª semana (n=21)	8ª semana (n=21)
rato 37	108	120	105	-	-
rato 38	113	116	113	-	-
rato 39	114	120	114	-	-
rato 40	110	112	106	-	-
rato 41	106	114	106	-	-
rato 42	112	118	108	-	-
rato 43	108	116	108	-	-
rato 44	102	116	102	-	-
rato 45	110	116	102	-	-
rato 46	120	122	102	-	-
rato 47	104	102	104	-	-
rato 48	108	120	108	-	-
rato 49	120	120	108	-	-
rato 50	106	124	106	-	-
rato 51	104	106	-	-	-
rato 52	106	126	-	-	-
rato 53	120	122	-	-	-
rato 54	120	118	-	-	-
rato 55	120	120	-	-	-
rato 56	124	122	-	-	-
rato 57	116	124	-	-	-
rato 58	114	116	-	-	-
rato 59	120	126	-	-	-
rato 60	118	120	-	-	-
rato 61	112	118	-	-	-
rato 62	116	120	-	-	-
rato 63	112	120	-	-	-
rato 64	122	118	-	-	-
rato 65	112	120	-	-	-
rato 66	112	118	-	-	-
rato 67	110	126	-	-	-
rato 68	124	120	-	-	-

Anexo 2. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo 2K-1C durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=46)	2ª semana (n=46)	4ª semana (n=33)	6ª semana (n=15)	8ª semana (n=15)
rato 1	158	209	267	290	340
rato 2	165	203	270	306	375
rato 3	160	206	271	296	343
rato 4	159	217	272	301	378
rato 5	160	218	267	300	348
rato 6	155	223	276	289	372
rato 7	155	231	265	290	352
rato 8	175	214	254	298	343
rato 9	169	226	259	295	360
rato 10	166	178	256	300	367
rato 11	150	174	264	302	360
rato 12	172	189	256	304	342
rato 13	156	201	260	310	343
rato 14	167	210	260	300	345
rato 15	150	202	259	314	354
rato 16	160	201	250	-	-
rato 17	160	200	266	-	-
rato 18	155	197	265	-	-
rato 19	166	195	256	-	-
rato 20	170	200	231	-	-
rato 21	155	200	243	-	-
rato 22	152	205	234	-	-
rato 23	167	221	243	-	-
rato 24	162	176	245	-	-
rato 25	162	185	260	-	-
rato 26	154	176	254	-	-
rato 27	157	174	256	-	-
rato 28	156	203	230	-	-
rato 29	160	204	234	-	-
rato 30	165	210	245	-	-
rato 31	160	214	245	-	-
rato 32	170	187	236	-	-
rato 33	168	185	245	-	-
rato 34	165	190	-	-	-
rato 35	156	198	-	-	-
rato 36	164	195	-	-	-

Anexo 2 (continuação). Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo 2K-1C durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=46)	2ª semana (n=46)	4ª semana (n=33)	6ª semana (n=15)	8ª semana (n=15)
rato 37	159	178	-	-	-
rato 38	160	187	-	-	-
rato 39	155	190	-	-	-
rato 40	160	196	-	-	-
rato 41	155	228	-	-	-
rato 42	156	234	-	-	-
rato 43	159	234	-	-	-
rato 44	160	224	-	-	-
rato 45	153	226	-	-	-
rato 46	155	192	-	-	-

Anexo 3. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=73)	2ª semana (n=73)	4ª semana (n=54)	6ª semana (n=19)	8ª semana (n=19)
rato 1	185	219	278	300	314
rato 2	165	215	267	323	329
rato 3	162	220	287	312	333
rato 4	165	217	289	201	332
rato 5	170	222	287	310	340
rato 6	165	223	268	289	342
rato 7	160	231	276	290	329
rato 8	175	214	269	298	328
rato 9	180	226	267	312	336
rato 10	176	198	279	308	350
rato 11	168	200	270	302	324
rato 12	178	189	278	318	342
rato 13	189	201	284	322	330
rato 14	169	210	278	310	321
rato 15	168	202	254	314	320
rato 16	175	218	267	300	324
rato 17	176	212	268	298	330
rato 18	174	197	289	318	330
rato 19	174	198	278	314	322
rato 20	170	200	276	312	332
rato 21	168	218	287	302	320
rato 22	164	205	278	310	321
rato 23	167	221	276	289	-
rato 24	174	220	278	290	-
rato 25	170	226	278	298	-
rato 26	168	220	278	312	-
rato 27	175	218	268	307	-
rato 28	164	243	278	308	-
rato 29	180	232	270	300	-
rato 30	165	229	262	306	-
rato 31	180	228	280	302	-
rato 32	170	187	254	314	-
rato 33	168	185	260	302	-
rato 34	165	190	245	298	-
rato 35	174	198	276	308	-
rato 36	178	195	235	310	-
rato 37	168	178	245	304	-

Anexo 3 (continuação). Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=73)	2ª semana (n=73)	4ª semana (n=54)	6ª semana (n=19)	8ª semana (n=19)
rato 38	175	187	270	310	-
rato 39	175	200	267	302	-
rato 40	172	206	276	323	-
rato 41	168	228	289	301	-
rato 42	169	234	271	300	-
rato 43	170	234	284	307	-
rato 44	170	224	261	302	-
rato 45	176	226	270	306	-
rato 46	172	216	256	289	-
rato 47	168	218	260	300	-
rato 48	176	218	270	278	-
rato 49	168	210	275	290	-
rato 50	178	216	280	298	-
rato 51	160	219	-	-	-
rato 52	169	205	-	-	-
rato 53	175	238	-	-	-
rato 54	168	205	-	-	-
rato 55	180	204	-	-	-
rato 56	168	210	-	-	-
rato 57	175	214	-	-	-
rato 58	184	210	-	-	-
rato 59	180	230	-	-	-
rato 60	178	210	-	-	-
rato 61	180	220	-	-	-
rato 62	165	224	-	-	-
rato 63	172	231	-	-	-
rato 64	186	208	-	-	-
rato 65	166	218	-	-	-
rato 66	177	220	-	-	-
rato 67	183	210	-	-	-
rato 68	185	210	-	-	-
rato 69	175	214	-	-	-
rato 70	184	210	-	-	-
rato 71	180	230	-	-	-
rato 72	178	210	-	-	-
rato 73	180	220	-	-	-

Anexo 4. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo 2K-1C+L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=42)	2ª semana (n=42)	4ª semana (n=30)	6ª semana (n=11)	8ª semana (n=11)
rato 1	158	192	223	290	326
rato 2	165	192	21	300	345
rato 3	160	206	243	294	343
rato 4	159	217	231	301	360
rato 5	160	218	230	300	348
rato 6	155	212	223	280	356
rato 7	175	231	265	290	352
rato 8	175	214	254	298	334
rato 9	169	200	245	280	350
rato 10	175	189	243	300	350
rato 11	168	174	234	287	346
rato 12	175	189	230	298	342
rato 13	165	192	230	310	340
rato 14	167	198	265	300	345
rato 15	150	190	264	300	334
rato 16	160	190	258	300	324
rato 17	160	188	256	278	330
rato 18	175	197	267	280	330
rato 19	166	190	254	304	324
rato 20	170	178	261	278	332
rato 21	170	200	263	302	341
rato 22	175	205	225	285	321
rato 23	167	221	245	289	-
rato 24	170	176	252	280	-
rato 25	175	185	263	285	-
rato 26	169	176	254	302	-
rato 27	165	174	243	298	-
rato 28	156	182	245	289	-
rato 29	160	178	249	287	-
rato 30	165	188	256	278	-
rato 31	160	186	209	287	-
rato 32	170	187	219	300	-
rato 33	168	185	246	292	-
rato 34	165	190	256	298	-
rato 35	156	180	274	290	-
rato 36	156	230	254	278	-

Anexo 4 (continuação). Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo 2K-1C+L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=42)	2ª semana (n=42)	4ª semana (n=30)	6ª semana (n=11)	8ª semana (n=11)
rato 37	159	178	246	304	-
rato 38	160	187	187	290	-
rato 39	155	180	245	287	-
rato 40	160	178	245	289	-
rato 41	155	182	250	301	-
rato 42	156	198	234	280	-

Anexo 5. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo D-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	160	190	280	318	314
rato 2	155	198	278	320	319
rato 3	156	195	268	310	320
rato 4	159	178	278	289	332
rato 5	160	187	270	290	320
rato 6	160	200	262	298	342
rato 7	155	206	280	312	329
rato 8	156	228	254	307	317
rato 9	159	234	260	308	320
rato 10	160	234	245	300	341
rato 11	165	224	256	306	324
rato 12	175	226	245	302	322

Anexo 6. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=68)	2ª semana (n=68)	4ª semana (n=50)	6ª semana (n=21)	8ª semana (n=21)
rato 1	112	118	116	118	114
rato 2	116	124	116	124	116
rato 3	114	112	112	112	112
rato 4	112	112	112	112	110
rato 5	114	116	114	116	114
rato 6	116	116	116	116	116
rato 7	114	118	114	118	112
rato 8	114	114	114	114	114
rato 9	112	118	110	118	110
rato 10	120	102	100	100	102
rato 11	104	104	104	104	104
rato 12	120	108	120	100	116
rato 13	120	120	120	120	120
rato 14	104	124	100	124	98
rato 15	102	122	100	98	96
rato 16	100	120	100	100	100
rato 17	102	126	104	126	102
rato 18	102	118	102	102	100
rato 19	102	126	102	122	102
rato 20	106	106	102	102	102
rato 21	108	98	100	108	98
rato 22	100	112	100	-	-
rato 23	98	118	98	-	-
rato 24	100	114	98	-	-
rato 25	100	123	94	-	-
rato 26	120	120	120	-	-
rato 27	122	120	124	-	-
rato 28	124	122	124	-	-
rato 29	120	118	116	-	-
rato 30	116	116	116	-	-
rato 31	114	120	112	-	-
rato 32	116	118	110	-	-
rato 33	100	106	100	-	-
rato 34	106	108	106	-	-
rato 35	108	118	106	-	-
rato 36	108	118	106	-	-

Anexo 6 (continuação). Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=68)	2ª semana (n=68)	4ª semana (n=50)	6ª semana (n=21)	8ª semana (n=21)
rato 37	108	120	105	-	-
rato 38	113	116	113	-	-
rato 39	114	120	114	-	-
rato 40	110	112	106	-	-
rato 41	106	114	106	-	-
rato 42	112	118	108	-	-
rato 43	108	116	108	-	-
rato 44	102	116	102	-	-
rato 45	110	116	102	-	-
rato 46	120	122	102	-	-
rato 47	104	102	104	-	-
rato 48	108	120	108	-	-
rato 49	120	120	108	-	-
rato 50	106	124	106	-	-
rato 51	104	106	-	-	-
rato 52	106	126	-	-	-
rato 53	120	122	-	-	-
rato 54	120	118	-	-	-
rato 55	120	120	-	-	-
rato 56	124	122	-	-	-
rato 57	116	124	-	-	-
rato 58	114	116	-	-	-
rato 59	120	126	-	-	-
rato 60	118	120	-	-	-
rato 61	112	118	-	-	-
rato 62	116	120	-	-	-
rato 63	112	120	-	-	-
rato 64	122	118	-	-	-
rato 65	112	120	-	-	-
rato 66	112	118	-	-	-
rato 67	110	126	-	-	-
rato 68	124	120	-	-	-

Anexo 7. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo 2K-1C durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=46)	2ª semana (n=46)	4ª semana (n=33)	6ª semana (n=15)	8ª semana (n=15)
rato 1	114	160	168	184	180
rato 2	114	156	168	190	174
rato 3	112	160	160	186	178
rato 4	120	143	165	170	189
rato 5	104	172	162	180	180
rato 6	120	165	165	182	182
rato 7	120	168	170	186	178
rato 8	120	142	168	172	188
rato 9	102	140	164	190	194
rato 10	100	148	165	168	192
rato 11	116	140	172	182	180
rato 12	118	154	165	178	182
rato 13	110	145	168	200	186
rato 14	106	142	148	178	200
rato 15	108	145	152	186	190
rato 16	116	148	146	186	186
rato 17	118	150	168	180	190
rato 18	100	150	156	174	187
rato 19	116	142	160	172	192
rato 20	120	134	165	180	184
rato 21	122	136	174	192	186
rato 22	124	138	172	182	190
rato 23	120	140	156	184	-
rato 24	116	128	158	176	-
rato 25	114	128	168	182	-
rato 26	116	128	160	190	-
rato 27	100	124	165	168	-
rato 28	106	120	170	190	-
rato 29	114	138	165	184	-
rato 30	106	140	168	186	-
rato 31	108	142	178	186	-
rato 32	113	150	164	165	-
rato 33	114	128	165	180	-
rato 34	114	136	172	176	-
rato 35	116	136	165	178	-
rato 36	114	145	168	186	-
rato 37	114	148	142	184	-

Anexo 7 (continuação). Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo 2K-1C durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=46)	2ª semana (n=46)	4ª semana (n=33)	6ª semana (n=15)	8ª semana (n=15)
rato 38	118	156	148	162	-
rato 39	115	145	152	168	-
rato 40	120	150	154	180	-
rato 41	120	152	156	165	-
rato 42	116	145	154	162	-
rato 43	118	124	145	176	-
rato 44	100	136	148	170	-
rato 45	112	142	170	178	-
rato 46	102	142	148	172	-

Anexo 8. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=73)	2ª semana (n=73)	4ª semana (n=54)	6ª semana (n=19)	8ª semana (n=19)
rato 1	102	156	152	152	172
rato 2	118	160	148	148	164
rato 3	116	165	156	156	165
rato 4	114	162	160	160	172
rato 5	106	165	165	154	165
rato 6	104	160	162	158	152
rato 7	104	154	165	165	142
rato 8	120	164	160	160	140
rato 9	118	165	154	154	148
rato 10	120	172	164	164	152
rato 11	120	165	165	165	142
rato 12	116	160	172	162	142
rato 13	116	162	165	165	154
rato 14	118	156	160	160	145
rato 15	120	146	162	162	134
rato 16	116	160	156	156	170
rato 17	114	146	146	146	160
rato 18	112	142	160	160	166
rato 19	114	145	146	146	158
rato 20	116	156	142	142	168
rato 21	112	142	145	145	172
rato 22	114	146	156	156	170
rato 23	110	140	142	142	165
rato 24	102	158	146	146	162
rato 25	104	145	140	140	172
rato 26	116	148	164	152	170
rato 27	120	152	165	156	168
rato 28	98	146	172	160	168
rato 29	96	158	165	155	165
rato 30	100	156	168	155	172
rato 31	102	160	148	148	165
rato 32	100	165	152	152	168
rato 33	102	170	146	146	168
rato 34	102	165	162	160	172
rato 35	98	160	156	156	164
rato 36	100	172	160	160	-
rato 37	98	164	165	156	-

Anexo 8 (continuação). Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=73)	2ª semana (n=73)	4ª semana (n=54)	6ª semana (n=19)	8ª semana (n=19)
rato 38	96	172	172	154	-
rato 39	120	165	164	174	-
rato 40	98	152	162	168	-
rato 41	120	142	180	180	-
rato 42	100	140	168	160	-
rato 43	102	148	168	168	-
rato 44	120	152	168	152	-
rato 45	102	142	174	148	-
rato 46	120	142	166	158	-
rato 47	98	154	150	156	-
rato 48	106	145	160	160	-
rato 49	104	134	158	152	-
rato 50	120	160	-	-	-
rato 51	106	162	-	-	-
rato 52	120	156	-	-	-
rato 53	98	146	-	-	-
rato 54	100	150	-	-	-
rato 55	100	146	-	-	-
rato 56	106	142	-	-	-
rato 57	96	145	-	-	-
rato 58	120	142	-	-	-
rato 59	98	142	-	-	-
rato 60	120	146	-	-	-
rato 61	100	140	-	-	-
rato 62	112	146	-	-	-
rato 63	120	132	-	-	-
rato 64	102	130	-	-	-
rato 65	120	142	-	-	-
rato 66	98	142	-	-	-
rato 67	120	138	-	-	-
rato 68	98	146	-	-	-
rato 69	100	150	-	-	-
rato 70	100	146	-	-	-
rato 71	106	142	-	-	-
rato 72	96	145	-	-	-
rato 73	100	140	-	-	-

Anexo 9. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo 2K-1C+L-NAME durante as 8 semanas do estudo.

	Basal (n=42)	2ª semana (n=42)	4ª semana (n=30)	6ª semana (n=11)	8ª semana (n=11)
rato 1	114	128	136	156	168
rato 2	116	139	130	140	168
rato 3	112	112	146	140	160
rato 4	110	128	146	158	165
rato 5	114	114	156	145	162
rato 6	116	130	160	148	165
rato 7	112	134	165	152	170
rato 8	114	134	162	146	168
rato 9	110	138	165	158	164
rato 10	102	140	160	156	165
rato 11	104	140	154	160	172
rato 12	116	132	164	-	-
rato 13	120	145	165	-	-
rato 14	98	132	172	-	-
rato 15	96	134	165	-	-
rato 16	100	138	160	-	-
rato 17	102	136	162	-	-
rato 18	100	128	156	-	-
rato 19	102	138	146	-	-
rato 20	102	128	160	-	-
rato 21	98	128	146	-	-
rato 22	100	130	142	-	-
rato 23	98	138	145	-	-
rato 24	98	140	156	-	-
rato 25	96	142	142	-	-
rato 26	120	150	146	-	-
rato 27	98	132	140	-	-
rato 28	120	140	146	-	-
rato 29	100	146	132	-	-
rato 30	102	132	130	-	-
rato 31	120	130	-	-	-
rato 32	102	128	-	-	-
rato 33	120	142	-	-	-
rato 34	98	138	-	-	-
rato 35	100	142	-	-	-
rato 36	98	134	-	-	-
rato 37	120	132	-	-	-

Anexo 9 (continuação). Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo 2K-1C+L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=42)	2ª semana (n=42)	4ª semana (n=30)	6ª semana (n=11)	8ª semana (n=11)
rato 38	96	130	-	-	-
rato 39	120	142	-	-	-
rato 40	126	142	-	-	-
rato 41	120	154	-	-	-
rato 42	120	146	-	-	-

Anexo 10. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo D-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	114	120	114	120	114
rato 2	116	116	120	102	116
rato 3	112	120	112	108	112
rato 4	114	98	110	122	110
rato 5	110	96	118	100	114
rato 6	102	124	116	104	116
rato 7	110	102	112	123	112
rato 8	118	120	114	115	114
rato 9	116	114	111	120	110
rato 10	112	116	108	122	102
rato 11	114	118	104	116	104
rato 12	120	122	120	118	116

Anexo 11. Valores individuais da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA 0,1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª-semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)				L-NAME (n=7)			
	pré-NORA		pós-NORA		pré-NORA		pós NORA	
mmHg	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE
rato1	102	7	114	5	113	6	120	5
rato 2	92	4	110	4	116	3	116	2
rato 3	94	8	118	8	110	6	128	6
rato 4	104	3	114	9	110	2	122	7
rato 5	92	6	104	5	118	2	130	3
rato 6	96	2	114	6	100	1	125	5
rato 7	90	6	116	7	108	5	125	5
rato 8	108	6	108	8				
Média	96	5,2	112	6,5	111	3,5	124	4,7
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D.P.	5	2,0	5	1,7	6	2,7	5	1,4

Anexo 12. Valores individuais do fluxo coronariano (ϕ Cor, ml/min) e da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μ g (NORA 0,1), nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)				L-NAME (n=7)			
	ϕ Cor (ml/min)		FC (bpm)		ϕ Cor (ml/min)		FC (bpm)	
	pré-NORA	pós-NORA	pré-NORA	pós-NORA	pré-NORA	pós-NORA	pré-NORA	pós-NORA
rato1	13,9	12,1	370	417	12,4	9,6	385	425
rato 2	14,2	12,4	385	435	14,6	12,8	398	436
rato 3	17,2	12,6	362	404	11,7	8,3	413	426
rato 4	12,8	12,0	396	426	11,4	8,2	410	426
rato 5	13,5	11,8	402	418	12,3	8,8	382	420
rato 6	13,9	10,3	387	427	10,4	9,4	426	435
rato 7	12,4	10,2	390	418	12,4	10,2	378	448
rato 8	14,2	11,3	370	398				
X	14,0	11,6	382	417	12,2	9,5	398	430
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D.P.	1,4	0,9	14	12	1,2	1,4	19	10

Anexo 13. Valores individuais da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/ PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)			L-NAME (n=7)		
	PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)	PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)
rato1	95	0,536	177	103	0,678	151
rato 2	87	0,545	159	110	0,724	151
rato 3	99	0,641	154	109	0,695	143
rato 4	96	0,548	175	110	0,712	154
rato 5	97	0,596	162	115	0,731	157
rato 6	86	0,569	151	105	0,704	149
rato 7	89	0,560	158	106	0,693	152
rato 8	84	0,523	160			
X	91	0,565	162	108	0,705	151
±	±	±	±	±	±	±
D.P.	5	0,038	9	6	0,019	5

Anexo 14. Valores individuais da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (Δ PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (Δ PD/ PVE, mmHg/g) nos grupos CONTROLE e L-NAME ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)			L-NAME (n=7)		
	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)
rato1	14	0,536	26	19	0,678	28
rato 2	20	0,545	36	8	0,724	11
rato 3	12	0,641	18	13	0,695	18
rato 4	20	0,548	36	8	0,712	11
rato 5	14	0,596	23	12	0,731	16
rato 6	14	0,569	24	15	0,704	21
rato 7	20	0,560	35	11	0,693	16
rato 8	17	0,523	32			
X	16,3	0,565	28,8	12,3	0,705	17,3
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D.P.	3,0	0,038	5,9	4,0	0,019	5,7

Anexo 15. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo CONTROLE avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas.

SEGUNDA SEMANA (n=18)		QUARTA SEMANA (n=29)		OITAVA SEMANA (n=21)	
PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)
0,5368	0,3871	0,6828	0,4925	0,7401	0,4935
0,5455	0,3765	0,5713	0,4328	0,6948	0,4567
0,6413	0,4674	0,5404	0,3911	0,6434	0,4935
0,6482	0,4785	0,6433	0,4817	0,6365	0,4468
0,5968	0,4438	0,6383	0,4698	0,6675	0,4636
0,5608	0,4144	0,6147	0,4678	0,6493	0,5254
0,5695	0,4487	0,6125	0,4039	0,7365	0,5345
0,5238	0,3721	0,5835	0,4425	0,6408	0,4678
0,6733	0,4384	0,6741	0,5153	0,7055	0,5327
0,5834	0,4296	0,7173	0,5468	0,7142	0,5146
0,7431	0,5192	0,5642	0,4432	0,6434	0,4935
0,6054	0,4669	0,5239	0,3667	0,6453	0,4468
0,5695	0,4785	0,6381	0,4845	0,6434	0,4935
0,5436	0,4396	0,6052	0,4745	0,7308	0,4783
0,6132	0,4201	0,4912	0,3559	0,6823	0,4924
0,6413	0,4487	0,6433	0,4817	0,6642	0,4763
0,6482	0,3721	0,7302	0,4789	0,6575	0,4778
0,5968	0,4107	0,6147	0,4678	0,6756	0,4395
		0,6828	0,4925	0,7182	0,4853
		0,5713	0,4328	0,6342	0,4872
		0,5404	0,3911	0,6389	0,4476
		0,6433	0,4817	0,6214	0,4398
		0,6642	0,5143		
		0,7173	0,5468		
		0,6501	0,4817		
		0,6383	0,4698		
		0,6741	0,5052		
		0,7163	0,5478		
		0,5713	0,4202		
0,6022 ± 0,0561	0,4340 ± 0,0408	0,6261 ± 0,0623	0,4648 ± 0,0505	0,6719 ± 0,0373	0,4812 ± 0,0288

Anexo 16. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo 2K-1C avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

SEGUNDA SEMANA (n=13)		QUARTA SEMANA (n=18)		OITAVA SEMANA (n=15)	
PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)
0,5993	0,4682	0,5916	0,4633	0,7132	0,5783
0,4752	0,358	0,5102	0,3782	0,7778	0,6008
0,6225	0,494	0,6326	0,4717	0,6871	0,5019
0,6706	0,522	0,6392	0,5046	0,8314	0,6823
0,6365	0,4727	0,6803	0,5168	0,8147	0,6235
0,508	0,3942	0,5754	0,4039	0,7338	0,5577
0,5302	0,4101	0,5573	0,4294	0,8115	0,6047
0,5784	0,4426	0,5539	0,3903	0,6876	0,5495
0,6653	0,5463	0,6067	0,4628	0,7453	0,5318
0,6843	0,5342	0,6227	0,4759	0,6345	0,5102
0,5874	0,4398	0,6385	0,4811	0,8147	0,6235
0,5761	0,4002	0,6601	0,5275	0,7338	0,5672
0,5087	0,3928	0,6326	0,4717	0,7352	0,5471
		0,6392	0,5046	0,8082	0,6231
		0,6753	0,4986	0,7825	0,5983
		0,5916	0,4633		
		0,5501	0,3987		
		0,5129	0,3765		
0,5878	0,4519	0,6039	0,4566	0,7487	0,5776
±	±	±	±	±	±
0,0675	0,0601	0,0517	0,0487	0,0622	0,0523

Anexo 17. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo L-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores abaixo da tabela representam as médias e o desvios-padrão.

SEGUNDA SEMANA (n=19)		QUARTA SEMANA (n=35)		OITAVA SEMANA (n=19)	
PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)
0,6895	0,5361	0,5897	0,4515	0,7239	0,5369
0,5788	0,4581	0,6071	0,3839	0,6785	0,4902
0,6213	0,4428	0,5642	0,4518	0,6526	0,4751
0,5286	0,3995	0,5239	0,3667	0,6817	0,5281
0,5487	0,4105	0,5902	0,4845	0,6022	0,4446
0,5541	0,4231	0,6052	0,4745	0,6862	0,5251
0,5811	0,4357	0,4912	0,3559	0,7329	0,5437
0,5542	0,4198	0,5139	0,4165	0,7234	0,5461
0,5429	0,4372	0,6428	0,4963	0,8145	0,6348
0,5879	0,4532	0,5948	0,4693	0,7677	0,6003
0,5427	0,4339	0,6147	0,4678	0,7338	0,5577
0,5608	0,4144	0,6125	0,4039	0,7259	0,5129
0,5348	0,4487	0,5835	0,4425	0,6876	0,5495
0,5129	0,3721	0,6452	0,4989	0,7126	0,5201
0,6268	0,4235	0,6842	0,5301	0,7132	0,5562
0,5834	0,4296	0,5642	0,4132	0,6782	0,5341
0,6653	0,4902	0,5239	0,3667	0,6871	0,5019
0,6054	0,4669	0,5247	0,3861	0,6658	0,5128
0,5782	0,4651	0,5361	0,4215	0,8014	0,5903
		0,6052	0,4745	0,7469	0,5671
		0,5521	0,4132	0,6022	0,4446
		0,5478	0,4108	0,6483	0,4986
		0,5996	0,4492	0,6333	0,4879
		0,5863	0,4502	0,6975	0,5128
		0,5705	0,3907		
		0,5843	0,4153		
		0,5349	0,3974		
		0,5347	0,3876		
		0,6007	0,4656		
		0,5792	0,4216		
		0,5648	0,3987		
		0,6024	0,4817		

Anexo 17 (continuação). Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo L-NAME avaliados ao final da 2^a, 4^a e 8^a semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada

		0,5946	0,4872		
		0,5736	0,4429		
		0,5649	0,4287		

0,5788	0,4400	0,5773	0,4341	0,6998	0,5279
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
0,0462	0,0354	0,04044	0,0429	0,0535	0,0451

Anexo 18. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo 2K-1C+L-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvio-padrão para cada variável analisada.

SEGUNDA SEMANA (n=12)		QUARTA SEMANA (n=19)		OITAVA SEMANA (n=11)	
PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)	PCTotal (g)	PVE (g)
0,5989	0,4397	0,5946	0,4582	0,5989	0,4397
0,5993	0,4561	0,5266	0,4069	0,8023	0,6223
0,4752	0,3648	0,5812	0,4606	0,8223	0,5831
0,6225	0,4963	0,5409	0,4206	0,6896	0,5189
0,6706	0,5348	0,5746	0,4259	0,7786	0,5706
0,6653	0,5463	0,5671	0,4376	0,6351	0,4536
0,6843	0,5342	0,5784	0,4433	0,8305	0,6003
0,5874	0,4537	0,6389	0,4677	0,7001	0,5244
0,5761	0,4421	0,6002	0,5421	0,6878	0,5146
0,5087	0,4239	0,5099	0,4391	0,6549	0,5001
0,5487	0,4105	0,5872	0,3645	0,7361	0,5349
0,5541	0,4231	0,6281	0,4963		
		0,5948	0,4693		
		0,5984	0,4238		
		0,6052	0,4745		
		0,5521	0,4132		
		0,5249	0,3769		
		0,6002	0,4817		
		0,5768	0,4632		
0,5843 ± 0,0593	0,4528 ± 0,0533	0,5779 ± 0,0343	0,4455 ± 0,0416	0,7214 ± 0,0784	0,5329 ± 0,0575

Anexo 19. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal) e do peso ventricular esquerdo (PVE), expressos em gramas, dos animais do grupo D-NAME ao final da 8ª semana do estudo. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

OITAVA SEMANA (n=11)	
PCTotal (g)	PVE (g)
0,6761	0,4582
0,6349	0,4697
0,6239	0,4762
0,5762	0,4298
0,6259	0,4391
0,5903	0,4395
0,6106	0,4324
0,6291	0,4436
0,6334	0,4273
0,6459	0,4983
0,6328	0,4761
0,6198	0,4678
0,6249	0,4548
$\pm$	$\pm$
0,0254	0,0227

Anexo 20, Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), em mg/g, do grupo CONTROLE ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas (médias e o desvios-padrão).

SEGUNDA SEMANA (n=18)		QUARTA SEMANA (n=29)		OITAVA SEMANA (n=21)	
PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)
2,71	1,95	2,52	1,82	2,14	1,43
3,20	2,21	2,05	1,55	1,96	1,29
3,44	2,51	1,73	1,25	1,86	1,43
2,97	2,19	2,06	1,54	1,79	1,26
3,73	2,77	2,00	1,47	1,99	1,38
2,81	2,08	2,21	1,68	1,86	1,50
2,46	1,94	2,05	1,35	2,05	1,49
2,38	1,69	1,95	1,48	1,81	1,32
3,03	1,97	2,42	1,85	2,02	1,52
2,65	1,95	2,47	1,88	2,10	1,51
3,40	2,38	1,94	1,52	1,72	1,32
2,77	2,14	1,79	1,25	1,82	1,26
2,66	2,23	2,17	1,65	1,70	1,30
2,50	2,02	2,10	1,65	2,08	1,36
2,74	1,88	1,69	1,23	1,83	1,32
2,92	2,04	2,29	1,72	1,86	1,33
2,80	1,61	2,61	1,71	1,91	1,39
2,61	1,80	2,11	1,61	1,87	1,22
		2,30	1,66	1,95	1,32
		1,93	1,46	1,73	1,33
		1,86	1,34	1,86	1,30
		2,33	1,74		
		2,32	1,79		
		2,76	2,11		
		2,43	1,80		
		2,31	1,70		
		2,37	1,77		
		2,37	1,81		
		1,99	1,46		
2,78 ± 0,36	2,00 ± 0,28	2,18 ± 0,26	1,62 ± 0,21	1,90 ± 0,12	1,36 ± 0,08

Anexo 21. Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em mg/g, dos animais do grupo 2K-1C avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

SEGUNDA SEMANA (n=13)		QUARTA SEMANA (n=18)		OITAVA SEMANA (n=15)	
PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)
2,87	2,24	2,22	1,74	2,10	1,70
2,34	1,76	1,89	1,40	2,07	1,60
3,02	2,40	2,33	1,74	2,00	1,46
3,09	2,41	2,35	1,86	2,20	1,81
2,92	2,17	2,55	1,94	2,34	1,79
2,28	1,77	2,08	1,46	1,97	1,50
2,30	1,78	2,10	1,62	2,31	1,72
2,70	2,07	2,18	1,54	2,00	1,60
2,94	2,42	2,34	1,79	2,07	1,48
3,84	3,00	2,43	1,86	1,73	1,39
3,38	2,53	2,42	1,82	2,26	1,73
3,05	2,12	2,58	2,06	2,15	1,66
2,53	1,95	2,43	1,81	2,18	1,72
		2,46	1,94	2,31	1,70
		2,61	1,93	2,22	1,88
		2,37	1,85		
		2,07	1,50		
		1,94	1,42		
2,87 ± 0,45	2,35 ± 0,36	2,40 ± 0,21	1,84 ± 0,20	2,10 ± 0,17	1,58 ± 0,14

Anexo 22. Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), em mg/g, do grupo L-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão.

SEGUNDA SEMANA (n=19)		QUARTA SEMANA (n=35)		OITAVA SEMANA (n=19)	
PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)
3,15	2,45	2,12	1,62	2,31	1,71
2,69	2,13	2,27	1,44	2,06	1,49
2,82	2,01	1,97	1,57	1,96	1,43
2,44	1,84	1,81	1,27	2,05	1,59
2,47	1,85	2,06	1,69	1,77	1,31
2,48	1,90	2,26	1,77	2,01	1,54
2,52	1,89	1,78	1,29	2,23	1,65
2,59	1,96	1,91	1,55	2,21	1,66
2,40	1,93	2,41	1,86	2,42	1,89
2,97	2,29	2,13	1,68	2,19	1,72
2,71	2,17	2,28	1,73	2,26	1,72
2,97	2,19	2,20	1,45	2,12	1,50
2,66	2,23	2,05	1,56	2,08	1,67
2,44	1,77	2,32	1,79	2,22	1,62
3,10	2,10	2,69	2,09	2,23	1,74
2,68	1,97	2,11	1,55	2,09	1,65
3,14	2,31	1,95	1,37	2,08	1,52
3,07	2,37	1,82	1,34	2,02	1,55
2,92	2,35	1,93	1,52	2,49	1,83
		2,19	1,72		
		1,92	1,44		
		1,97	1,48		
		2,17	1,63		
		2,11	1,62		
		2,05	1,41		
		2,10	1,49		
		2,00	1,48		
		1,92	1,39		
		2,22	1,72		
		2,21	1,61		
		2,02	1,42		

Anexo 22 (continuação). Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em mg/g, dos animais do grupo L-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

		2,37	1,90		
		2,29	1,87		
		2,34	1,81		
		2,05	1,55		

2,76	2,11	2,13	1,59	2,11	1,60
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
0,11	0,12	0,14	0,19	0,17	0,14

Anexo 23. Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em mg/g, dos animais do grupo 2K-1C+L-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

SEGUNDA SEMANA (n=12)		QUARTA SEMANA (n=19)		OITAVA SEMANA (n=11)	
PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)	PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)
3,12	2,29	2,67	2,05	1,92	1,35
3,12	2,38	2,28	1,89	2,33	1,80
2,31	1,77	2,39	1,90	2,40	1,70
2,87	2,29	2,34	1,82	1,92	1,44
3,08	2,45	2,50	1,85	2,24	1,64
3,14	2,58	2,54	1,96	1,88	1,27
2,96	2,31	2,18	1,67	2,36	1,71
2,74	2,12	2,52	1,84	2,10	1,57
2,88	2,21	2,45	2,21	1,97	1,47
2,69	2,24	2,10	1,81	1,87	1,43
3,15	2,36	2,51	1,56	2,13	1,55
2,93	2,24	2,73	2,16		
		2,59	2,04		
		2,26	1,60		
		2,29	1,80		
		2,14	1,60		
		2,05	1,47		
		2,25	1,80		
		2,27	1,82		

3,04	2,22	2,39	1,81	2,14	1,64
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
0,22	0,18	5,21	4,03	0,22	0,16

Anexo 24. Valores individuais do peso cardíaco relativo (PCRelat) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), expressos em mg/g, dos animais do grupo D-NAME avaliados ao final da 2ª, 4ª e 8ª semanas. Os valores colocados na parte inferior da tabela representam as médias e o desvios-padrão para cada variável analisada.

OITAVA SEMANA (n=11)	
PCRelat (mg/g)	PVERelat (mg/g)
2,15	1,45
1,99	1,47
1,94	1,48
1,73	1,29
1,95	1,37
1,72	1,28
1,85	1,31
1,98	1,39
1,97	1,33
1,89	1,46
1,95	1,46
1,92	1,45
1,92 ± 0,11	1,40 ± 0,07

Anexo 25. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=11)	2ª semana (n=11)	4ª semana (n=11)	6ª semana (n=11)	8ª semana (n=11)
rato 1	210	270	290	320	350
rato 2	200	270	280	315	320
rato 3	200	250	270	305	345
rato 4	215	270	280	325	340
rato 5	180	240	270	326	315
rato 6	200	260	290	320	340
rato 7	190	250	270	310	325
rato 8	200	270	280	320	355
rato 9	200	270	290	320	340
rato 10	190	260	280	330	345
rato 11	185	260	290	325	325

Anexo 26. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=8)	2ª semana (n=8)	4ª semana (n=8)	6ª semana (n=8)	8ª semana (n=8)
rato 1	200	270	290	325	375
rato 2	195	270	260	315	315
rato 3	210	270	280	355	390
rato 4	190	210	240	255	310
rato 5	180	270	290	340	360
rato 6	205	270	280	260	300
rato 7	195	270	300	275	330
rato 8	190	270	290	280	330

Anexo 27. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo L-NAME + ENAL durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	200	247	256	266	300
rato 2	196	261	278	292	345
rato 3	165	236	254	269	310
rato 4	213	257	268	275	320
rato 5	217	250	259	269	315
rato 6	210	248	262	272	330
rato 7	197	242	262	274	350
rato 8	192	247	267	279	280
rato 9	188	22	243	257	335
rato 10	204	236	253	250	305
rato 11	205	229	245	268	325
rato 12	183	210	226	237	315

Anexo 28. Valores individuais de peso corporal, expressos em gramas, do grupo ENAL durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	191	247	259	269	325
rato 2	206	224	252	268	300
rato 3	194	245	270	282	310
rato 4	183	233	255	265	310
rato 5	181	247	258	264	300
rato 6	187	247	288	302	320
rato 7	190	232	261	281	325
rato 8	207	256	274	289	320
rato 9	196	236	259	270	310
rato 10	211	256	282	301	320
rato 11	216	254	285	305	330
rato 12	233	231	301	315	350

Anexo 29. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo CONTROLE durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	160	190	280	318	314
rato 2	155	198	278	320	319
rato 3	156	195	268	310	320
rato 4	159	178	278	289	332
rato 5	160	187	270	290	320
rato 6	160	200	262	298	342
rato 7	155	206	280	312	329
rato 8	156	228	254	307	317
rato 9	159	234	260	308	320
rato 10	160	234	245	300	341
rato 11	165	224	256	306	324
rato 12	175	226	245	302	322

Anexo 30. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo L-NAME durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=8)	2ª semana (n=8)	4ª semana (n=8)	6ª semana (n=8)	8ª semana (n=8)
rato 1	120	130	140	149	155
rato 2	120	180	184	216	200
rato 3	112	190	190	180	195
rato 4	116	156	145	139	150
rato 5	118	160	210	234	205
rato 6	112	162	158	185	205
rato 7	102	140	148	140	140
rato 8	106	134	136	134	140

Anexo 31, Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo L-NAME + ENAL durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	112	150	139	138	134
rato 2	110	130	130	126	128
rato 3	120	132	139	124	128
rato 4	122	132	126	114	114
rato 5	120	129	116	118	120
rato 6	108	150	140	124	114
rato 7	116	118	116	120	130
rato 8	118	140	130	124	126
rato 9	120	136	124	120	124
rato 10	120	138	120	120	118
rato 11	132	110	110	110	110
rato 12	124	130	128	130	140

Anexo 32. Valores individuais de pressão arterial de cauda, expressos em mmHg, do grupo ENAL durante as 8 semanas do estudo

	Basal (n=12)	2ª semana (n=12)	4ª semana (n=12)	6ª semana (n=12)	8ª semana (n=12)
rato 1	120	120	114	112	116
rato 2	120	118	110	100	100
rato 3	118	120	108	102	106
rato 4	116	118	100	100	90
rato 5	114	116	100	98	102
rato 6	116	114	90	96	106
rato 7	120	114	84	90	108
rato 8	122	120	106	102	104
rato 9	130	112	84	90	100
rato 10	100	108	100	98	100
rato 11	114	114	102	102	100
rato 12	120	110	94	112	112

Anexo 33. Valores individuais da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE, mmHg), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 µg (NORA 0,1), nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)				L-NAME (n=7)				L-NAME + ENAL (n=6)				ENAL (n=5)			
	pré-NORA		pós-NORA		pré-NORA		pós-NORA		pré-NORA		pós-NORA		pré-NORA		pós-NORA	
	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE	PSVE	PDFVE
rato 1	97	7	111	5	104	6	123	5	100	7	115	5	88	6	102	5
rato 2	92	4	112	4	118	3	126	2	96	4	107	4	94	3	102	4
rato 3	102	8	114	8	114	6	127	6	100	8	109	8	96	6	110	8
rato 4	100	3	120	9	112	2	120	7	102	3	116	9	92	2	108	9
rato 5	100	6	114	5	119	2	131	3	100	6	112	5	86	2	103	5
rato 6	94	2	108	6	108	1	123	5	104	2	120	6	-	1	-	6
rato 7	94	6	114	7	108	5	119	5	-	-	-	-	-	-	-	-
rato 8	89	6	106	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	96	6,2	112	6,6	111	3,6	124	4,7	98	6,2	112	6,5	96	6,2	112	6,6
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
D.P.	5	2,0	6	1,7	6	2,7	6	1,4	6	2,0	6	1,7	6	2,0	6	1,7

Anexo 34. Valores individuais do fluxo coronariano (ϕCor , ml/min) e da frequência de batimentos cardíacos (FC, bpm), antes e após a administração de noradrenalina 0,1 μg (NORA 0,1), nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)				L-NAME (n=7)				L-NAME +ENAL (n=6)				ENAL (n=5)			
	ϕCor (ml/min)		FC (bpm)		ϕCor (ml/min)		FC (bpm)		ϕCor (ml/min)		FC (bpm)		ϕCor (ml/min)		FC (bpm)	
	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA	pré- NORA	pós- NORA
rato 1	13,9	12,1	13,9	12,1	12,4	9,6	385	425	11,5	9,2	380	420	14,2	13,1	382	410
rato 2	14,2	12,4	14,2	12,4	14,6	12,4	398	436	13,3	10,6	402	430	15,6	12,3	385	432
rato 3	17,2	12,6	17,2	12,6	11,7	8,3	413	426	10,1	8,3	410	422	15,7	12,6	368	412
rato 4	12,8	12,0	12,8	12,0	11,4	8,2	410	426	11,4	8,0	418	440	13,5	11,5	396	432
rato 5	13,5	11,8	13,5	11,8	12,3	8,8	382	420	13,2	8,8	390	412	14,2	11,4	386	404
rato 6	13,9	10,3	13,9	10,3	10,4	9,4	426	435	10,6	9,2	416	430	-	-	-	-
rato 7	12,4	10,2	12,4	10,2	12,4	10,2	378	448	-	-	-	-	-	-	-	-
rato 8	14,2	11,3	14,2	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X	14,0	11,6	14,0	11,6	382	417	12,2	9,5	398	430	382	417	12,2	9,5	398	430
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D.P.	1,4	0,9	1,4	0,9	14	12	1,2	1,4	19	10	14	12	1,2	1,4	19	10

Anexo 35. Valores individuais da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/ PVE, mmHg/g) nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)				L-NAME (n=7)				L-NAME +ENAL (n=6)				ENAL (n=5)			
	PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)		PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)		PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)		PD (mmHg)	PVE (g)	PD/PVE (mmHg/g)	
rato1	95	0,536	177		103	0,678	151		97	0,577	168		82	0,598	137	
rato 2	87	0,545	159		110	0,724	151		94	0,612	153		90	0,525	171,4	
rato 3	99	0,641	154		109	0,695	143		100	0,589	169		88	0,574	153	
rato 4	96	0,548	175		110	0,712	154		95	0,583	162		90	0,592	152	
rato 5	97	0,596	162		115	0,731	157		96	0,542	177		86	0,605	142	
rato 6	86	0,569	151		105	0,704	149		97	0,595	163		-	-	-	
rato 7	89	0,560	158		106	0,693	152		-	-	-		-	-	-	
rato 8	84	0,523	160		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
X	91	0,565	162		91	0,705	162		108	0,583	151		108	0,579	151	
±	±	±	±		±	±	±		±	±	±		±	±	±	
D.P.	5	0,038	9		5	0,019	9		6	0,023	5		6	0,032	5	

Anexo 36. Valores individuais da variação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PD, mmHg) e seus valores normalizados para o peso ventricular esquerdo (PD/ PVE, mmHg/g) nos 4 grupos experimentais ao final da 8ª semana de estudo (Preparação de Langendorff para coração isolado).

	CONTROLE (n=8)			L-NAME (n=7)			L-NAME + ENAL (n=6)			ENAL (n=5)		
	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)	Δ PD (mmHg)	PVE (g)	Δ PD/PVE (mmHg/g)
rato1	14	0,536	26	14	0,678	26	19	0,577	28	19	0,598	28
rato 2	20	0,545	36	20	0,724	36	8	0,612	11	8	0,525	11
rato 3	12	0,641	18	12	0,695	18	13	0,589	18	13	0,574	18
rato 4	20	0,548	36	20	0,712	36	8	0,583	11	8	0,592	11
rato 5	14	0,596	23	14	0,731	23	12	0,542	16	12	0,605	16
rato 6	14	0,569	24	14	0,704	24	15	0,595	21	15		21
rato 7	20	0,560	35	20	0,693	35	11	-	16	11	-	16
rato 8	17	0,523	32	17	-	32	-	-	-	-	-	-
X	16,3	0,565	28,8	16,3	0,705	28,8	12,3	0,583	17,3	12,3	0,579	17,3
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D.P.	3,0	0,038	5,9	3,0	0,019	5,9	4,0	0,023	5,7	4,0	0,032	5,7

Anexo 37. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal, g), peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g), peso ventricular esquerdo (PVE, g) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) dos animais do grupo CONTROLE avaliados, ao final da 8ª semana de estudo.

	PCTotal (g)	PCRelat (mg/g)	PVE (g)	PVERelat (mg/g)
rato1	629	1,91	485	1,47
rato 2	607	1,90	443	1,38
rato 3	638	1,85	471	1,37
rato 4	647	1,90	482	1,42
rato 5	600	1,90	437	1,39
rato 6	629	1,85	468	1,38
rato 7	637	1,96	431	1,33
rato 8	664	1,87	452	1,27
rato 9	645	1,90	476	1,40
rato 10	631	1,83	455	1,32
rato 11	618	1,90	438	1,35

Média	631	1,89	458	1,36
± DP	± 18	± 0,04	± 19	± 0,05

Anexo 38. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal, g), peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g), peso ventricular esquerdo (PVE, g) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) dos animais do grupo L-NAME, avaliados ao final da 8ª semana de estudo.

	PCTotal (g)	PCRelat (mg/g)	PVE (g)	PVERelat (mg/g)
rato1	725	1,93	541	1,44
rato 2	715	2,27	547	1,74
rato 3	746	1,91	528	1,35
rato 4	718	2,32	572	1,85
rato 5	736	2,04	569	1,58
rato 6	663	2,21	505	1,68
rato 7	783	2,37	572	1,73
rato 8	637	1,93	468	1,42
Média	715	2,12	538	1,60
$\pm$ DP	$\pm$ 46	$\pm$ 0,19	$\pm$ 37	$\pm$ 0,18

Anexo 39. Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal, g), peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g), peso ventricular esquerdo (PVE, g) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) dos animais do grupo L-NAME+ENAL, avaliados ao final da 8ª semana de estudo.

	PCTotal (g)	PCRelat (mg/g)	PVE (g)	PVERelat (mg/g)
rato1	582	1,94	467	1,56
rato 2	627	1,82	542	1,57
rato 3	554	1,79	451	1,45
rato 4	572	1,79	461	1,44
rato 5	590	1,87	483	1,53
rato 6	596	1,81	507	1,54
rato 7	602	1,72	497	1,42
rato 8	526	1,88	408	1,46
rato 9	614	1,83	489	1,46
rato 10	578	1,90	462	1,51
rato 11	625	1,92	507	1,56
rato 12	569	1,81	428	1,36
Média	586	1,84	475	1,48
± DP	± 29	± 0,06	± 37	± 0,06

Anexo 40, Valores individuais do peso cardíaco total (PCTotal, g), peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g), peso ventricular esquerdo (PVE, g) e do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g) dos animais do grupo ENAL, avaliados ao final da 8ª semana de estudo.

	PCTotal (g)	PCRelat (mg/g)	PVE (g)	PVERelat (mg/g)
rato1	593	1,82	493	1,52
rato 2	578	1,93	502	1,67
rato 3	589	1,90	478	1,54
rato 4	601	1,94	455	1,47
rato 5	585	1,95	446	1,49
rato 6	576	1,80	489	1,53
rato 7	592	1,82	492	1,51
rato 8	612	1,91	452	1,41
rato 9	642	2,07	479	1,55
rato 10	608	1,90	501	1,57
rato 11	601	1,82	489	1,48
rato 12	619	1,77	474	1,35
Média	599	1,89	479	1,50
$\pm$ DP	$\pm$ 19	$\pm$ 0,08	$\pm$ 19	$\pm$ 0,08

8.

***Trabalhos submetidos ou publicados
durante o período de doutoramento
(junho de 1993 a setembro de 1995)***

- 1- **Moreno Jr, H.** & de Nucci, G. Hipertensão Arterial e inibição crônica da síntese de óxido nítrico (revisão). *HiperAtivo* (Órgão de divulgação do Departamento de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia), 2(2):32-38, 1995.
- 2 - **Moreno Jr, H.**, Metze, K., Antunes, E., Zatz, R. & de Nucci, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy. *Basic Research in Cardiology* (recebido em 10/04/1995, revisado em 23/08/95).
- 3- **Moreno, Jr H.**, Nathan, L.P., Metze, K., Antunes, E., Zatz, R. & de Nucci, G.. Enalapril does not prevent the ischemia-induced cardiac alterations caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *European Journal of Pharmacology* (recebido em 01/06/95, revisado em 19/08/95).
- 4- Costa, S.K.P., **Moreno Jr, H.**, de Nucci, G. & Antunes, E.. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. *European Journal of Pharmacology* (submetido em 15/08/1994; recebido em 30/08/1994; rejeitado em 05/11/94; resubmetido em 13/07/95)
- 5 - Zappellini, A., **Moreno Jr, H.**, Antunes, E. & de Nucci, G.. Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the haemodynamic effects of Nw-nitro-L-arginine methyl ester in anaesthetised dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (recebido em 02/05/95, revisado em 15/08/95).
- 6- Zappellini, A., **Moreno Jr, H.**, Antunes, E. & de Nucci, G.. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anaesthetised dogs. *British Journal of Pharmacology* (recebido em 08/06/95).

7- Ribeiro, W., Muscará, M.N., Martins, A.R., **Moreno Jr, H.**, Mendes, G.B. & de Nucci, G. Bioequivalence study of two enalapril maleate tablet formulations in healthy male volunteers. Pharmacokinetics vs. pharmacodynamics approach. *European Journal of Clinical Pharmacology* (submetido em 20/05/95).

8- Medeiros, M.V., Binhara, I.M., Bento, A.C., **Moreno Jr, H.**, de Nucci, G. & Antunes, E. Effect of chronic nitric oxide blockade on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *European Journal of Pharmacology* (in press).

9 - Poli, A., Moreno, R.A., Ribeiro, W., Dias, H.B., **Moreno Jr, H.**, Muscará, M.N. & de Nucci, G. Influence of gastric acid secretion blockade and food intake on the bioavailability of a potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (recebido em 24/05/95).

HIPERTENSÃO ARTERIAL E INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO.

HEITOR MORENO JÚNIOR & GILBERTO DE NUCCI
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS-UNICAMP
CAMPINAS-SP

1995

INTRODUÇÃO

Até o início da década de 80, aceitava-se como sendo o endotélio responsável por funções meramente físicas, como as de constituir uma barreira seletivamente permeável entre os meios e extravascular e de manter o padrão de fluxo sanguíneo laminar (sem turbulências) no sistema vascular. Em 1980, Furchgott e Zawadzki¹ demonstraram ser a presença do endotélio fundamental na modulação da motricidade vascular. Os mesmos pesquisadores, postularam a existência de um fator de relaxamento derivado do endotélio (endothelium-derived relaxing factor, EDRF), que mais tarde, foi identificado química e farmacologicamente como sendo o óxido nítrico^{2,3,4}. A estas descobertas, seguiram-se outras, atribuindo ao endotélio a responsabilidade pela síntese de substâncias vasoativas, de substâncias moduladoras da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea, de fatores reguladores da trombogênese, da mitogênese e do metabolismo de lipoproteínas⁵. No entanto, no que tange a avanços na fisiopatologia da hipertensão arterial, os estudos sobre os mecanismos de produção e de inibição da síntese de NO têm sido os mais relevantes. Demonstrou-se que a produção de NO pelo endotélio é feita a partir de um aminoácido, a L-arginina, substrato para a enzima óxido nítrico-sintetase⁶ (Palmer 1988). Assim, este sistema seria, em última análise, o principal responsável endógeno pela manutenção do tono vasodilatador. Por outro lado, a utilização de análogos da L-arginina em estudos em animais e em humanos, promovendo a inibição da produção de NO, e conseqüentemente tendência a redução do tono vasodilatador, constitui importante ferramenta para o melhor conhecimento da fisiopatologia da hipertensão arterial (HA) e da isquemia miocárdica. Este modelo fisiopatológico também tem permitido o estudo mais detalhado de uma hipótese bastante plausível, porém não comprovada, de que patologias aparentemente distintas como a hipertensão arterial, o diabetes melito e a hipercolesterolemia, entre outras, possam levar à disfunção endotelial e finalmente ao comprometimento isquêmico do miocárdio.

INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE NO

O NO é sintetizado a partir de um átomo de nitrogênio do terminal guanidina da L-arginina, a qual por sua vez é convertida em L-citrulina⁷ por ação da NO-sintetase constitutiva^{8,9} em reação dependente da presença de cálcio, NADPH e calmodulina (figura 1). O NO produzido age estimulando a guanilato-ciclase nas células musculares lisas dos vasos, causando um aumento intracelular de 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), levando a reduções do influxo de cálcio através do sarcolema e da liberação do íon de seus depósitos intracelulares⁵. A conversão de L-arginina em NO é específica porque análogos de L-arginina, inclusive seu enantiômero a D-arginina, não são substratos para esta reação. Portanto, estes análogos são reconhecidos como inibidores da síntese de NO (figura 2).

INIBIDORES DA SÍNTESE DE NO

Várias substâncias promovem maior liberação de NO, entre elas, a acetilcolina, a substância P, a bradicinina e a histamina. Outras, análogas à L-arginina, como a NG-monometil-L-arginina¹⁰ (L-NMMA), a NG-amino-arginina¹¹ (L-NAA), a NG-nitro-L-arginina-metil-éster¹² (L-NAME) e a N-iminoetil-L-ornitina¹³ (L-NIO), inibem a síntese de NO de forma dose-dependente e específica. Embora a L-NIO seja aproximadamente 5 vezes mais potente que os demais inibidores, do ponto de vista qualitativo não há diferenças entre eles, quando avaliados os efeitos cardiovasculares¹⁴. A diversidade de potência desses compostos sobre o tecido vascular *in vitro* e *in vivo* parece ser devida a diferenças quanto à captação, distribuição e metabolismo dos mesmos¹⁴. Comparadas aos demais inibidores, apenas a L-NMMA e a L-NAME são ativas por via oral¹⁵.

1. INIBIÇÃO AGUDA DA SÍNTESE DE NO

Os inibidores da produção de NO induzem aumento da resistência arterial sistêmica e redução significativa do débito cardíaco, resultando em aumento da pressão arterial média, dose-dependente¹⁶. Estes efeitos são mantidos se a infusão for continuada por mais de 6 horas, indicando que os sistemas reguladores na vasculatura não são capazes de reacomodar o fluxo sanguíneo a níveis basais¹⁵. Por outro lado, estes efeitos são prontamente revertidos pela L-arginina, que antagoniza todas as ações dessas substâncias¹⁷. Em humanos saudáveis, a infusão de L-NMMA na artéria braquial e em veias dorsais da mão, induz vasoconstrição direta apenas na artéria, o que sugere uma produção/liberação contínua de óxido nítrico no sistema arterial em maior grau que no venoso^{18,19}.

A utilização de L-NMMA (30 mg/kg) em ratos em modelo de choque séptico não responsivo à terapêutica convencional, resultou em aumento na pressão arterial e na resistência vascular periférica dose-dependente²⁰. A utilização de inibidores da síntese de NO em pacientes com choque séptico, realizada em escassos estudos, tem demonstrado efeito benéfico na recuperação do quadro hemodinâmico^{21,22}, inclusive com melhor responsividade pressórica à infusão de catecolaminas²². No entanto, desconhece-se outros possíveis efeitos deletérios dessas drogas, principalmente a nível cardíaco e renal, sendo portanto a indicação de inibidores da síntese de NO controversa nesta condição²⁰. A abordagem mais profunda deste assunto foge aos interesses desta revisão.

2. INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE NO

Por razões éticas, não se conhecem os efeitos da administração crônica de inibidores da síntese de NO em humanos. Portanto, os resultados expostos a seguir foram obtidos a partir de estudos realizados em animais.

Desenvolvimento de Hipertensão Arterial

Recentes estudos em ratos demonstraram que a administração oral do inibidor da síntese de NO, L-NAME por 4-6 semanas leva ao desenvolvimento de HA^{23,24}. Verifica-se elevação severa e persistente da pressão arterial que pode ser revertida de forma apenas parcial pela infusão de L-arginina²⁴. Este fato sugere que a inibição crônica da síntese de NO promova outras alterações humorais e/ou estruturais que também contribuem para a elevação da pressão arterial neste modelo. Embora a atividade da renina plasmática encontre-se aumentada durante o administração crônica de L-NAME, sugerindo a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) neste modelo de HA, a efetiva inibição do mesmo através da administração simultânea de Losartan, um antagonista específico para receptores de Angiotensina II, não é acompanhada por normalização completa da pressão arterial²⁴. Assim, embora participante, o SRA não deve constituir o único sistema de regulação da pressão arterial neste modelo de HA.

A pressão arterial neste modelo de HA experimental mostra-se aumentada em torno do 5º dia de administração de L-NAME e eleva-se progressivamente até a 6ª semana, quando ocorre estabilização dos níveis pressóricos até a 8ª semana²⁵.

Comprometimento renal

A administração oral do inibidor da síntese de NO, L-NAME a ratos, por 4-6 semanas, leva ao desenvolvimento de HA com vasoconstrição e hipoperfusão renais^{8,23,26,27} associadas a queda na filtração glomerular e aumento na fração de filtração²⁴. Do ponto de vista histológico, observa-se estreitamento difuso nas arteríolas renais com obliteração focal difusa e necrose fibrinóide glomerular segmentar²⁴. Certas alterações encontradas na microvasculatura renal, como a hipertrofia das arteríolas e a obliteração do lúmen das mesmas, são características da hipertensão arterial maligna^{28,29}. É

improvável que o dano renal seja decorrente de toxicidade direta pela L-NAME já que o desenvolvimento de microangiopatia é prevenido pela administração do antagonista de angiotensina, Losartan²⁴. Por outro lado, esta prevenção das alterações morfológicas e a reversão parcial das alterações funcionais nos rins com a administração de Losartan, embora sem a completa normalização da pressão arterial, fortalecem a importância do SRA neste modelo de HA²⁴.

Comprometimento cardíaco

A inibição crônica da síntese de NO acarreta, em ratos, alterações cardíacas como hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e fibrose intersticial e necrose subendocárdica²⁵, semelhantes àquelas vistas em pacientes portadores de hipertensão arterial. As lesões isquêmicas observadas no coração são similares àquelas encontradas nos rins neste mesmo modelo²⁵. Em humanos, acredita-se que estas alterações isquêmicas miocárdicas sejam resultantes de uma insuficiência coronariana relativa causada por aumento na demanda por parte do miocárdio, principalmente consequente à HVE. Porém, algumas peculiaridades deste modelo de HA o tornam diferente de outros e são portanto são dignas de nota. Primeiramente, o fato de que não se observa HVE antes de 8 semanas de administração oral de L-NAME, o que é exceção quando comparamos este modelo de HA com outros, clássicos^{25,30,31,32}. Associa-se o desenvolvimento retardado de HVE à elevação também tardia da atividade da renina plasmática observada neste modelo^{24,33} que em outros, como por exemplo na HA renovascular³¹. Este fato, conjuntamente à observação de o Losartan previne significativamente o desenvolvimento de HVE³², permite a conclusão de que, no modelo de HA por inibição crônica da síntese de NO, a atividade do SRA tem importância também na gênese da HVE.

Em segundo lugar, embora alterações isquêmicas miocárdicas subendocárdicas sejam encontradas em HA de diversas etiologias, na hipertensão secundária à inibição crônica da síntese de NO, as lesões não só são mais abundantes como também não estão restritas àquelas regiões²⁴. Além

disso, o aparecimento de lesões miocárdicas precede o da HVE. Portanto, há a possibilidade de que as lesões isquêmicas neste modelo não sejam secundárias somente à HVE ou ao "stress" na superfície subendocárdica do ventrículo esquerdo consequente à pós-carga aumentada. É bastante provável que a redução crítica de fluxo coronariano determinada por uma produção diminuída de NO³³ pelo endotélio dos vasos coronarianos seja a principal responsável pela maior severidade das alterações miocárdicas descritas neste modelo de HA²⁴.

Finalmente, outra característica importante é a disfunção ventricular esquerda observada na hipertensão arterial associada à inibição crônica de NO³¹. A disfunção do ventrículo esquerdo pode ser explicada pela presença das extensas áreas de fibrose intersticial e lesões miocárdicas observadas nos corações dos animais tratados com L-NAME. Em estudos agudos com infusão de L-NAME, a queda do débito cardíaco tem sido associada a aumento na pós-carga e à redução do fluxo coronariano bem como a alterações na contratilidade do ventrículo esquerdo^{34,35}. Cronicamente, a administração de L-NAME (25 dias) causa uma redução de 25% no débito cardíaco devido a uma redução no volume sistólico³¹. A superposição dos dois mecanismos de isquemia miocárdica (aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio hipertrófico e diminuição do fluxo sanguíneo coronariano associada a vasoconstricção causada pela L-NAME) pode ser responsável pelo acentuado comprometimento do débito cardíaco. A não elevação da pressão arterial após a 6ª semana de inibição descrita anteriormente pode, inclusive, refletir o desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda com queda no débito cardíaco²⁴.

Implicações fisiopatológicas e clínicas

O modelo de HA induzida pela inibição crônica da síntese de NO vem acrescentar mais conhecimentos à complexa fisiopatologia da HA. Por outro lado, acrescenta também inúmeros pontos controvertidos, sendo fundamental, a nosso ver, a questão se é a HA causa ou consequência da disfunção endotelial observada em pacientes portadores da doença^{36,37} (ref Linder 1990 e Panza

1990 da revisão do Moncada). É claro que não pretende interpretar uma patologia etilogicamente multifatorial como a HA como uma simples relação causa-efeito com a disfunção do endotélio. No entanto, é possível identificar alguns aspectos clínicos observados em determinados subgrupos de hipertensos, que são superponíveis aos observados neste modelo experimental de HA. Assim, poderíamos esperar que hipertensos com significativa disfunção endotelial, como causa ou consequência da HA, apresentassem disfunção renal severa, comprometimento precoce e importante da função cardíaca (muitos talvez falsamente rotulados como portadores de cardiomiopatias primárias, pela ausência de pressão arterial elevada e conhecimento prévio de HA) e indícios clínicos de isquemia miocárdica na ausência de HVE e coronariopatia obstrutiva. A identificação desses subgrupos de pacientes hipertensos com disfunção endotelial associada permitiria a utilização de medidas terapêuticas mais adequadas à esta condição, principalmente com o objetivo de prevenir os danos renal e cardíaco. Na prática diária da medicina, há muito vimos orientando nossos pacientes hipertensos a evitarem o tabagismo, a obesidade, dietas ricas em colesterol e hidratos de carbono além de tratarmos doenças associadas, principalmente a hipercolesterolemia e o diabetes. As bases para estas recomendações advinham de resultados de estudos populacionais que demonstraram a potencialização do risco de morbi-mortalidade cardiovascular quando HA, tabagismo, hipercolesterolemia e diabetes melito se associam. Atualmente, dispomos também de bases científicas para justificar essas medidas, pois estas quatro condições concorrem para a instalação de uma outra, via final comum de lesão vascular promovida por aquelas: a disfunção endotelial. Do ponto de vista de terapêutica medicamentosa, o desenvolvimento, por exemplo, de um novo fármaco cuja molécula fosse composta basicamente por um inibidor da enzima conversora de angiotensina II (ECA) associada a um radical NO talvez constituísse a indicação mais plausível, face às evidências de atividade aumentada do SRA e de déficit de produção/liberação de NO neste modelo fisiopatológico de HA. Paralelamente, a administração de cálcio e de

substâncias antioxidantes também poderiam trazer benefícios a este subgrupo de pacientes hipertensos.

REFERÊNCIAS

1. Furchgott, RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288:373-376.
2. Palmer R, Ferrige A, Moncada S: Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327:524-526.
3. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad of Sci USA*, 1987a; 84:9265-9269.
4. Ignarro L, Byrns R, Buga G, Wood K: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ Res*, 1987b; 61:866-879.
5. Batlouni M & Ramires JAF. Importância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. *Arq Bras Cardiol*, 1994; 62(4):255-270.
6. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginina. *Nature (Lond.)*, 1988; 333:664-666.
7. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 157:87-94.

8. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:3375-3378.
9. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthetase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*, 1990; 101:746-752.
10. Rees DD, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Identification of some novel inhibitors of the vascular nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. In: Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system, ed. by Moncada and EA Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990;427-437.
11. Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, Jaffe EA, Levi R, Griffith OW. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 170:96-103.
12. Moore PK, al Swayeh OA, Chong NWS, Evans R, Mirzazadeh S, Gibson A. L-N^G-nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. *Br J Pharmacol*, 1989; 106:219-223.
13. Mulsch A & Busse R. N^G-nitro-L-arginine (N^G-[imino(nitroamino) methyl]-L- ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1990; 341:143-147.
14. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Reviews*, 1991; 43(2):109-141.

15. Gardiner SM, Compton AM, Bennet T, Palmer RMJ, Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol*, 1990; 101:10-12.
16. Widdop RE, Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T. The influence of atropine and atenolol on the cardiac haemodynamic effects of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*, 1992; 105: 653-656.
17. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*, 1989; 96:418-424.
18. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 1989a; ii:997-1000.
19. Vallance P, Collier J, Moncada S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human veins. *Cardiovasc Res*, 1989b; 23:1053-1057.
20. Nava E, Palmer RMJ, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet*, 1991; 338:155-57.
21. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, 1991; 338:8782-8783.
22. Schilling J, Cakmakci M, Battig U, Geroulanos S. A new approach in the treatment of hypotension in human septic shock by NG-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of the nitric oxide synthetase. *Intensive Care Med*, 1993; 19:227-231.

23. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 1992; 90:278-281.
24. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
25. Moreno Jr H, Metze K, Antunes E, Zatz R, de Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (submitted 24/05/1994; acknow 01/07/1994).
26. Zatz R, De Nucci G. Effect of acute nitric oxide inhibition on glomerular microcirculation. *Am J Physiol*, 1991; 261:F360-F366.
27. Baylis C, Harton P, Engels K. Endothelium-derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol*, 1990; 1:875-881.
28. Mistry M, Muirhead EE, Yamaguchi Y, Nasjletti A. Renal function in rats with angiotensin II-salt-induced hypertension: Effect of Thromboxane synthesis inhibition and receptor blockade. *J Hypertens*, 1990; 8:75-83.
29. Laragh JH, Pickering TG. Essential hypertension, in Brenner BM, Rector FC (eds): *The Kidney*. Philadelphia, WB saunders, 1991, 1909-1967.
30. Arnal JF, Warin L, Michel JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992;90:647-652.

31. Arnal J-F, El Amrani A-I, Chatelier G, Ménard J, Michel J-B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993;22:380-387.
32. Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension* 1993;21:944-948.
34. Sigmon DH, Beierwaltes WH. Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension* 1993;22:237-242.
35. Amezcua JL, Palmer RMJ, de Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*, 1989; 97:1119-1124.
36. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T. Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.
37. Wang YX, Gavras I, Wierzbicka T, Lammek B, Gavras H. Inhibition of nitric oxide, bradykinin, and prostaglandins in normal rats. *Hypertension* 1992;19(suppl II):II-255-II-261
38. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation *in vivo*. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*, 1990; 81:1762-1767.
39. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*, 1990; 323:22-27.

CHRONIC NITRIC OXIDE INHIBITION AS A MODEL OF HYPERTENSIVE HEART MUSCLE DISEASE

H. Moreno-Jr*, K. Metze, A.C. Bento*, E. Antunes*,
R. Zatz*** & G. de Nucci***

Departments of Pharmacology* and Pathology, Faculty of
Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, and Department of
Nephrology***, University of São Paulo School of Medicine, São
Paulo, Brazil.**

Address for correspondence:

Dr. Heitor Moreno Jr

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

UNICAMP, PO Box 6111

13081-970, Campinas (SP)

Brazil

Phone 55 192 39 2968

Fax 55 192 52 1516

**Running title: Hypertensive cardiopathy secondary to endothelial
dysfunction**

Basic Research in Cardiology

Airmail

Dr. Heitor Moreno Jr
Dept. of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP, PO Box 6111
13081-970, Campinas (SP)
BRAZIL

EDITOR:

Prof. Dr. G. Heusch
Abteilung für Pathophysiologie
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstraße 55
45122 Essen

EDITORIAL ASSISTANTS:

A. Skyschally
R. Schulz

Tel.: +49 201 723 4521 o.
+49 201 723 4490
FAX: +49 201 723 4371

April 10, 1995

Dear Dr. Moreno,

Thank you very much for submission of your manuscript "Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy" to **BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY**.



The manuscript has been forwarded to the referees.

Before the manuscript can be forwarded to the referees for evaluation the following is required:

☐

Summary

☐

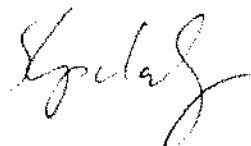
Key words

☐

Original figures

You will be informed of the editorial decision as soon as the referees have completed their review.

Sincerely yours



Basic Research in Cardiology

Airmail

Dr. Heitor Moreno Jr
Dept. of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP, PO Box 6111
13081-970, Campinas (SP)
BRAZIL

EDITOR:

Prof. Dr. G. Heusch
Abteilung für Pathophysiologie
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstraße 55
45122 Essen

EDITORIAL ASSISTANTS:

A. Skyschally
R. Schulz

Tel.: +49 201 723 4521 o.
+49 201 723 4490
FAX: +49 201 723 4371

May 29, 1995

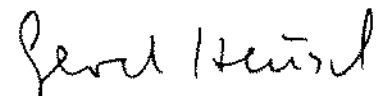
Dear Dr. Moreno,

your manuscript "Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy" has been seen by two expert referees; please find their detailed comments enclosed.

The consensus is that the priority of your paper in its present form is not high enough for publication in **Basic Research in Cardiology**.

Only a major revision, resolving each of the referees' concerns, will merit reconsideration.

Sincerely yours



(Prof. Dr. G. Heusch)

Campinas, 21 August 1995

Prof . Dr. G Heusch

EDITOR

Abteilung für Pathophysiologie

Zentrum für Innere Medizin

Universitätsklinikum Essen

Hufelandstraße 55

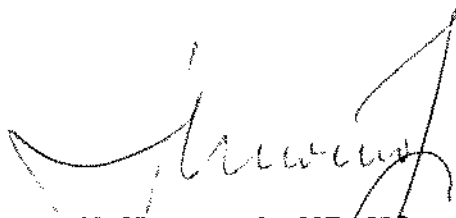
45122 Essen

Dear Prof. Dr. Heusch and dear referees,

We received your comments on our manuscript originally entitled "Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy" (H. Moreno-Jr et al). We would like to thank you for the special attention you gave it and your suggestions were very useful to increase the value of our manuscript. We have extensively revised it and all of main suggestions you gave us were accepted and we listed them. Also, we added the evaluation of right ventricle weight and its histological analysis, and the measurement of coronary flow (Method of Langendorff). Now, we hope that the manuscript were suitable for publication in Basic Research Cardiology.

Thank you very much for your attention.

Sincerely,



H. Moreno-Jr, MD, MSc

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences - UNICAMP

PO BOX 6111

13081-970

Campinas - SP

Brazil

fax: 55-192-521516

SUMMARY

We have compared the myocardial alterations in rats made hypertensive by the chronic inhibition of nitric oxide biosynthesis with those having renal hypertension (two kidney-one clip model). Male Wistar rats were chronically administered the nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for two, four and eight weeks. Both groups initially developed a similar increase in blood pressure but only the 2K-1C rats developed myocardial hypertrophy after 2-4 weeks. L-NAME-treated animals developed a similar degree of hypertrophy following eight weeks of treatment. As observed by light microscopy, the myocardial alterations in the latter animals consisted of extensive areas of fibrosis and myocardial necrosis, especially in regions of the subendocardium. The histological alterations induced by L-NAME were not caused by the accompanying hypertension, since the 2K-1C animals had a similar increase in arterial blood pressure without any significant alterations in the heart morphology. 2K-1C rats treated chronically with L-NAME behaved in a manner similar to the L-NAME-treated animals with regard to both the blood pressure increases and cardiac morphological alterations. Animals which received the inactive enantiomer D-NAME did not develop hypertension nor did they have any morphological abnormalities. Both the coronary flow and the contractile capacity of hearts isolated from rats treated with L-NAME for eight weeks were impaired compared to control animals. These results indicate that the chronic inhibition of NO biosynthesis causes cardiac ischemia associated with a mechanical dysfunction that is unrelated to cardiac hypertrophy in rats similar to those seen in some patients suffering from chronic arterial hypertension.

Key Words: Endothelium - L-NAME - Arterial hypertension - Left ventricular hypertrophy - Myocardial ischemia.

INTRODUCTION

Arterial hypertension is a strong predictor of cardiovascular morbid events including left ventricular hypertrophy (12,18), coronary circulatory disturbances (13), myocardial structural changes (5) and death (18,19). Several animal models of hypertension have been developed in an attempt to simulate human hypertension and its cardiac consequences. Recently, a model of chronic nitric oxide (NO) inhibition induced by the daily administration of NO synthase inhibitors such as N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; 20) was described (2,4,22). In contrast to classic models of hypertension such as renovascular (two kidney-one clip, 2K-1C; Goldblatt II) and deoxycorticosterone acetate-salt in which left ventricular hypertrophy (LVH) is evident (7), the cardiac hypertrophy observed after four weeks of L-NAME administration was either very discrete (15) or absent (2). Another characteristic is the reduced cardiac output (15), reported by some workers to be associated with an increased afterload (9). However, the consequences of chronic inhibition of NO biosynthesis on myocardial structure have yet to be studied.

In the present study, we have compared the sequence of myocardial alterations (including the development of hypertrophy and myocardial lesions) following the chronic inhibition of NO biosynthesis with those observed in the 2K-1C model. We also evaluated the coronary flow and contractile capacity of hearts from rats treated with L-NAME for eight weeks. Preliminary results of these experiments were presented at the "78th Meeting of the German Society of Pathology", Zurich, Switzerland, April 9, 1994.

METHODS

Induction of Goldblatt II hypertension

After the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal, 40 mg/kg, i.p.), a left flank incision was performed and a silver clip (0,2 mm i.d.) placed around the renal artery (11). In animals serving as sham-operated controls, the clip was removed immediately after having been fixed around the vessel and the kidney was repositioned in the abdomen.

Chronic treatment with L-NAME and D-NAME

The rats received L-NAME (or D-NAME) in the drinking water for up to eight weeks. Both L-NAME and D-NAME were dissolved in the drinking water at a concentration of 1.2 mM to give a daily intake of approximately 75 $\mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$ (22). The average daily intake of both water and food did not differ significantly between the L-NAME-treated and untreated rats. Control rats received the same volume of tap water alone.

Experimental design

Male Wistar rats (150-200 g at the start of the study) provided by the Biology Institute Laboratory Animal Center (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP) were divided in the following groups: (1) CONTROL (n=78): sham-operated rats that received tap water alone, (2) L-NAME (n=78): rats that received L-NAME in the drinking water, (3) D-NAME (n=12): rats that received D-NAME in the drinking water, (4) 2K-1C (n=46): with a silver clip placed around the renal artery and which received tap water, (5) 2K-1C+L-NAME (n=42): with a silver clip placed around the renal artery and which received L-NAME. The animals were sacrificed after two, four and eight weeks.

Arterial blood pressure was measured twice a week by a tail-cuff method (TCP, 25) and the mean of these two determinations was considered to be the mean for that week. The same procedure was applied to the weight gain.

Determination of heart weight indices

The rats were sacrificed with ether and the heart was removed, washed with saline and then fixed in 10% formalin for 24 h. Subsequently, the atria were removed and the ventricles weighed to obtain the heart weight (HW). The left ventricular (LVW) and the right ventricular (RVW) weights were determined after excising the right ventricle. The HW index (HWI) was calculated by dividing the HW by the body weight and the left (LVWI) and right (RVWI) ventricular weight indices by dividing the LVW and RVW by the body weight.

Histological analysis

Both the left and right ventricles were cut into five equidistant rings perpendicular to the long axis of the heart. All rings were embedded in paraffin, and 5 μ m sections were stained with hematoxylin-eosin. From each rat, one section of each of the five ventricular rings was studied by light microscopy. For semiquantitative analysis, we adopted the following classification: (+), weakly positive: one or two small foci of myocardial necrosis or fibrosis, with a diameter of less than 500 μ m in one dimension; (++), moderately positive; more than two non-confluent areas of small foci of myocardial necrosis or fibrosis with a diameter of less than 500 μ m in one dimension; (+++), strongly positive: confluent foci of myocardial necrosis or fibrosis with a diameter greater than 500 μ m in one dimension or large infarcts.

Functional evaluation of the isolated heart

At the eighth week of L-NAME treatment, control (n=8) and L-NAME-treated (n=7) animals were sacrificed and their hearts isolated and perfused at 37°C under constant pressure by the method of Langendorff. The Krebs-

Henseleit solution used had the following composition: NaCl- 115 mM; KCl- 5,4 mM; CaCl_2 - 1,25 mM; NaH_2PO_4 - 1,15 mM; MgSO_4 -1,2 mM; NaHCO_3 - 25 mM; d-Glucose- 11 mM; Mannitol- 2mM; Insulina- 10 UI / 1000 ml (pH= 7,2-7,4). The contractile activity of each heart was measured via a latex balloon inserted into the left ventricle and coupled to a pressure transducer (model 7070, Ugo Basile, Italy). The changes in pressure were recorded on a two-channel recorder (model 7070, Ugo Basile, Italy). The left ventricular developed pressure (LVDP, mmHg) normalized by the left ventricular weight (LVDP_n), was used as a sensitive indicator of contractile function (23). The coronary flow (CF, ml/min) was determined by manually collecting the effluent over set intervals and measuring the resulting volume. We also evaluated the coronary flow divided by the left ventricular weight (LVW, ml/min/g).

Drugs

N^{O} -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and D-NAME were purchased from Sigma (U.S.A.) and Bachem (Switzerland), respectively. Sodium pentobarbital (Sagatal[®]) was purchased from May & Baker (UK).

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analysis of variance (ANOVA) was applied to repeated measurements in order to assess the differences in body weight and tail-cuff pressure. One-way ANOVA was used to compare HW, LVW, RVW, HWI, LVWI and RVWI. When ANOVA results were significant, Duncan's test was applied to determine the level of significance. For comparison of the myocardial damage in the different study groups, Kruskal-Wallis and Dunn tests were used. For comparison of the LVDP_n and CF between the control and L-NAME groups, Student's t-test was used. For all the statistical tests employed, a p value $<0,05$ was considered to be significant (Software Stanton Glanz, Primer of Statistics).

RESULTS

Body weight

The body weight of sham-operated, 2K-1C, L-NAME and 2K-1C + L-NAME rats did not differ significantly from each other (Table 1).

Tail-cuff pressure (TCP)

Figure 1 shows that chronic administration of L-NAME for up to eight weeks in sham-operated rats induced a time-dependent hypertension which reached a maximum response at the fifth week. The inactive enantiomer D-NAME had no effect on the TCP when compared to control rats receiving tap water alone. 2K-1C animals developed a time-dependent hypertension with a maximal increase at the sixth week. After the sixth week, the TCP from 2K-1C rats was significantly higher ($p < 0.05$) than in the animals receiving L-NAME. Interestingly, 2K-1C rats which received L-NAME developed hypertension similar to that observed in the L-NAME-treated animals (Figure 1).

Cardiac and left ventricular weights

In the rats sacrificed after two, four and eight weeks, there were no significant differences in the heart (HW) and left ventricular (LVW) weights among the four groups (Table 1). However, the heart weight index (HWI) (Figure 2) and left ventricular weight index (LVWI) (Figure 3) were significantly greater in the 2K-1C and 2K-1C+L-NAME groups than in the CONTROL and L-NAME groups at the two and four weeks evaluation. After eight weeks, the increases in HWI and LVWI in the L-NAME group were different from CONTROL but were not significantly different from the 2K-1C and 2K-1C+L-NAME groups (Figures 2 and 3). After eight weeks, D-NAME-treated animals had HWI and LVWI similar to CONTROL animals. There was no difference in the right ventricle weight among the five groups at the eighth week (data not shown).

Myocardial alterations

Intergroup evaluation

In the two week- (n=18), four week- (n=29) and eight week-(n=21) CONTROL groups, as well as in the D-NAME group (eight weeks, n=12), no left ventricle was classified as positive. In the 2K-1C group (two to eight weeks), there was a very low incidence of myocardial abnormality (Table 2). However, L-NAME-treated animals developed myocardial alterations the severity of which increased with the length of treatment (Table 2).

The lesions observed consisted mainly of areas of dense interstitial and replacement fibrosis consistent with organized myocytolytic necrosis. Fresh myocardial necrosis was rarely encountered. Disruption of the myocardial organization was observed as soon as two weeks after the start of treatment but the lesions were more frequent and extensive after eight weeks. Subendocardial infarcts were common (Figure 4), sometimes occupying up to 80% of the circumference of the left ventricle. Osteocartilaginous metaplasia was only rarely observed in areas of subendocardial necrosis after eight weeks of treatment.

In the L-NAME-treated rats, thickened arterial walls with perivascular fibrosis could be found. Replacement fibrosis in the media of intra-myocardial arteries indicated previous smooth muscle cell necrosis, but this was found in only few animals. In the 2K-1C+L-NAME-group, the occurrence of arterial fibrinoid necrosis was very sporadic. The right ventricle of the following groups were analysed: eight-week L-NAME (n=24) and the respective CONTROL group (n=21), D-NAME group (n=12), eight-week 2K-1C (n=15) and eight-week 2K-1C+L-NAME (n=11). No myocardial lesions were detected in the right ventricle of these animals.

Cardiac function evaluation

Both the $LVDP_n$ and CF (or CF/LVW ratio; data not shown) of L-NAME-treated rat hearts were significantly less than those of the control animals (Table 3). The lower $LVDP_n$ suggests a decreased contractile capacity in the former group. There were no significant differences in the left ventricular end-diastolic pressure or in the heart rate between the L-NAME-treated and control groups (data not shown).

DISCUSSION

Our results clearly demonstrate that the chronic inhibition of NO biosynthesis induced by L-NAME causes myocardial alterations such as interstitial fibrosis and subendocardial necrosis similar to those seen in patients suffering from chronic arterial hypertension. In man, these alterations are believed to result from a relative coronary insufficiency caused by an increase in the oxygen demand. In our study, it was interesting to note that although the blood pressure rose to a similar extent in all groups, the LNAME-treated rats showed significantly more severe and extensive cardiac lesions, indicating that there must be other causes in addition to the high blood pressure levels. Myofiber necrosis in L-NAME treated rats was observed within two weeks of initiating the treatment, by which time these animals had not yet developed cardiac hypertrophy. These alterations seem to be related to the inhibition of NO biosynthesis since rats treated with the inactive enantiomer D-NAME had no increase in blood pressure and did not present similar histological changes. Medial necrosis has been documented in hypertensive rats following the administration of vasoactive drugs (6, 16). Although these vascular lesions were occasionally seen in both L-NAME-treated and 2K-1C rats, they cannot explain the full picture of myocardial lesions observed in the former animals. We also demonstrated a decreased coronary flow (CF) at the eighth week that may account for the myocardial changes noted above. The absence of cardiac hypertrophy in the rats with NO inhibition after two and four weeks stresses the importance of vascular factors in the genesis of the lesions.

Apart from age, LVH represents the most powerful risk factor for cardiovascular morbidity and mortality (17), a fact believed to a concomitant decrease in the coronary reserve (10, 14). We observed a late development of left ventricular hypertrophy in our model of hypertension compared with the 2K-1C rats, a finding which is in agreement with that of other workers (3,15). Since we were unable to performe fiber size measurements, it is not possible for us to definitively eliminate a loss of or damage to the myocardium as a cause of the

delayed development of LVH. However, our finding that myocardial alterations were observed in rats treated for two and four weeks, when LVH was absent (our data) or very discrete (15) probably reflects a vascular, rather than a cardiac muscle origin for these changes. The decreased coronary flow in this model could be due to disturbances in the myocardial microcirculation, including platelet activation (21) and vasospasm phenomena (24). The lower load and the lack of RV hypertrophy may explain the absence of RV lesions.

There was no significant difference in the arterial BP levels among the hypertensive groups until the sixth week when BP levels in the 2K-1C group were significantly higher than in the L-NAME and the 2K-1C+L-NAME rats. The lack of a further elevation in the TCP in the latter groups may reflect the development of cardiac mechanical dysfunction. Left ventricular dysfunction could be secondary to the extensive interstitial fibrosis and myocardial scars found in the hearts of both L-NAME-treated groups. In acute studies with L-NAME infusions, cardiac output impairment has been related to an increased afterload (9) and to a possibly decreased coronary perfusion and alterations in left ventricular contractility (1). L-NAME administration for 25 days results in a 25% reduction in cardiac output due to an decrease in stroke volume (15). The superposition of two mechanisms of myocardial ischemia, namely, an increased work demand caused by a growing myocardium and a decrease in coronary flow associated with a decreased contractility, could lead to the impairment of cardiac output observed in this model of hypertension.

In conclusion, the chronic inhibition of NO biosynthesis leads to myocardial ischemia with myofibrillar necrosis and interstitial fibrosis. These alterations may represent the morphological correlate of the functional deficit in myocardial contractility described above. The principal factor involved in initiating this ischemia is likely to be the decrease in the oxygen supply to myocardial tissue as a consequence of a reduced CF. This suggestion is

supported by the observation that the ischemic lesions preceded the onset of LVH.

The ischemic lesions observed above are similar to those found in the kidney under the same conditions (22). This model of hypertension may represent an experimental correlate of the clinical situation in which the development of hypertensive heart muscle disease can be secondary to an endothelial dysfunction. Our observations may also better explain the cardiac findings in diseases such as diabetes mellitus and/or arterial hypertension (8, 24) in which there is endothelial dysfunction that is independent of atherosclerotic coronary artery disease.

Acknowledgments - H. Moreno Jr is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). R. Zatz, K. Metze and G. de Nucci thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We acknowledge the excellent technical assistance of Mr. Airton F. Paula, Mr. Ismael Vêncio and Mr. Guaracy da Silva Ribeiro. A part of this study was performed in the Laboratory of Pathology, Center of Experimental Medicine and Surgery, UNICAMP.

REFERENCES

1. Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, Moncada S, (1992). Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol*, **456**:681-687.
2. Arnal JF, Warin L, Michel JB, (1992). Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, **90**:647-652.

3. Arnal J-F, El Amrani A-I, Chatelier G, Ménard J, Michel J-B, (1993). Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension*, 22:380-387.
4. Baylis C, Mitruka B, Deng A, (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 90:278-281.
5. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT, (1990). Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*, 67:1355-1364.
6. Carlton WW and Engelhardt JA, (1991). Poliarterites, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. *Cardiovascular and Musculoskeletal Systems*. Berlin: Springer-Verlag:71-76.
7. Dussaule JC, Michel JB, Auzan K, Schwartz P, Corvol, Menard J, (1986). Effect of antihypertensive treatment on the left ventricular isomyosin profile in one-clip, two kidney hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 236:512-518.
8. Fein FS, Cho S, Zola BE, Miller B, Factor SM, (1989). Cardiac pathology in the hypertensive diabetic rat. *Am J Pathol*, 134:1159-1166.
9. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T, (1990). Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol*, 101:746-752.
10. Gascho J, Mueller TM, Eastham CL, Muiesan ML, (1982). Abnormalities of the coronary circulation in normotensive dogs with volume-induced left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 16:288-292.
11. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW, (1934). Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, 59:347-379.

12. Hammond JW, Devereux RB, Alderman MH, Laragh JH, (1988). Relation of blood pressure and body build to left ventricular mass in normotensive and hypertensive employed adults. *J Am Coll Cardiol*, 12:996-1004.
13. Houghton JL, Frank MJ, Carr AA, Von Dohlen TW, Prisant LM, (1990). Relations among impaired coronary flow reserve, left ventricular hypertrophy and thallium perfusion defects in hypertensive patients without obstructive coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 15:43-51.
14. Hultgren PB, Boye AA, (1978). Myocardial blood flow at rest and during exercise in dogs with volume overload induced left ventricular hypertrophy. *Fed Proc*, 37:647-649.
15. Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A, (1993). Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension*, 21:944-948.
16. Kerns WD, Joseph EC, Morgan G, (1991). Drug-induced lesions, arteries, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. *Cardiovascular and Musculoskeletal Systems*. Berlin: Springer-Verlag. :76-83.
17. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH, (1991). Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*, 114:345-352.
18. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP, (1989). Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. *Ann Intern Med*, 108:7-13.
19. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP, (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 332:1561-1566.
20. Moore PK, al Swayeh OA, Chong NWS, Evans R, Mirzazadeh S, Gibson A, (1989). L- NG-Nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. *Br J Pharmacol*, 176: 219-223.

21. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S, (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2:1057-1058.
22. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R, (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 20:298-303.
23. Sasayama S, Franklin D, Ross J Jr. Dynamic changes in left ventricular wall thickness and their use in analyzing function in the conscious dog. *Am J Cardiol*, 38:870-879, 1976.
24. Vanhoutte PM, Shimokawa H, (1989). Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*, 80:1-9.
25. Zatz R, (1990). A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab Animal Sci*, 40:198-201.

**Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by
the chronic inhibition of nitric oxide synthesis**

**Heitor Moreno-Jr¹, Luciana Piovesan Nathan¹, Soraia Kátia
Pereira Costa¹, Konradin Metze², Edson Antunes¹,
Roberto Zatz³ and Gilberto de Nucci¹**

**Departments of ¹Pharmacology and ²Pathology and Center of
Experimental Medicine and Surgery, Faculty of Medical Sciences,
UNICAMP, Campinas, and ³Department of Nephrology, University
of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil.**

Address for correspondence:

Dr. Heitor Moreno Jr

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

PO Box 6111, UNICAMP

13081-970, Campinas (SP)

Brazil

Phone 55 192 39 7185

Fax 55 192 52 1516

Editors: D. De Wied, J. Bruinvels, F.P. Nijkamp and D.H.G. Versteeg

Re: SC no. E5823 Received: 01/06/95

Dr. H. Moreno Jr.
Dept. of Pharmacol.
Fact. of Med. Sci.
UNICAMP
P.O. Box 6111
13081-970 CAMPINAS (SP)
Brazil

Title: Analapril does not prevent the ischemia-induced cardiac alterations caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis

Authors: Moreno-Jr., H., L.P. Nathan, K. Metze, E. Antunes, R. Zatz, G. De Nucci

Dear Colleague,

We acknowledge the receipt of your short communication with the above title; it is now under review.

The decision of the editors will be sent to you as soon as possible.

Please note that, in order to reduce the mailing costs, the manuscript will not be returned to you. Reviewers are asked to destroy their copy after the final decision has been reached.

Yours sincerely,

The editors

N.B. Please mention the manuscript number in all your correspondence!

Please mention the manuscript number in all your correspondence!

3 August 1995

Ref.95/2625/T

Dr. H. Moreno Jr.,
Dept. of Pharmacol.
Fac. of Med. Sci.
UNICAMP
P.O. Box 6111
13081-970 CAMPINAS (SP)
Brazil

Please make
sure that your
manuscript is
accompanied by a
MATCHING
diskette!

Dear Dr. Moreno Jr.,

Your manuscript no. E5823, entitled:

Anaprilil does not prevent the ischemia-induced cardiac alterations caused
by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis,

has been evaluated by the referee(s), who raised a number of points
about the manuscript. The enclosed evaluation sheet(s) detail these
points. The nature of the comments is such that we have decided that
this manuscript cannot be accepted for publication in the EUROPEAN
JOURNAL OF PHARMACOLOGY.

However, if you feel that you are able to submit a revised manuscript
in which you have adequately incorporated the points raised by the
referee(s), we are willing to reconsider it as a new manuscript.

In case a checklist is enclosed the points herein should be taken care
of when you decide to submit a new manuscript.
Please reply to the comments of the referee(s) and indicate which of
the required changes have been made and where these changes are to be
found in the revised manuscript (page and line). We also ask you to
give the reasons that led you to reject some of the suggested changes.

Would you please send us the manuscript in triplicate, i.e. the entire
revised manuscript and two copies thereof, including the complete set
of illustrations and list of references for the manuscript and for the
copies. Your reply to the comments made by the referee(s), also in
triplicate, should accompany the manuscript.

Yours sincerely,



D.H.G. Versteeg, Ph.D.

22 August 1995

D. H. G. Versteeg, Ph.D.
Editorial Office
European Journal of Pharmacology
Universiteitsweg 100,
3584 CG Utrecht
The Netherlands
Fax:31.30.539033

Dear Prof. Versteeg,

Manuscript no. E5823

Please find enclosed three copies of the revised manuscript entitled "ENALAPRIL DOES NOT PREVENT THE CARDIAC ISCHEMIC ALTERATIONS INDUCED BY NITRIC OXIDE CHRONIC INHIBITION" by H. Moreno-Jr et al. Please find also enclosed a list of our comments to referee 2 (since referee 1 apparently accepted the manuscript as it stands).

We hope you find this revised manuscript suitable for publication as a short communication.

Thank you very much for your attention.

I look forward to hearing from you in due course.

Yours sincerely

G. de Nucci, MD, PhD
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences - UNICAMP
PO BOX 6111
13081 - Campinas - SP
Brazil
fax 55-192-521516

ABSTRACT

In rats, chronic administration of the nitric oxide (NO) inhibitor N^ω-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) causes arterial hypertension, cardiac hypertrophy and myocardial ischemic alterations such as necrosis and fibrosis. In this study, we evaluated the effect of eight weeks of treatment with enalapril maleate on cardiac weight and on the development of the histological alterations induced by L-NAME. Enalapril significantly inhibited the development of both arterial hypertension (117.2 ± 5.8 , 161.8 ± 8.8 and 122.0 ± 10.6 mmHg, for control, L-NAME- and L-NAME+enalapril- treated animals, respectively) and left ventricular hypertrophy (1.36 ± 0.13 , 1.60 ± 0.04 and 1.48 ± 0.05 mg/g, for control, L-NAME- and L-NAME+enalapril- treated animals, respectively), but had no effect on the myocardial lesions. These findings demonstrate that although the renin-angiotensin system plays a major role in the development of arterial hypertension and cardiac hypertrophy, it does not modulate the ischemia-induced myocardial alterations observed in this model. Key words: **Nitric oxide - hypertension - enalapril - renin-angiotensin system -myocardial ischemia.**

1-INTRODUCTION

The chronic inhibition of nitric oxide (NO) synthesis in rats causes arterial hypertension accompanied by functional alterations and structural lesions in the kidneys (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992) and heart (Moreno et al., 1994). Since inhibition of the renin-angiotensin system prevents the alterations induced by L-NAME in the kidney (Ribeiro et al., 1992), we have evaluated whether the renin angiotensin system is also involved in the L-NAME-induced cardiac alterations in rats.

2- MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental design

Male Wistar rats (150-200 g at the start of the study) provided by CEMIB-UNICAMP were divided into the following groups: (1) control (n=10): rats that received tap water alone, (2) L-NAME (n=8): rats that received L-NAME (20 mg/kg/day; Ribeiro et al., 1992; Moreno et al., 1994), (3) enalapril (n=9): rats that received enalapril maleate (25 mg/kg/day; Childs et al., 1990), (4) L-NAME+enalapril (n=9): rats that received both L-NAME and enalapril maleate (20 and 25 mg/kg/day, respectively). Both L-NAME and enalapril maleate were dissolved in the drinking water. The animals were sacrificed after eight weeks of treatment.

2.2- Blood pressure measurements

Mean arterial pressure was measured twice a week by a tail-cuff method (Zatz, 1990) and the mean of these two determinations was considered to be the mean for that week. The same procedure was applied to the weight gain.

2.3- Cardiac weight indexes and histological analysis

The rats were sacrificed with ether and the heart was dissected out and washed with saline. The atria were then removed and the ventricles weighed in

order to obtain the heart weight. The left ventricular weight was determined by excising the right ventricle and weighing the remaining tissue. The heart weight index and the left ventricular weight index were calculated by dividing the heart weight and the left ventricular weight by the body weight. After fixation, in 10% formalin for 24 h, the left ventricle and the septum were cut into five equidistant rings perpendicular to the long axis of the ventricle. The rings were then embedded in paraffin, and 5 μm sections were stained with hematoxylin-eosin. From each rat, one section of each of the five ventricular rings was studied by light microscopy. The histological analysis had been done as a blind study. For semiquantitative analysis, we adopted the following classification (Factor et al., 1981: (+), grade one: one or two foci of clear cut previous cell loss replaced by granulation tissue or a scar less than 500 μm in its greatest diameter; (++) grade two; more than two foci of clear cut previous myocardial cell loss replaced by granulation tissue or scars, all less than 500 μm in their greatest diameter. There must be a broad rim of viable myocardium between individual foci; (+++) grade three: confluent foci without a continuous rim of myocardium separating them, thus creating larger areas of previous cell (> 500 μm in their largest diameter) replaced by granulation or scar tissue with only rare islands of very few surviving cardiomyocytes in it. We did not include myocardial fibrosis, which is defined as an increase of interstitial collagen, without apparent loss of cardiomyocytes, since we were only interested in lesions caused by cell loss.

2.4- Drugs

N^o-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) was purchased from Sigma (U.S.A.). Enalapril maleate was provided by Biosintética (Brazil).

2.5- Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Analysis of variance (ANOVA) was applied to repeated measurements in order to assess the differences in

body weight and tail-cuff pressure. When the ANOVA results were significant, Duncan's test was applied to determine the level of significance and a P value $<0,05$ was considered to be significant. For comparison of the myocardial damage in the different study groups, the Kruskal-Wallis and Dunn tests (Primer of Statistics, from software Stanton Glanz) were used.

3-RESULTS

3.1- Body weight and tail-cuff pressure

The body weight of control, L-NAME, enalapril and L-NAME+enalapril rats did not differ significantly from each other. L-NAME treatment induced a time-dependent increase in the blood pressure up to the sixth week of treatment after which the levels stabilized (Fig. 1). Enalapril prevented the hypertension in the L-NAME+enalapril rats after the second week of treatment (Fig. 1). Enalapril alone significantly reduced the blood pressure after the second week of treatment ($P<0,05$; Fig. 1).

3.2- Cardiac weights

Chronic treatment with L-NAME significantly elevated the heart weight index ($1.90\pm0,18$ and $2.12\pm0,05$ mg/g for control and L-NAME-treated animals, respectively; $P<0,05$). This increase was abolished by enalapril ($1.84\pm0,06$ mg/g; $P<0,05$). Similarly, L-NAME caused a significant increase in the left ventricular weight index ($1.36\pm0,13$ and $1.60\pm0,04$ mg/g, for control and L-NAME-treated animals, respectively; $P<0,05$) which was also prevented by enalapril ($1.48\pm0,05$ mg/g; $P<0,05$). In the animals receiving enalapril alone, there were no significant alterations in the heart weight index ($1.89\pm0,07$ mg/g) and left ventricular weight index ($1.50\pm0,08$ mg/g) when compared with the control group.

3.3- Histological alterations

In both the control and enalapril groups, no heart was classified as positive. L-NAME-treated animals developed myocardial alterations which were

not prevented by enalapril (Table 1). The lesions observed consisted mainly of areas of dense interstitial and replacement fibrosis consistent with organized myocytolytic necrosis. Fresh myocardial necrosis was also encountered. Subendocardial infarcts were common, sometimes occupying up to 80% of the circumference of the left ventricle. In the L-NAME-treated rats, thickened arterial walls with perivascular fibrosis could be found (Moreno et al., 1994).

4-DISCUSSION

Our results clearly demonstrate that, while enalapril presented the development of both arterial hypertension and left ventricular hypertrophy, it had no effect on the myocardial alterations resulting from ischemia.

Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce cardiac mass when used as short-term therapy for clinical and experimental hypertension (Dunn et al., 1984). Our results on cardiac hypertrophy support previous observations showing that both enalapril (Nemoto et al., 1994; Ueki et al., 1994) and the angiotensin II receptor blocker losartan (Jover et al., 1993) prevent the left ventricular hypertrophy induced by the chronic inhibition of NO synthesis.

Previous studies (Lund and Tomanek, 1978; Buttrick et al., 1986) have demonstrated that left ventricular hypertrophy due to arterial hypertension is associated with a limited coronary vasodilator reserve and that this situation is a predisposing factor for the development of myocardial ischemia. Interestingly, the activation of renin-angiotensin system leads to the development of left ventricular hypertrophy (Weber et al., 1991) and angiotensin II causes myocyte acute injury in rats (Tan et al., 1991). Although the above findings indicate a close relationship between renin-angiotensin system activation and myocardial ischemia, the failure of enalapril to prevent the development of ischemic lesions indicates a clear dissociation between left ventricular hypertrophy and the ischemic process in this model of chronic NO synthesis blockade. Indeed, renovascular hypertensive rats are known to develop left ventricular hypertrophy, yet no ischemic lesions are observed in the hearts of these animals

(Moreno et al., 1994), thus supporting the concept that the ischemic process may be unrelated to the development of cardiac hypertrophy (Brush et al., 1988).

Since as noted above arterial hypertension and left ventricular hypertrophy are not related to the development of myocardial ischemia, we propose that NO plays an essential role in the autoregulation of coronary blood flow by acting as vasodilator and inhibitor of platelet function. This model of chronic NO synthesis inhibition may therefore reflect clinical syndromes in which patients present with arterial hypertension and associated myocardial ischemia, but have no concomitant left ventricular hypertrophy.

Acknowledgments - H. Moreno Jr is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). K. Metze, R. Zatz and G. de Nucci thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We acknowledge the excellent technical assistance of Mr. Aírton F. Paula, Mr. Ismael Vêncio and Mr. Guaracy da Silva Ribeiro.

REFERENCES

- Baylis, C., B. Mitruka and A. Deng, 1992, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage, *J. Clin. Invest.* 90, 278.
- Brush, J.E., R.O. Cannon III, W.H. Schenke, R.O. Bonow, M.B. Leon, B.J. Maron and S.E. Epstein, 1988, Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy, *N. Engl. J. Med.* 319, 1302.
- Buttrick, P.M., A. Malhotra, L. McDermott, L. Lam and R. Brodman, 1986, Isomyosin distribution on overloaded human atrial myocardium, *J. Am. Coll. Cardiol.* 7(2), 86A.
- Childs, T.J., M.A. Adams, and A.S. Mak, 1990, Regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by enalapril and the expression of contractile proteins, *Hypertension* 16, 662-668.
- Dunn, F.G., W. Oigman, H.O. Ventura, F.H. Messerli, I. Kobrin and E.D. Frohlich, 1984, Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension, *Am. J. Cardiol.* 53, 105.
- Factor, S.M., R. Bhan, T. Minase, H. Wolinsky and E. Sonnenblick, 1981, Hypertensive-diabetic cardiopathy in the rat, *Am. J. Pathol.* 102:219-228.
- Jover, B., A. Herizi, F. Ventre, M. Dupont and A. Mimran, 1993, Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade, *Hypertension* 21, 944.

- Lund, D.D. and R.J. Tomanek, 1978, Myocardial morphology in spontaneously hypertensive and aortic-constricted rats, *Am. J. Anat.* 152, 141.
- Moore, P.K., O.A. al Swayeh, N.W.S. Chong, R. Evans, S. Mirzazadeh and A. Gibson, 1989, L-^NG-Nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery, *Br. J. Pharmacol.* 176, 219.
- Moreno Jr., H., K. Metze, E. Antunes, R. Zatz and G. de Nucci, 1994, Chronic nitric oxide blockade causes cardiac ischemia but not cardiac hypertrophy: An experiment of four weeks in rats, *Verh. Dtsch. Ger. Path.* 78, 459.
- Nemoto, T., H. Matsuoka, H. Hasegawa, K. Ueki, H. Kimura, K. Kawamura, H. Masuda and M. Miura, 1994, Effect of enalapril and E4177 on the heart under chronic nitric oxide suppression in in vivo rat model, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 228.
- Ribeiro, M.O., E. Antunes, G. de Nucci, S.M. Lovisolo and R. Zatz, 1992, Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension, *Hypertension* 20, 298.
- Tan, L.P., J.E. Jalil, R. Pick, J.S. Janicki, and K.T. Weber, 1991, Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II, *Circ. Res.* 69, 1185.
- Ueki, K., H. Matsuoka, H. Hasegawa, T. Nemoto, H. Kimura, K. Kawamura, H. Masuda and M. Miura, 1994, Comparison the effects of long-term nitric oxide suppression on the heart between young and old rats, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 228.
- Weber, K.T., C.G. Brilla, and J.S. Janicki, 1991, Signals for the remodeling of the cardiac interstitium in systemic hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17(Suppl 2), 14.
- Zatz, R., 1990, A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal. Sci.* 40, 198.

The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats

Soraia K. P. Costa,¹ Heitor Moreno-Jr,¹ Susan D. Brain,² Gilberto de Nucci¹ and Edson Antunes^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13081-970 Campinas (SP), Brazil and ²Pharmacology Group, Biomedical Sciences Division, King's College, Manresa Rd, London, SW3 6LX, UK.

* Author for correspondence:
Edson Antunes
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP, PO Box 6111
13081-970, Campinas (SP), Brazil
Fax (0192) 55 192 52 1516

13 July 1995

D. H. G. Versteeg, PhD
Editorial Office European Journal of Pharmacology
Universiteitsweg 100
3584 CG Utrecht
The Netherlands

Dear Dr. Versteeg

Please find enclosed three copies of a substantially revised version of the manuscript entitled "The effect of armed *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats" by S.K.P. Costa, H. Moreno-Jr, G. de Nucci & E. Antunes (E4262). Most of the points raised by the previous referees have been taken care of, but we understand that this version should be dealt as a new manuscript.

We hope you find this manuscript suitable for publication in the European Journal of Pharmacology.

Thank you very much for your attention.

I look forward to hearing from you in due course.

Yours sincerely

Edson Antunes, PhD
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP, PO Box 6111
13081-970 - Campinas (São Paulo)
Brazil
fax 55-192-521516

Summary

The changes induced in the mean arterial blood pressure (MABP) of anaesthetised rats following the administration of armed spider (*Phoneutria nigriventer*) venom have been investigated. The intravenous injection of *Phoneutria nigriventer* venom (PNV; 0,1 mg/kg) evoked a brief and reversible decrease in the MABP whereas a higher dose of venom (0,3 mg/kg) caused a biphasic response characterized by a short lasting hypotension followed by a sustained and prolonged hypertension (40-50 min). These changes were accompanied by tachycardia, salivation, fasciculations, defecation and respiratory disturbances. Pretreatment of the animals with atropine (10 mg/kg), propranolol (100 mg/kg), phenoxybenzamine (100 mg/kg) and indomethacin (4 mg/kg) did not significantly affect the MABP changes induced by PNV. Similarly, the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (0,6 mg/kg), the PAF antagonist WEB 2086 (20 mg/kg), the NK₁ receptor antagonist SR 140333 (0,5 mg/kg), the NK₂ receptor antagonist SR 48968 (0,5 mg/kg) and the nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (10 mg/kg) had no significant effect on the PNV-induced MABP changes. The increase in the MABP induced by PNV was also not significantly affected by either angiotensin II receptor antagonist losartan (10 mg/kg) or the endothelin ET_A receptor antagonist FR 139317 (30 mg/kg). The ATP-dependent potassium channel antagonist glibenclamide (50 mg/kg) reduced by 40% the hypotension induced by PNV without affecting the hypertensive response. Pretreatment of the animals with L-type calcium channel antagonists such as verapamil (10-100 µg/kg/min), diltiazem (40-120 µg/kg/min) and nifedipine (0,3-10 mg/kg) markedly attenuated the PNV-induced hypertension. Verapamil (30 µg/kg/min) and diltiazem (120 µg/kg/min) also promptly reversed the established hypertension induced by PNV when infused 8 min after venom injection. Our results indicate that the brief decrease of blood pressure induced by PNV is partially due to ATP-dependent potassium channels

activation. The prolonged hypertension seems to result from direct calcium entry in vascular and/or cardiac muscles.

Key words: Spider venoms, calcium channel blockers, potassium channel blockers, endothelin-1, nitric oxide, Hoe 140

1. Introduction

Human envenomation by the spider *Phoneutria nigriventer* is common in South America, particularly in Brazil (Lucas, 1988). The predominant clinical manifestations of such envenomation include intense local pain, visual disturbances, priapism, neurogenic shock, tachycardia and arrhythmias (Vital-Brazil and Vellard, 1925).

Phoneutria nigriventer venom activates voltage-dependent sodium channels in both the phrenic nerve-diaphragm muscle preparation (Fontana and Vital Brazil, 1985) and in guinea pig auricles (Vital Brazil et al., 1988), but not in rabbit isolated vascular smooth muscle (Antunes et al., 1993a). In the auricles, *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) releases both acetylcholine and norepinephrine (Vital-Brazil et al., 1988) which are believed to play a role in the cardiac disturbances observed following envenomation by this species (Schenberg and Pereira-Lima, 1971). Since the *in vivo* cardiovascular effects of PNV have not been systematically studied, the aim of the present work was to investigate the effects of PNV on the arterial blood pressure of anaesthetised rats.

2. Materials and methods

2.1. Arterial blood pressure measurement

Male Wistar rats (280-350 g) provided by CEMIB-UNICAMP were anaesthetised with sodium pentobarbital (Sagatal[®], 40mg/kg., i.p.) and the trachea was cannulated. The right carotid artery and left femoral vein were cannulated for the measurement of arterial blood pressure and drug administration, respectively. The arterial pressure was measured via a pressure transducer (Ugo Basile, model PRC 21/3) connected to a two channel polygraph (Ugo Basile). The experiments were initiated after at least 15 min of stabilization

at which point the arterial blood pressure was generally 80-100 mmHg. *Phoneutria nigriventer* venom and the other agonists (noradrenaline, isoproterenol, acetylcholine, bradykinin, platelet-activating factor, angiotensin II, endothelin-1, substance P, cromakalim, sodium nitroprusside and Bay K8644) employed in this study were injected intravenously as single bolus (100 μ l) and were washed in with a further 100 μ l of saline.

2.2. Dialysis of *Phoneutria nigriventer* venom (PNV)

Phoneutria nigriventer venom (10 ml of a 2 mg/ml of 0.9 % w/v saline solution) was dialysed (dialysis membrane mol. wt. cutoff, 12000-14000) for up to 48 hr at 4-6°C against 2 L of saline. The dialysing solution was changed four times during this period (Antunes et al., 1992).

2.3. Venom and reagents

Lyophilised *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) was supplied by Butantan Institute (São Paulo, Brazil). The venom was collected from the spiders by means of electrical stimulation and desiccated in vacuum over NaOH tablets at room temperature.

Acetylcholine, angiotensin II, atropine, bradykinin, diltiazem, indomethacin, isoproterenol, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, noradrenaline, propranolol, verapamil, glibenclamide, cromakalim, substance P, sodium nitroprusside and dialysis tubing (mol. wt. cutoff 12,000-14,000) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Platelet-activating factor (PAF) and sodium pentobarbital (Sagatal®) were obtained from Beecham (Bubendorf, Switzerland) and May & Baker (UK), respectively. WEB 2086 and phenoxybenzamine were obtained from Smith Kline & French (UK). Losartan was supplied by Merck (USA). Endothelin-1 was supplied by Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan). The endothelin (ET_A) receptor antagonist FR 139317 was supplied by Dr. T.J. Opgenorth (Abbott Laboratories, Illinois, USA). Hoe 140,

BAY K8644 and nifedipine were obtained from Pharma Synthesis (Hoechst AG), Bayer (Germany) and Bayer (Brazil), respectively. SR 140333 and SR 48968 were supplied by Sanofi Recherche (Montpellier, France). FR 139317 was dissolved in 1 N NaOH and the pH corrected to 7.4. BAY K 8644 was dissolved in 40% ethanol. *Phoneutria nigriventer* venom and test agents were stored in stock solution at -20°C and then diluted with isotonic saline (0,9% w/v) prior administration to the animals.

2.4. Statistical Analysis

The results are presented as the mean $\pm$ SEM where appropriate. The unpaired Student's *t*-test was used for statistical evaluation of the results and a $P < 0,05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. The effects of PNV on mean arterial blood pressure (MABP)

The intravenous administration of PNV (0,1 mg/kg) caused a brief (2-4 min) and reversible hypotension (43 ± 7 mmHg, $n=7$) whereas a higher venom dose (0,3 mg/kg) induced a biphasic MABP response consisting of a brief (1-3 min) hypotension (33 ± 2.2 mmHg) followed by a prolonged hypertension (42.5 ± 4.8 mmHg increase; Fig. 1, upper panel). The latter phase was characterised by a slow onset (10 min to reach the maximal response), long duration (approximately 40-50 min) and associated with a discrete increase in the heart rate (496 ± 12 beats/min before and 544 ± 8.5 beats/min 10 min after PNV injection, $n=10$, $P < 0,05$). A second administration of PNV (0,3 mg/kg) always evoked a tachyphylatic response followed by deaths in 75% of the animals ($n=20$). The changes in MABP induced by this dose of venom were accompanied by intense salivation, fasciculations and defecation.

3.2. Effect of atropine, phenoxybenzamine and propranolol

The intravenous injection of both acetylcholine (1 $\mu\text{g/kg}$) and the β adrenoceptor agonist isoproterenol (10 ng/kg) induced a short-lasting hypotension (61 ± 6.2 and 39.6 ± 2.9 mmHg, respectively, $n=5$) whereas noradrenaline (1 $\mu\text{g/kg}$) induced a brief hypertension (53.4 ± 5.3 mmHg). Pretreatment of one group of rats with the muscarinic receptor antagonist atropine (10 mg/kg , i.p., 0.5 h before) significantly reduced the acetylcholine-induced hypotension without affecting the biphasic MABP response induced by PNV (0.3 mg/kg ; Fig. 2A). At this dose, atropine did not significantly change basal MABP (103 ± 7.5 and 83.5 ± 4.7 mmHg for control and atropine-treated animals, respectively, $n=5$). In a second group of rats, pretreatment with the β adrenoceptor antagonist propranolol (100 mg/kg , i.p., 0.5 h before) did not change the basal MABP (101.2 ± 5.6 and 95.6 ± 7.3 mmHg for control and propranolol-treated animals, respectively, $n=5$) but markedly reduced the isoproterenol-induced hypotension (Fig. 2B). Propranolol treatment did not significantly affect the PNV-induced MABP changes. Finally, in a third group of rats, pretreatment with the α -adrenoceptor antagonist phenoxybenzamine (100 mg/kg , i.p., 0.5 h before) lowered the basal MABP (114 ± 2.3 and 78 ± 2.2 mmHg for control and phenoxybenzamine-treated animals, respectively, $n=5$, $P<0.05$) and significantly reduced the noradrenaline-induced hypertension (Fig. 2C). At this dose, phenoxybenzamine had no effect on the MABP changes induced by PNV.

When the animals were previously treated with a mixture of atropine, propranolol and phenoxybenzamine (same doses as described above), the MABP decreased from 100.3 ± 4.0 to 69.0 ± 3.7 mmHg ($n=5$, $P<0.05$). This treatment virtually abolished the responses induced by acetylcholine, isoproterenol and noradrenaline without significantly affecting the MABP changes induced by PNV (Fig. 1, lower panel).

3.3. Effect of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin

Pretreatment of the animals with indomethacin (4 mg/kg, i.p., 0,5 h before) affected neither the hypotension (33.0 ± 2.2 and 36.0 ± 6.0 mmHg for control and treated animals, respectively) nor the hypertension (42.5 ± 4.8 and 39.8 ± 3.7 mmHg for control and treated animals, respectively, $n=5$) induced by PNV. Indomethacin did not affect the basal MABP (112.4 ± 7.4 and 102.3 ± 5.9 mmHg for control and indomethacin-treated animals, respectively, $n=5$).

3.4. Effect of the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 and the PAF antagonist WEB 2086

The intravenous bolus administration of bradykinin (1 μ g/kg) caused a short-lived hypotension (22.5 ± 4.3 mmHg) which was markedly reduced (1.6 ± 1.8 , $n=5$, $p<0,01$) when the animals were pretreated with Hoe 140 (0,6 mg/kg, i.p). However, Hoe 140 failed to significantly affect MABP changes induced by PNV (Table 1). Similarly, WEB 2086 (20 mg/kg, i.v., $n=5$) abolished PAF (0,25 mg/kg, i.v.)-induced hypotension (37.8 ± 7.4 mmHg, $n=5$; $P<0,01$) without significantly affecting MABP changes induced by PNV (Table 1). At the doses used, Hoe 140 and WEB 2086 did not affect the basal MABP (not shown).

3.5. *Effect of Tachykinin NK₁ (SR 140333) and NK₂ (SR 48968) receptor antagonists*

Intravenous bolus injection of substance P (1 µg/kg) caused a brief hypotension (29.3 ± 2.0 mmHg, n=6) which was abolished when the animals were previously treated with SR 140333 (0,5 mg/kg, i.v, 10 min before). However, this antagonist (same dose) had no effect on the MABP changes induced by PNV (n=6; Table 1). Pretreatment of the animals with SR 48968 (0,5 mg/kg, i.v, 10 min before) affected neither the hypotension induced by substance P nor the the MABP changes induced by PNV (n=6; not shown). SR 140333 and SR 48968 did not affect the basal MABP (not shown).

3.6. *Effect of the nitric oxide synthesis inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)*

The administration L-NAME (10 mg/kg, i.v.) caused a sustained elevation of MABP ($25.0 \pm 4.5\%$ increase, n=5, p<0,01). In the N^ω-nitro-L-arginine methyl ester-treated animals, the MABP changes induced by PNV were not significantly different from that observed in animals receiving saline (Table 1).

3.7. *Effect of the angiotensin receptor antagonist losartan and the endothelin ET_A receptor antagonist FR 139317*

The intravenous bolus injection of angiotensin II (10 ng/kg) induced a short-lasting increase in the MABP ($50,0 \pm 3.1$ mmHg) which was significantly reduced ($14.8 \pm 0,5$ mmHg, n=5, P<0,01) in animals pretreated with losartan (10 mg/kg, i.v.; Table 1). At this dose, losartan reduced (P<0,05) the hypotension without affecting the hypertension induced by PNV (n=5; Table 2).

The bolus injection of ET-1 (3 µg/kg, n=7) induced a brief hypotension (37.0 ± 6.0 mmHg) followed by a sustained hypertension (25.3 ± 2.5 mmHg). The intravenous administration of FR 139317 (30 mg/kg) did not affect the hypotension (37.0 ± 5.0 mmHg) but significantly reduced the ET-1-induced

hypertension (7.7 ± 2.9 mmHg, $P < 0.01$). FR 139317 (30 mg/kg) had no effect on the the MABP changes induced by PNV ($n=7$, Table 1).

3.8. Effect of the ATP-dependent potassium channel blocker glibenclamide

Pretreatment of the animals with glibenclamide (50 mg/kg, i.p., 30 min before) reduced by 58% the hypotension induced by the potassium channel opener cromakalim (10 μ g/kg, $n=6$; $P < 0.01$) but it had no effect on the hypotension induced by sodium nitroprusside (1 μ g/kg, $n=7$; Fig. 3). At the dose used above glibenclamide significantly reduced PNV-induced hypotension without affecting the hypertension ($n=11$; Fig. 3).

3.9. Effect of calcium channel blockers

Figure 4 shows the effect of the calcium channel blockers verapamil, diltiazem and nifedipine on the MABP changes induced by PNV (0,3 mg/kg).

Continuous intravenous infusion of verapamil decreased the basal MABP (97.0 ± 4.6 mmHg before and 82.3 ± 3.2 , 81.0 ± 5.0 and 42.0 ± 6.8 mmHg during 10, 30 and 100 μ g/kg/min verapamil infusion, respectively, $P < 0.05$, $n=5$) and markedly reduced the increase in MABP caused by both BAY K8644 and PNV (Fig. 4A). The PNV-induced hypotension was significantly reduced only by the highest dose of verapamil used (Fig. 4A). In addition, the infusion of verapamil (30 μ g/kg/min) 5 min following PNV administration (established hypertension) promptly reversed the increased MABP ($n=5$, Table 2).

Intravenous infusion of diltiazem also significantly reduced the basal MABP (96.6 ± 4.7 mmHg before and 68.5 ± 4.9 , 70.8 ± 2.6 and 55.0 ± 5.0 mmHg during 40, 80 and 120 μ g/kg/min infusion, respectively, $P < 0.05$, $n=5$) and markedly reduced the increase in MABP caused by both BAY K8644 and PNV (Fig. 4B). Similarly to verapamil, the PNV-induced hypotension was significantly reduced only by the highest dose of diltiazem used (Fig. 4B). Diltiazem

(120 $\mu\text{g/kg/min}$) also rapidly reversed PNV-induced hypertension when infused 5 min after venom administration (Table 2).

The effect of nifedipine was evaluated by given the drug orally 0,5 h before PNV administration. The basal MABP was not affected by 0,3 mg/kg ($100,6 \pm 6.6$ and 94.0 ± 4.9 mmHg for control and treated animals, respectively, $n=5$) but it was significantly reduced by 1.0 and 10,0 mg/kg (82.5 ± 4.3 and 65.0 ± 4.6 mmHg, respectively, $P<0,05$, $n=5$). At the range of doses used above, nifedipine reduced ($P<0,05$) both MABP changes induced by PNV and the BAY K8644-induced hypertension (Fig. 4C).

Verapamil (30 $\mu\text{g/kg/min}$), diltiazem (120 $\mu\text{g/kg/min}$) and nifedipine (10 mg/kg) did not significantly affect the noradrenaline (1 mg/kg)-induced hypertension (58.1 ± 2.9 , 64.4 ± 5.6 , 55.7 ± 3.5 and 67.0 ± 3.3 mmHg for control-, verapamil-, diltiazem- and nifedipine-treated animals, respectively, $n=9$).

In the animals treated with the verapamil, diltiazem or nifedipine, the increased heart rate induced by PNV was not observed. In addition, the autonomic disturbances described above (salivation, fasciculations and defecation) were not detected and no death was observed even after a second administration of PNV.

4. Discussion

Our results demonstrate that PNV produces a biphasic change in the MABP of anaesthetised rats which is characterised by a brief hypotension followed by long-lasting hypertension. In guinea-pig auricles, PNV promotes the release of both acetylcholine and noradrenaline from the autonomic nerve endings by a mechanism involving activation of voltage-dependent sodium channels (Vital-Brazil et al., 1988). However, it is unlikely that the initial fall in MABP caused by PNV is due to the release of acetylcholine from autonomic nerve endings in the cardiac muscle since the muscarinic receptor antagonist

atropine failed to affect this response. We have also ruled out the possibility that PNV increases MABP by releasing catecholamines since both α and β adrenoceptor antagonists (phenoxybenzamine and propranolol, respectively) had no effect on the PNV-induced hypertension.

Kinins (bradykinin and Lys-bradykinin) are known to cause vasodilatation by activating the B_2 receptor subtype (Bhoola et al., 1992). *Phoneutria nigriventer* venom activates the tissue kallikrein-kinin system in rabbit skin (Antunes et al., 1993b; Marangoni et al., 1993a; Bento et al., 1995) and rabbit corpus cavernosum (Lopes-Martins et al., 1994) leading to kinin release. The finding that the bradykinin B_2 receptor antagonist Hoe 140 (Wirth et al., 1991) did not affect PNV-induced hypotension excludes the possibility that PNV could be promoting kinin release from the rat plasma. Platelet-activating factor (PAF) is synthesised by different cell types and causes profound hypotension (Braquet et al., 1987). The failure of the PAF antagonist WEB 2086 (Casals-Stenzel et al., 1986) to affect PNV-induced hypotension indicates that PAF is not involved in this response. *Phoneutria nigriventer* venom stimulates peripheral endings of sensory C-fibers in rat skin, triggering the release of vasoactive neuropeptides such as substance P (Palframan et al., 1995). However, the finding that both NK_1 (SR 140333) and NK_2 (SR 48968) antagonists (Emonds-Alt et al., 1992, 1993) failed to affect the fall of MABP induced by PNV indicates that this may be restricted to extravascular administration of PNV.

Prostacyclin causes vasodilatation (Moncada et al., 1976) whereas thromboxane A_2 (Hamberg et al., 1975) causes vasoconstriction. Since the cyclooxygenase inhibitor indomethacin affected neither the decrease nor the increase in the MABP induced by PNV, we conclude that this venom does not act by stimulating the formation of the above products of arachidonic acid metabolism. The failure of PNV to release either prostacyclin or thromboxane A_2 from guinea pig isolated lungs (Antunes et al., 1993a) further reinforces this conclusion.

The activation of the renin-angiotensin system leads to the release of the potent vasoconstrictor peptide angiotensin II into the circulation thereby causing hypertension. The results showing that the angiotensin II receptor antagonist losartan (Chiu et al., 1990) had no effect on the PNV-induced hypertension indicate that the venom does not stimulate the release of angiotensin II.

Endothelin-1 (ET-1) also induces a biphasic MABP response characterized by a brief vasodilatation followed by a prolonged vasoconstriction (Yanagisawa et al., 1988). The vasoconstrictor effect caused by this peptide is mediated mainly by activation of the ET_A receptor subtype (Arai et al., 1990). The failure of the ET_A receptor antagonist FR 139317 (Sogabe et al., 1993) to affect the changes in MABP induced by PNV indicates that PNV acts neither by releasing ET-1 nor through the presence of ET-1-like substances in the venom itself. This contrasts with occurrence of ET-1-like peptides termed sarafotoxins in the venom of the snake *Atractaspis engandensis* (Bdolah et al., 1989). The initial vasodilatation induced by ET-1 is due to the release of nitric oxide (de Nucci et al., 1988), a potent vasodilator synthesised by endothelial cells (Furchgott and Zawadzki, 1980). The finding that the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME (Moore et al., 1989) had no effect on the PNV-induced vasodilatation indicates that the venom does not release nitric oxide.

The ATP-dependent potassium channel blocker glibenclamide (Cook, 1988; Edwards and Weston, 1990) reduced the hypotension induced by both cromakalim and PNV, indicating that the venom activates ATP-dependent potassium channels. Interestingly, the L-type calcium channels antagonists used in this study also inhibited the hypotension induced by PNV, suggesting that PNV may also open calcium-dependent potassium channels.

Our results demonstrate that L-type calcium channels antagonists such as verapamil (a phenylalkylamine), nifedipine (a dihydropyridine) and diltiazem (a benzothiazepine) greatly reduce PNV-induced hypertension indicating that the venom probably acts as a opener of L-type voltage-dependent calcium channels *in vivo*. These channels, which are activated at high-voltages and conduct a

long-lasting current of large conductance, are widely distributed in both vascular and cardiac muscle and are very sensitive to the classes of calcium antagonists used in this study (Spedding and Paoletti, 1992).

The treatment of the *Phoneutria* envenomation in general is symptomatic, attempting to alleviate the intense and radiating pain of the affected member. This is achieved using local anesthetic and/or specific serum therapy (antiarachnid serum) if the pain persists (Lucas, 1988). The severe human envenomation by *Phoneutria nigriventer* venom (especially in children) also causes cardiac perturbations characterized by tachycardia and arrhythmias. Since calcium channels blockers have been extensively used in adults and children for the management of cardiovascular disorders (Wagner et al., 1982; Porter et al., 1983; Cho and Pruitt, 1986), our results indicate that it would be worth investigating whether clinical use of commercially available calcium antagonists could attenuate or even prevent the cardiovascular perturbations and autonomic disturbances elicited by *Phoneutria* envenomation.

Acknowledgments

G. de Nucci and S.D. Brain thank the Wellcome Trust for support. EA thanks Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil).

References

Antunes E., R. A. Marangoni, N.C.C. Borges, H. Hyslop, M.D. Fontana and G. de Nucci, 1993a, Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle, Braz. J. Med. Biol. Res. 26, 81.

Antunes E., R.A. Marangoni, J.R. Giglio, S.D. Brain and G. de Nucci, 1993b, Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin by a fraction isolated from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom, *Toxicon* 31, 1385.

Antunes E., R.A. Marangoni, S.D. Brain and G. de Nucci G, 1992, *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin in vivo. *Toxicon* 30, 1011.

Arai S., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo and S. Nakanishi, 1990, Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor, *Nature* 348, 730.

Bdolah A., Z. Wollberg, G. Fleminger and E. Kochyva, 1989, SRTX-d, a new native peptide of the endothelin/sarafotoxin family, *FEBS Lett.* 256, 1.

Bento A. C., E. Rego, S.R. Pedroso-Mariani, L.C. Mancuso, J.R. Giglio, J.C. Novello, S. Marangoni, I. Caracelli, B. Oliveira, E. Antunes and G. de Nucci, 1995, Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin, *Toxicon* 33, 171.

Bhoola, K.D., C.D. Figueroa and K. Worthy, 1992, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases, *Pharmacol. Rev.* 44, 4.

Braquet P., T.Y. Shen, L. Touqui and B.B. Vargaftig, 1987, Perspectives in platelet-activating factor research, *Pharmacol. Rev.* 39, 97.

Brazil V. and J. Vellard, 1925, Contribuição ao estudo de venenos de aranhas I, *Mem. Inst. Butantan* 2, 1.

Casals-Stenzel J. G., G. Muacevic and K.H. Weber, 1986, WEB 2086, a new and specific antagonist of platelet-activating factor (PAF) in vitro and *in vivo*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 334, R44.

Chiu A. T., D.E. McCall, W.A. Price, P.C. Wong, D.J. Carini, J.V. Duncia, R.R. Wexler, S.E. Yoo, A.L. Johnson and P.B.B.W.M. Timmermans, 1990, The non-

peptide angiotensin II receptor antagonists: Cellular and biochemical pharmacology of losartan, an orally active antihypertensive agent, *J. Pharm. Exp. Ther.* 252, 711.

Cho C. and A.W. Pruitt, 1986, Therapeutic uses of calcium-channels blocking drugs in the young, *Am. J. Dis. Child.* 140, 360,

Cook, N. S., 1988, The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential, *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 21.

de Nucci G., R.J. Gryglewski, T.D. Warner and J.R. Vane, 1988, Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled, *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2334.

Edwards, G. and A.H. Weston, 1990, Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation, *Pharmacol. Ther.* 48, 237.

Emonds-Alt, X., J.D. Doutremepuich, M. Healme, G. Neliat, V. Santucci, R. Steinberg, P. Vilain, D. Bichon, J.P. Ducoux, V. Proietto, D. Van Broeck, P. Soubrié, G. Le Fur and J.C. Brelière, 1993, *In vitro* and *in vivo* biological activities of SR 140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist, *Eur. J. Pharmacol.* 250, 403.

Emonds-Alt, X., P. Vilain, P. Goulaouic, V. Proietto, D. Van Broeck, C. Advenier, E. Naline, G. Neliat, G. Le Fur and J.C. Brelière, 1992, A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor, *Life Sci.* 50, PL101.

Fontana M. D. and O. Vital-Brazil, 1985, Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 18, 557.

Furchgott R. F. and J.V. Zawadzki, 1980, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288, 373.

Hamberg M., J. Svensson and B. Samuelsson, 1975, Thromboxanes: a new family of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides, *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2994.

Lopes-Martins R. A. B., E. Antunes, M.L.V. Oliva, C.A.M. Sampaio, J. Burton and G. de Nucci, 1994, Pharmacological characterisation of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system, *Br. J. Pharmacol.* 113, 81.

Lucas S., 1988, Spiders in Brazil, *Toxicon* 26, 759.

Marangoni R. A., E. Antunes, S.D. Brain and G. de Nucci, 1993a, Activation by *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin in vivo, *Br. J. Pharmacol.* 109, 539.

Marangoni S., N.C.C. Borges, R.A. Marangoni, E. Antunes, A.C. Vieira, J.C. Novello, G.B. Domont, J.R. Giglio, B. Oliveira and G. de Nucci, 1993b, Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom, *Toxicon* 31, 377.

Moncada S., R. Gryglewski, S. Bunting and J.R. Vane, 1976, An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation, *Nature* 263, 663.

Moore P. K., A.O. AL-Swayeh, N.W.S. Chong, R.A. Evans and A. Gibson, 1989, L-NG-Nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vitro, *Br. J. Pharmacol.* 99, 408.

Palframan, R., P. Wilsoncroft, E. Antunes, G. de Nucci and S.D. Brain, 1995, Effect of a tachykinin NK₁ receptor antagonist SR140333 on the oedema formation induced in rat skin by venom from the *Phoneutria nigriventer* spider, Br. J. Pharmacol. 114, 353P.

Porter C. J., A. Garson and P.C. Gillette, 1983, Verapamil: An effective calcium blocking agent for pediatric patients, Pediatrics 71, 748.

Schenberg S. and F.A. Pereira-Lima, 1971, *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components, In: Venomous Animals and their Venoms, Eds. W. Bucherl and E.E. Buckley (New York: Academic Press), Vol. 3, p. 279.

Sogabe K., H. Nirei, M. Shoubo, A. Nomoto, S. Ao, Y. Notsu and T. Ono, 1993, Pharmacological profile of FR 139317, a novel, potent endothelin ET_A receptor antagonist, J. Pharmacol. Exp. Ther. 264, 1040,

Spedding M. and R. Paoletti R., 1992, Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. Pharmacol. Rev. 44, 363.

Vital Brazil O., G.B. Leite and M.D. Fontana M. D., 1988, Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia, Ciênc. Cult., S Paulo 40, 181.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki, 1988, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, Nature 332, 411.

Wagner J. G., A.P. Rochini and J. Vasiliades, 1982, Prediction of steady-state verapamil plasma concentrations in children and adults, Clin. Pharmacol. Ther. 32, 172.

Wirth, K., F.J. Hock, U. Albus, W. Linz, H.G. Alpermann, H. Anagnostopoulos, St. Henke, G. Breipohl, W. König, J. Knolle and B.A. Scholkens, 1991, Hoe 140,

a new potent and long-acting bradykinin antagonist: *in vivo* studies, Br. J. Pharmacol. 102, 774.

TABLE 1

Effect of Hoe 140 (0,6 mg/kg, i.p), WEB 2086 (20 mg/kg, i.v), N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 mg/kg, i.v), losartan (10 mg/kg, i.v), FR 139317 (30 mg/kg, i.v) and SR 140333 (0,5 mg/kg, i.v.) on the mean arterial blood pressure (MABP) changes induced by *Phoneutria nigriventer* venom (0,3 mg/kg).

Treatment	MABP decrease (mmHg)	MABP increase (mmHg)	n
PNV	43.6 ± 5.7	48.0 ± 5.7	5
PNV + Hoe 140	45.2 ± 9.6	55.0 ± 7.1	5
PNV	36.0 ± 9.0	42.4 ± 9.9	5
PNV + WEB 2086	49.6 ± 7.1	29.0 ± 8.2	5
PNV	36.0 ± 8.5	42.4 ± 10,0	5
PNV + L-NAME	43.8 ± 7.3	34.6 ± 7.3	5
PNV	31.2 ± 4.6	51.4 ± 8.5	5
PNV + Losartan	15.6 ± 2.2[*]	57.6 ± 5.4	5
PNV	33.0 ± 2.2	42.5 ± 4.8	7
PNV + FR 139317	36.8 ± 4.7	43.4 ± 3.9	7
PNV	25.2 ± 2.6	46.2 ± 11.6	6
PNV + SR 140333	22.0 ± 2.0	40,5 ± 5.2	6

The values are the mean ± SEM of *n* rats. *P<0,05 as compared to the control group.

TABLE 2

Reversal by verapamil and diltiazem of the established hypertension induced by *Phoneutria nigriventer* venom (0,3 mg/kg, i.v). Verapamil and diltiazem were intravenously infused 5 min after PNV administration.

Treatment	MABP (mmHg)		
	Basal	Maximal	8 min after calcium antagonists
		hypertension by PNV	
Saline (25 μl/min)	98.0 $\pm$ 6.0	145.0 $\pm$ 5.0*	139.0 $\pm$ 3.0
Verapamil (30 μg/kg/min)	106.0 $\pm$ 3.7	138.0 $\pm$ 6.6*	88.8 $\pm$ 4.6[#]
Diltiazem (120 μg/kg/min)	88.5 $\pm$ 5.9	131.5 $\pm$ 10,0*	89.5 $\pm$ 6.7[#]

MABP, mean arterial blood pressure. The values are the mean $\pm$ S.E.M. of 5 rats. *P<0,05 as compared to the basal MABP. [#]P<0,05 as compared to values obtained at the maximal hypertension.

**EVALUATION OF TWO DIFFERENT OXYGEN INSPIRATORY FRACTIONS
ON THE HAEMODYNAMIC EFFECTS OF N^{*}-NITRO-L-ARGININE METHYL
ESTER IN ANESTHETIZED DOGS**

Zappellini, A.*; Moreno Jr. H., Antunes, E. and de Nucci, G.

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of
Campinas, Campinas (SP), Brazil

*Author for correspondence

Aldete Zappellini

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

UNICAMP PO Box 6111

13081-970, Campinas - São Paulo

Brazil

Fax: 55 192 521516

AZ is supported by FAPESP, São Paulo, Brazil (Grant No. 92/0469-0).

2 de maio de 1995

Profa.Dra. Aldete Zappellini
Departamento de Farmacologia
Faculdade de Ciências Médicas
UNICAMP
Caixa Postal 6111
13081-970 Campinas SP

Ref. MS2244

Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs. A. Zappellini, H. Moreno Jr., E. Antunes, G. de Nucci

Prezada Dra. Aldete:

Temos a satisfação de comunicar a V.Sa. o recebimento do artigo acima mencionado, o qual se encontra em processo de análise de acordo com as normas da Revista. Favor utilizar o número da referência em futuras correspondências.

Atenciosamente,


Dalva Pizeta
Editora Executiva

Abstract

The effect of two different oxygen inspiratory fractions ($FiO_2=21\%$ or 100%) on the haemodynamic responses induced by N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in anesthetized dogs was investigated. L-NAME ($0,01\text{ mg/kg}$ - $10,0\text{ mg/kg}$), but not D-NAME, caused dose-dependent increases in the mean arterial blood pressure and in the systemic and pulmonary vascular resistances ($P<0,05$). In contrast, the cardiac output and the heart rate decreased ($P < 0,05$). The above changes were maximum after the highest dose of L-NAME. There was no significant differences in the foregoing responses to L-NAME between the dogs ventilated with $FiO_2=21\%$ and those ventilated with $FiO_2=100\%$. However, blood gas analyses revealed a marked pO_2 difference ($P < 0,05$) between the two experimental groups of animals although there was no statistical difference before or after L-NAME administration. These results indicate that nitric oxide release accounts for the maintainance of haemodynamic functions in the dog, and its action is not affected by hyperoxemia.

Key words: Haemodynamics, nitric oxide, N^G -nitro-L-arginine methyl ester, FiO_2

Introduction

Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (1), now identified as nitric oxide (NO) (2,3) modulates vascular smooth muscle tone and blood flow. NO acts by activating soluble guanylate cyclase (4) and/or calcium-dependent potassium channels (5). The NO synthesis inhibitors N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (6) and N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (7) induce hypertension when administered to rats. This effect is accompanied by a decrease in cardiac output, an increase in vascular resistance and bradycardia (8). The administration of L-NMMA to dogs decreases cardiac output, increases systemic, pulmonary and renal vascular resistances (9), and induces coronary vasoconstriction (10).

Pulmonary resistance increases in response to hypoxic ventilation in dogs and a greater increase can be achieved after blockade of NO biosynthesis (11). This effect suggests that NO release counteracts the hypoxic state. The present study was therefore designed to investigate the effects of L-NAME in anesthetized dogs ventilated with either room air (FiO₂=21%) or pure oxygen (FiO₂=100%).

Material and Methods

Experimental procedure

Mongrel dogs of either sex (provided by CEMIB-UNICAMP) weighing 12.4 ± 1.0 kg were initially anesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal®, 30 mg/kg, i.v.). The animals were intubated and artificially ventilated. The level of anaesthesia was maintained with a combination of fentanyl citrate (0,01

mg/kg/h), diazepam (0,25 mg/kg/h) and pancuronium bromide (0,1 mg/kg/h). The left femoral artery was cannulated for mean arterial blood pressure measurement using a MX-860 pressure transducer (Medex, USA). The left femoral vein was cannulated for drug administration. A 5F-Swan-Ganz-thermodilution catheter was introduced through the right femoral vein and advanced to the pulmonary artery. This catheter was connected to pressure transducers (MX-860, Medex, USA) to measure pulmonary arterial pressure and right atrial pressure. Cardiac output was measured at least in duplicate. The heart rate was also monitored. All catheters were filled with heparinised saline (10 IU/ml) to prevent clotting. The haemodynamic parameters were visualised on a computer monitor throughout the experiment and the events were recorded on a printer coupled to this system (SDM 2000, Dixtal, Brazil). The animals were allowed to stabilize for 30 minutes prior to any injections or infusions.

Experimental protocol

A dose-response curve to L-NAME (0,01-10,0 mg/kg, infused for 8 minutes at 0,5 ml/min) was performed in dogs ventilated with either room air ($\text{FiO}_2=21\%$) or pure oxygen ($\text{FiO}_2=100\%$). In another set of experiments, dogs were ventilated with $\text{FiO}_2=100\%$ and D-NAME was infused instead of L-NAME. Following the last dose of D-NAME, the highest dose of L-NAME was infused as a positive control. All the drugs were dissolved in physiological solution (0,9% w/v) immediately before use. The parameters detailed above were monitored after each dose of L-NAME or D-NAME.

Derivation of haemodynamic parameters

Systemic (SVR) and pulmonary (PVR) vascular resistances were calculated from the direct measurement of mean arterial blood pressure (MABP), pulmonary arterial pressure (PAP), right atrial pressure (RAP), heart rate (HR)

and cardiac output (CO). Vascular resistances and CO were also expressed as indices in which the values were calculated as a function of body surface area. Thus, SVR and PVR are presented as ISVR and IPVR, respectively. CO is expressed as the cardiac index (CI).

Blood gas analysis

Arterial blood was collected from the femoral artery into heparinised syringes for control (baseline) gas measurements and after the highest dose of L-NAME (10 mg/kg) in both groups of dogs. The analyses were carried out within 20 min of sampling and were performed using a Stat Profile 5 (Abott, USA).

Statistical analysis

The results are expressed as the means $\pm$ SEM. The dose-response curve to L-NAME in $\text{FiO}_2=21\%$ and 100% was compared to the control (baseline) values using Student's *t* test for paired data. The differences between D-NAME and L-NAME were compared using Student's paired *t* test. A *P* value $< 0,05$ was considered to be significant.

Drugs

N^ω-Nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME) was purchased from Bachem (Switzerland) and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) from Sigma (USA). Diazepam was purchased from Sanofi (Brazil). Fentanyl citrate was kindly donated by Cristália (Brazil) and pancuronium bromide was obtained from the University Hospital Pharmacy.

Results

Blood gas analyses

Ventilation of the dogs with pure oxygen ($\text{FiO}_2=100\%$) caused a significant increase in the arterial blood oxygen levels (pO_2) compared to the dogs ventilated with room air ($\text{FiO}_2=21\%$). There was no significant difference in the pCO_2 levels of the two ventilated groups ($n=3$, Table 1).

Mean arterial blood pressure

L-NAME caused a dose-dependent rise in MABP. At the highest dose, L-NAME increased MABP from $100,0 \pm 7.5$ to 139.0 ± 3.2 mmHg ($P<0,05$, $n=5$) and from 86.2 ± 5.0 to 125.1 ± 7.8 mmHg ($P<0,05$, $n=8$) in the $\text{FiO}_2=100\%$ and $\text{FiO}_2=21\%$ groups, respectively (Figure 1).

Cardiac index

L-NAME induced a dose-dependent decrease in CO. At 10 mg/kg, a 45.6% decrease ($P<0,05$, $n=5$) was observed in the $\text{FiO}_2=100\%$ group which corresponded to a decrease in the CI from $3.75 \pm 0,47$ to $2.04 \pm 0,19$ l/min/m². In the dogs ventilated with $\text{FiO}_2=21\%$, the CI decreased from $4.47 \pm 0,45$ to $2.65 \pm 0,34$ l/min/m² (40,7% decrease, $P<0,05$, $n=8$). The decreases observed in these two groups were not significantly different (Figure 1).

Index of systemic vascular resistance

SVR was markedly increased by L-NAME. In the $\text{FiO}_2=100\%$ group, the increase induced by the highest dose of L-NAME was 148.7% which

corresponded to an increase in the ISVR from 2236.0 ± 424.4 to 5561.2 ± 467.0 D.s/cm⁵/m² ($P < 0.01$, $n=5$). In the $FiO_2=21\%$ group, there was a similar increase (148.6%) with the ISVR increasing from 1661.6 ± 241.5 to 4131.2 ± 515.3 D.s/cm⁵/m² ($P < 0.01$, $n=8$). The increase in ISVR in the two groups were not significantly different (Figure 1).

Index of pulmonary vascular resistance

L-NAME increased PVR. In the $FiO_2=100\%$ group, at 10,0 mg/kg, IPVR increased from 145.2 ± 19.3 to 309.6 ± 33.0 D.s/cm⁵/m² ($P < 0.05$, $n=5$) while in the $FiO_2=21\%$ group, values increased from 192.1 ± 50.6 to 313.7 ± 53.2 D.s/cm⁵/m² ($P < 0.05$, $n=8$). There was no significant difference between these increases (Figure 1).

Heart rate

L-NAME induced dose-dependent bradycardia in both groups. In the $FiO_2=100\%$ dogs, HR decreased from 112 ± 11.3 to 70 ± 6.1 bpm (37.5% decrease, $P < 0.05$, $n=5$) while in the $FiO_2=21\%$ group the values decreased from 135 ± 15.7 to 93 ± 8.7 bpm (31.1% decrease, $P < 0.05$, $n=8$). These decreases were not statistically different (Figure 1).

PAP and RAP were not altered by L-NAME in either the dogs ventilated with room air or in those ventilated with pure oxygen (data not shown).

Responses to D-NAME

All the haemodynamic parameters remained unchanged after D-NAME administration ($n=5$, Figure 2).

Discussion

The present results demonstrate that both systemic and pulmonary functions of the anesthetized dog are modulated by NO release since L-NAME, but not its inactive enantiomer D-NAME, induced haemodynamic changes.

Following acute treatment with L-NAME, the dogs developed hypertension, in addition to an increase in systemic and pulmonary vascular resistances and decreases in CO and HR. The increase in SVR was the most prominent effect of L-NAME in both groups and has been reported in a variety of species including the rat (12), rabbit (11), pig (13), cat (14) and dog (9,15). Such a rise in SVR would explain the decrease in CO and may result from an increase in the after-load as previously suggested by Widdop *et al.* (12).

The decrease in CO may also be caused by L-NAME-induced bradycardia, although it has been reported that the bradycardia following L-NAME administration in rats is mediated by an increase in vagal activity (12).

Finally, the decrease in CO may result from coronary vasoconstriction and the consequent myocardial ischaemia. Although at the moment it is not possible to exclude the latter possibility, Richard *et al.* (10) have demonstrated in dogs that myocardial perfusion is not impaired, despite an increase in coronary vascular resistance. On the other hand, Huckstorf *et al.* (16) verified that although myocardial perfusion was impaired after acute NO synthesis blockade, cardiac performance would be maintained due to an adjustment of oxygen extraction.

An interesting finding was that PAP remained unchanged in spite of the great increase in PVR. It is likely that the right ventricle was unable in developing greater pressure against the increased after-load, what resulted in PAP levels within the normal range. On the other hand, the increased SVR would explain the systemic hypertension, despite a decrease in the CO. The L-NAME-induced haemodynamic changes were not modified by ventilating the dogs with either room air or pure oxygen. NO seems to compensate for the

increase in PVR that occurs during hypoxia since L-NAME aggravates this increase (17). Based on these observations, we conclude that NO plays an important role in maintaining haemodynamic functions in the dog, despite the change in the oxygen inspiratory fraction.

Acknowledgements

We are indebted to Ailton Fernando de Paula for his technical assistance.

References

1. Furchgott RF & Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 228: 373-376.
2. Palmer RMJ, Ferrige AG & Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
3. Ignarro LJ, Byrns RE, GM & Wood KS (1987). Endthelium - derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61: 866-879.
4. Ignarro LJ, Harrison RG, Wood KS & Kadowitz PJ (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 237: 893-900.
5. Bolotina VM, Sohelli N, Palacino JJ, Pagano PJ & Cohen RA (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368: 850-853.

6. Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NWS, Evans RA & Gibson A (1990). L- N^{G} -nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". *British Journal of Pharmacology*, 99: 408-412.
7. Rees DD, Palmer RMJ & Moncada S (1989). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, 86: 3375-3378.
8. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA & Bennett T (1990). Regional and haemodynamic effects of N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. *British Journal of Pharmacology*, 101: 625-631.
9. Perrella MA, Hildebrand Jr FL, Marguiles KB & Burnett Jr JC (1991). Endothelium-derived relaxing factor in regulation of basal cardiopulmonary and renal function. *American Journal of Physiology*, 261: R323-R328.
10. Richard V, Berdeaux A, la Rochelle CD & Giudicelli J-F (1991). Regional coronary haemodynamic effects of two inhibitors of nitric oxide synthesis in anesthetized, open-chest dogs. *British Journal of Pharmacology*, 104: 59-64.
11. Wiklund NP, Persson MG, Gustafsson LE, Moncada S & Hedqvist P (1990). Modulatory role of endogenous nitric oxide in pulmonary circulation in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 185: 123-124.
12. Widdop RE, Gardiner SM, Kemp PA & Bennett T (1992). The influence of atropine and atenolol on the cardiac haemodynamic effects of N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *British Journal of Pharmacology*, 105: 653-656.
13. van Gelderen EM, Boer MOD & Saxena PR (1993). N^{G} -nitro L-arginine methyl ester: systemic and pulmonary haemodynamics, tissue blood flow and arteriovenous shunting in the pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives in Pharmacology*, 348: 417-423.

14. Bower EA & Law ACK (1993). The effects of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside and noradrenaline on venous return in the anesthetized cat. *British Journal of Pharmacology*, 108: 933-940.
15. Klabunde RE, Ritger RC & Helgren MC (1991). Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. *European Journal of Pharmacology*, 199: 51-59.
16. Huckstorf C, Zanzinger J, Fink B & Bassenge E (1994). Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives in Pharmacology*, 349: 367-373.
17. Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S & Hedqvist P (1990). Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response *in vivo*. *Acta Physiol Scand*, 140: 449-457.

Figure 1: The haemodynamic effects of L-NAME in anesthetized dogs ventilated with either room air ($\text{FiO}_2=21\%$, $n=8$, o—o) or pure oxygen ($\text{FiO}_2=100\%$, $n=5$, o—o). L-NAME (0,01-10,0 mg/kg) was infused at a rate of 0,5 ml/min for 8 min. The values are the means $\pm$ SEM.

* $P<0,05$ when compared to the respective control (C).

Figure 2: The haemodynamic effects of either D-NAME ($n=5$, o—o) or L-NAME ($n=13$, o—o) in anesthetized dogs. D-NAME and L-NAME were infused at a rate of 0,5 ml/min for 8 minutes. The values are the means $\pm$ SEM.

* $P<0,05$ for the comparison L-NAME versus D-NAME.

**Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced
by acute nitric oxide synthesis inhibition in anaesthetized dogs and the
decrease in the cardiac output**

A. Zappellini*, H. Moreno Jr, E. Antunes, G. de Nucci

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of
Campinas, Campinas (SP), Brazil

*Author for correspondence

Aldete Zappellini

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

UNICAMP PO Box 6111

13081-970

Campinas - São Paulo - Brazil

Fax: 55 192 521516

British Journal of Pharmacology

EDITORIAL OFFICE

St. George's Hospital Medical School
Cranmer Terrace, London SW17 0RE

Tel: 0181-767 6765

Fax: 0181-767 5645

Telex: 945291 SAGEMS.G

Chairman of the Editorial Board:
Professor A.T. Birmingham

Secretaries to the Editorial Board:
Dr. R.W. Horton and Dr. W.A. Large

8 June, 1995

Dr Aldete Zappellini
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences - UNICAMP
PO Box 6111
13081-970 Campinas - SP
Brazil

Dear Dr Zappellini

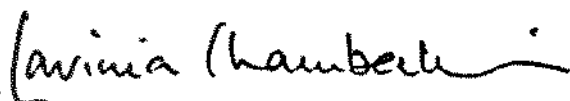
Thank you for having submitted a manuscript entitled "Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anaesthetised dogs" by A Zappellini, H Moreno Jr, E Antunes & G de Nucci for publication in the British Journal of Pharmacology. This will receive the careful consideration of the Editorial Board.

This is the peak period for holidays and conferences and, whereas every effort will be made to reach a decision with the minimum of delay, please make allowances for the lack of availability of Editors and Referees.

In the meantime I would be grateful if you would forward a set of keywords (maximum of ten) and a running title (consisting of not more than 50 characters) as these were omitted from your manuscript.

For further correspondence or enquiries, please use the above address and telephone number and refer to manuscript number 95 0706.

Yours sincerely



Lavinia Chamberlain
Editorial Assistant

Abstract

1 The decrease in cardiac output (CO) that follows *in vivo* nitric oxide (NO) synthesis inhibition has been suggested to be due to an increase in systemic vascular resistance (SVR). Here we have investigated whether vasodilators, such as sodium nitroprusside (SNP) and iloprost would avoid the decrease in CO induced by acute administration of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in anaesthetized dogs.

2 Left femoral artery and vein were cannulated for mean arterial blood pressure (MABP) measurement and drug administration, respectively. A Swan-Ganz-thermodilution catheter was inserted into the right femoral vein and was advanced to the pulmonary artery, for the determination of cardiac index (CI) and index of systemic vascular resistance (ISVR). Heart rate (HR) was also monitored.

3 L-NAME (0,01-10,0 mg kg⁻¹, n=13) induced dose-dependent increases in MABP and in the ISVR. At the highest dose of L-NAME, MABP increased from 91.5 ± 4.5 to $130,5 \pm 5.2$ mmHg ($p < 0,01$) while ISVR increased from 1882.5 ± 224.9 to 4681.2 ± 405.4 dyn.s cm⁵ m² ($p < 0,01$). These haemodynamic changes were accompanied by a decrease in the CI (from $4.19 \pm 0,33$ to $2.41 \pm 0,23$ l min⁻¹ m², $p < 0,01$) and bradycardia (from $126 \pm 10,8$ to 85 ± 6.7 b.p.m., $p < 0,01$).

4 SNP (1 µg kg⁻¹ min⁻¹, n=6) virtually abolished L-NAME-induced hypertension. SNP also prevented the increase in the ISVR induced by L-NAME (up to 3.0 mg kg⁻¹), and strongly attenuated the decrease in CO. The CI decreased from $4.67 \pm 0,43$ to $3.40 \pm 0,36$ l min⁻¹ m² in response to the highest dose of L-NAME (27.2% decrease *versus* 42.5% in control animals, $p < 0,05$).

5 Iloprost, a stable prostacyclin analogue (50 ng kg⁻¹ min⁻¹, n=6), abolished L-NAME-induced hypertension and markedly attenuated the increase in SVR. However, the decrease in CO was not prevented by this vasodilator (from $3.70 \pm$

0,28 to $2.52 \pm 0,18$ l min⁻¹ m², CI, before and after 10 mg kg⁻¹ of L-NAME, respectively, $p < 0,01$).

6 These results strongly indicate that the increase in SVR is not responsible for the decrease in CO following acute NO synthesis inhibition, suggesting that NO plays a fundamental role in controlling cardiac performance in the anaesthetized dog.

Introduction

Nitric oxide (NO) plays a fundamental role in controlling vascular smooth muscle tone and blood flow (Moncada *et al.*, 1991). *In vivo* inhibition of the L-arginine-NO pathway leads to widespread vasoconstriction and hypertension in a variety of species, including the dog (Persson *et al.*, 1990) and the human (Stamler *et al.*, 1994). These effects are accompanied by bradycardia and a decrease in cardiac output. It has been firmly suggested that the increase in systemic vascular resistance and consequently in the after-load is the major determinant of cardiac function impairment (Gardiner *et al.*, 1990; Widdop *et al.*, 1992; Herity *et al.*, 1994). Considering that inhibitors of NO synthase, such as N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Moore *et al.*, 1990), increase systemic vascular resistance, we evaluated the effect of two different vasodilators, sodium nitroprusside and iloprost, in preventing the haemodynamic changes, mainly the decrease in cardiac output, induced by acute NO synthesis inhibition in the anaesthetized dog.

Methods

Experimental Procedure

Mongrel dogs of either sex (12.4 ± 0.8 kg) were initially anaesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal®, 30 mg kg⁻¹, i.v.). The animals were intubated and artificially ventilated with pure oxygen. Anaesthesia was maintained with a combination of fentanyl citrate (0.01 mg kg⁻¹ h⁻¹), diazepam (0.25 mg kg⁻¹ h⁻¹) and pancuronium bromide (0.10 mg kg⁻¹ h⁻¹). The left femoral artery was cannulated for mean arterial blood pressure (MABP) measurement (MX-pressure transducer, Medex, USA) and the left femoral vein, for drug administration. A 7F-Swan-Ganz-thermodilution catheter was introduced through the right femoral vein and was advanced to the pulmonary artery. This catheter was connected to pressure transducers (MX-860, Medex, USA) in order to measure pulmonary arterial pressure (PAP) and right atrial pressure (RAP). Cardiac output (CO) was measured at least in duplicate. The heart rate (HR) was also monitored. All

catheters were filled with heparinized saline to prevent clotting. After a 20 minute period of stabilization, L-NAME ($0,01\text{-}10,0\text{ mg kg}^{-1}$, $0,5\text{ ml min}^{-1}$, 8 min) was administered to animals which have previously received iloprost ($50\text{ ng kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$, $0,5\text{ ml min}^{-1}$, $n = 6$), sodium nitroprusside (SNP, $1\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$, $0,5\text{ ml min}^{-1}$, $n=6$) or saline ($0,9\%$ w/v, $0,5\text{ ml min}^{-1}$, $n = 13$). The effects of iloprost and of sodium nitroprusside on basal haemodynamic parameters were measured 5 and 10 minutes after the beginning of each infusion. Saline, SNP or iloprost infusions were maintained throughout the experiment. SNP and iloprost doses were chosen from previous experiments where a dose-response curve was performed after the administration of the highest dose of L-NAME. All drugs were dissolved in saline just before use.

Calculation of haemodynamic parameters

The haemodynamic events, such as MABP, PAP, RAP, HR and CO, were continuously visualized on a computer monitor and were recorded on a printer coupled to this system (SDM 2000, Dixtal, Brazil), after each dose of L-NAME. From these haemodynamic parameters described above systemic vascular resistance (SVR) was obtained. SVR and CO are expressed as indices in which the values are corrected as a function of body surface area. Thus, SVR and CO are presented as ISVR and CI, respectively.

Drugs

The following drugs were used: diazepam (Sanofi, Brazil), iloprost (Schering, Germany), N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, USA), Sagatal[®] (May & Baker, England) and sodium nitroprusside (Sigma, USA). Fentanyl citrate was kindly donated by Cristalia (Brazil) and pancuronium bromide was obtained at the University Hospital Pharmacy.

Data and statistical analysis

Results represent mean $\pm$ s.e.mean and were analysed by ANOVA followed by paired or unpaired Student's *t* test. A *p* value $< 0,05$ was considered to be significant.

Results

Haemodynamic effects induced by L-NAME (control animals)

The infusion of L-NAME ($0,01$ - $10,0$ mg kg⁻¹) induced a dose-dependent rise in MABP (Figure 1, Panel A). The highest dose of L-NAME caused a 42.6% increase (from 91.5 ± 4.5 to $130,5 \pm 5.2$ mmHg, $p < 0,01$). This hypertension was accompanied by a dose-dependent increase in the ISVR (Figure 1, Panel D). In response to the highest dose of L-NAME, ISVR raised 148.7% (from 1882.5 ± 224.9 to 4681.2 ± 405.4 dyn.s cm⁻⁵ m⁻², $p < 0,01$). CI decreased in response to L-NAME administration (Figure 1, Panel B). The effect was maximum with 10 mg kg⁻¹ of L-NAME, which caused a 42.5% decrease (from $4.19 \pm 0,33$ to $2.41 \pm 0,23$ l min⁻¹ m⁻², $p < 0,01$). HR also decreased after L-NAME infusion (Figure 1, Panel C). At 10 mg kg⁻¹ HR fell 32.3% (from $126 \pm 10,8$ to 85 ± 6.7 b.p.m., $p < 0,01$).

Effect of SNP infusion on L-NAME-induced haemodynamic changes

SNP infusion (1 µg kg⁻¹ min⁻¹) evoked slight decreases in MABP and systemic vascular resistance with concomitant increases in CO and HR (Table 1). In the presence of SNP, the haemodynamic changes induced by L-NAME were attenuated. There was a slight increase (16.3%) in MABP after the highest dose of L-NAME (from 85.8 ± 3.2 to 99.8 ± 5.7 mmHg, $p < 0,05$, Figure 1, Panel A). Although it was observed a significant increase in SVR at 3 and 10 mg kg⁻¹ of L-NAME in these animals (Figure 1, Panel D), it was much lesser than that observed in control animals. At 10 mg kg⁻¹, L-NAME raised ISVR from 1542.0 ± 179.4 to 2492.8 ± 292.2 dyn.s cm⁻⁵ m⁻², ($p < 0,01$). SNP was also effective in

inhibiting the decreases in the CO (Figure 1, Panel B) and in the HR (Figure 1, Panel C). The highest dose of L-NAME decreased CI by 26.7% (from 4.67 ± 0.43 to 3.40 ± 0.36 l min⁻¹ m⁻², $p < 0.05$) and the HR, by 26.4% (from 144 ± 12.3 b.p.m. to 106 ± 12.6 b.p.m., $p < 0.01$), respectively.

Effect of iloprost infusion on L-NAME-induced haemodynamic changes

Iloprost infusion ($50 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) caused similar haemodynamic changes as those of SNP (Table 2), although the former was more potent than the latter. In the presence of iloprost, L-NAME did not change MABP, even at the highest dose (Figure 1, Panel A). Iloprost strongly attenuated the increase in ISVR (39.0% versus 148.7%, $p < 0.01$, Figure 1, Panel D) but did not prevent the CO fall. L-NAME (10 mg kg^{-1}) induced a 31.9% decrease in CI (from 3.70 ± 0.28 to 2.52 ± 0.18 l min m², $p < 0.01$, Figure 1, Panel B). HR decreased 23.1% after the administration of the highest dose of L-NAME (from 156 ± 9.2 to 120 ± 7.2 b.p.m., $p < 0.01$, Figure 1, Panel C).

Discussion

Our results clearly demonstrate that the decrease in CO induced by acute NO synthesis inhibition is not dependent on the increase in SVR. Several factors modulate CO, such as HR, after-load and myocardial contractility. Among these factors, the increase in SVR (after-load) that occurs in response to *in vivo* NO synthesis inhibition has been suggested to be the major determinant of the decrease in CO (Gardiner *et al.*, 1990; Widdop *et al.*, 1992; Herity *et al.*, 1994). Indeed, SNP treatment attenuated the increase in SVR induced by L-NAME as well as the decrease in CO. Similar results were observed in conscious rats, where SNP reversed the effects of two other NO synthesis inhibitors N^G,N^G, dimethyl-L-arginine and N^G-monomethyl-L-arginine (Gardiner *et al.*, 1993). The prostacyclin analogue, iloprost (Skuballa *et al.*, 1987), completely inhibited L-NAME-induced hypertension and notably attenuated the increase in SVR. In

contrast, iloprost did not prevent the decrease in CO, thus dissociating the increase in SVR from the CO fall induced by inhibition of NO synthesis.

Another parameter that regulates CO is the HR. Pre-treatment of conscious rats with atropine abolishes L-NAME-induced bradycardia without affecting the decrease in CO (Widdop *et al.*, 1992), indicating that HR does not account for the decrease in CO. This hypothesis is further supported by our results with iloprost, showing that the onset of bradycardia occurred with low doses of L-NAME (from 0,1 mg kg⁻¹ on) while the decrease in CO just happened with higher doses (3.0 and 10 mg kg⁻¹).

Myocardial contractility also modulates CO, what in turns, depends on oxygen supply and on coronary blood flow. Coronary vasoconstriction following NO synthesis inhibition has been described in the rabbit (Humphries *et al.*, 1991) and in the dog (Huckstorf *et al.*, 1994); in the latter, it is associated with an impairment in myocardial perfusion. Nitrovasodilators reduce cardiac pre-load and wall tension and thus oxygen consumption by the myocardium (Bassenge & Zanzinger, 1992). Our finding that SNP but not iloprost, may prevent the reduction in CO, reinforces the idea that the decrease in CO is mainly due to impaired myocardial perfusion. Indeed, in three distinct clinical trials prostacyclin did not benefit patients with acute myocardial ischaemia (Kiernan *et al.*, 1986; Armstrong *et al.*, 1988; Lichstein *et al.*, 1988).

In conclusion, our results clearly demonstrate that the decrease in cardiac output following NO synthesis inhibition by L-NAME is not dependent on the increase in systemic vascular resistance, indicating a pivotal role for NO in the maintenance of myocardial perfusion, and hence in cardiac performance.

AZ is supported by FAPESP, São Paulo, Brazil (Grant No. 92/0469-0). We are indebted to Airton Fernando de Paulo for his technical assistance.

References

- ARMSTRONG, P.W., LANGEVIN, L.M., WATTS, D.G. (1988). Randomized trial of prostacyclin infusion in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, **61**, 455-457.
- BASSENGE, E. & ZANZINGER, J. (1992). Nitrates in different vascular beds, nitrate tolerance, and interactions with endothelial function. *Am. J. Cardiol.*, **70**, 23B-29B.
- DAVID, H., GOOS, H., NOHRING, J., LINDENAU, K.F., BEHRISCH, D. (1985). Ultrastructural morphometric examinations on the protection provided by prostacyclin against myocardial ischaemia. *Exp. Pathol.*, **27**, 163-169.
- GARDINER, S.M., COMPTON, A.M., KEMP, P.A., BENNETT, T. (1990). Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 625-631.
- GARDINER, S.M., KEMP, P.A., BENNETT, T., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. (1993). Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G,N^G, dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1457-1464.
- HERITY, N.A., ALLEN, J.D., SILKE, B., ADGEY, A.A.J. (1994). Comparison of the ability of nicardipine, theophylline and zaprinast to restore cardiovascular haemodynamics following inhibition of nitric oxide synthesis. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 423-428.
- HUCKSTORF, C., ZANZINGER, J., FINK, B., BASSENGE, E. (1994). Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **349**, 367-373.
- HUMPHRIES, R.G., CARR, R.D., NICOL, A.K., TOMLINSON, W., O'CONNOR, S.E. (1991). Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N^G-nitro-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 565-566.

- KIERNAN, F.J., KLUGER, J., REGNIER, J.C., RUTKOWSKI, M., FIELDMAN, A. (1986). Epoprostenol sodium (prostacyclin) infusion in acute myocardial infarction. *Br. Heart J.*, **56**, 428-432.
- LICHSTEIN, E., MENDIZABAL, R., THEROUX, P., MULLER, O., WILLERSON, J.T., RAPAPORT, E., MOLK, B.L., LINET, O.I. (1988). Epoprostenol (prostacyclin) in unstable angina. *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 300-305.
- MONCADA, S., HIGGS, E.A., HODSON, H.F., KNOWLES, R.G., LOPEZ-JERAMILLO, L., MCCALL, T., PALMER, R.M.J., RADOMSKI, M.W., REES, D.D., SCHULZ, R. (1991). The L-Arginine:Nitric oxide pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (Suppl.3), S1-S9.
- MOORE, P.K., al-SWAYEH, O.A., CHONG, N.W.S., EVANS, R.A., GIBSON, A. (1990). L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". *Br. J. Pharmacol.*, **99**, 408-412.
- PERSSON, M.G., GUSTAFSSON, L.E., WIKLUND, N.P., MONCADA, S., HEDQVIST, P. (1990). Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response *in vivo*. *Acta Physiol. Scand.*, **140**, 449-457.
- SKUBALLA, W., RADUCHEL, B., VORBRUGGEN, H. (1987). Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost. In *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, ed. Gryglewski, R. & Stock, G. pp. 17-24, Berlin: Springer-Verlag.
- STAMLER, J.S., LOH, E., RODDY, M-A., CURRIE, K.E., CREAGER, M.A. (1994). Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*, **89**, 2035-2040.
- WIDDOP, R.E., GARDINER, S.M., KEMP, P.A., BENNETT, T. (1992). The influence of atropine and atenolol on the cardiac haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 653-656.

Table 1 Haemodynamic effects of SNP infusion ($1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) in anaesthetized dogs

	Control	5 min	10 min
MABP (mmHg)	$90,0 \pm 3.4$	$83.8 \pm 3.0^*$	$85.8 \pm 3.2^*$
CI ($\text{l min}^{-1} \text{m}^{-2}$)	$3.99 \pm 0,47$	$4.33 \pm 0,49$	$4.63 \pm 0,42$
HR (b.p.m.)	127 ± 16.6	$140 \pm 13.3^*$	135 ± 13.5
ISVR ($\text{dyn.s cm}^{-5} \text{m}^{-2}$)	1907.8 ± 228.4	1644.7 ± 213.1	1542.0 ± 179.4

Values are mean $\pm$ s.e.mean * $p < 0,05$ versus control values

Table 2 Haemodynamic effects of iloprost infusion ($50 \text{ ng kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) in anaesthetized dogs

	Control	5 min	10 min
MABP (mmHg)	94.3 ± 2.8	$78.7 \pm 7.5^*$	$76.0 \pm 8.2^*$
CI ($\text{l min}^{-1} \text{m}^{-2}$)	$2.83 \pm 0,26$	$3.74 \pm 0,20^{**}$	$3.70 \pm 0,28^*$
HR (b.p.m.)	111 ± 13.4	138 ± 12.3	$156 \pm 9.2^*$
ISVR ($\text{dyn.s cm}^{-5} \text{m}^{-2}$)	$2755.8 \pm 220,5$	$1698.2 \pm 202.9^*$	$1695.3 \pm 283.8^*$

Values are mean $\pm$ s.e.mean * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ (versus control)

Bioequivalence study of two enalapril maleate tablet formulations in healthy male volunteers.

Pharmacokinetic vs. pharmacodynamic approach.

Ribeiro, W.¹, Muscará, M.N.¹, Martins, A.R.², Moreno Jr H.¹, Mendes, G.B.¹ and de Nucci, G.¹

⁽¹⁾Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP and ⁽²⁾Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Author for correspondence:

Gilberto de Nucci, MD, PhD,

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit,

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences,

UNICAMP, PO Box 6111,

13084-100, Campinas, SP,

Brazil.

INTRODUCTION

Enalaprilat (MK 422, N-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl-L-proline) is a potent angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, which is effective in lowering blood pressure in essential and renovascular hypertension ^{1, 2}. Enalaprilat reduces the plasma levels of angiotensin II and aldosterone and leads to an increase in the concentration of endogenous vasodilators of the kinin family (eg, bradykinin) ^{5, 6, 7}.

Enalaprilat is commercialized as its maleate ester (MK421, enalapril) which has enhanced gastrointestinal absorption². About 60% of the Enalapril doses is absorbed after oral administration, although the compound itself is not a potent angiotensin converting enzyme inhibitor. Subsequent *in vivo* hydrolysis of enalapril in the liver results in the production of the active diacid form, enalaprilat, which is poorly absorbed ^{1, 3}. The peak plasma concentration of the pro-drug is generally observed around one hour, after oral administration, while for enalaprilat this maximum occurs 2 - 4 hours after enalapril ingestion ^{8, 9, 10}.

A significant proportion of enalaprilat (43%) is eliminated in the urine ^{12, 13, 14}. Elimination is biphasic, with an initial phase which reflects renal filtration (elimination half-life of 2 to 6 hours) and a subsequent prolonged phase (elimination half-life of 36 hours), which represents equilibration of the drug from tissue distribution sites. The prolonged phase does not contribute to drug accumulation following repeated administrations but is thought to be of pharmacological significance in mediating the drugs effects ^{9, 10}.

Various studies have shown a correlation between the plasma concentration of enalaprilat and the inhibition of ACE activity, as well as the distribution of ACE inhibition in the tissues of spontaneously hypertensive rat after the oral administration of enalapril ⁵.

In this paper, we have evaluated the bioequivalence of two different normal-release pharmaceutical preparations of enalapril maleate (10 mg tablets). Both formulations were assessed by comparing their serum enalaprilat and total enalapril concentrations vs. time curves. In additions the correlation between the

plasma concentration of either enalaprilat or total enalapril and ACE activity was also studied for both formulations.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Eighteen healthy male adult volunteers, aged 20 to 36 years (mean $\pm$ S.E.M. = 30 ± 1 yr), body weight 49.7 to 96.6 (mean $\pm$ S.E.M. = 70 ± 4 yr) participated in this study. All subjects gave their written informed consent, and the clinical protocol was approved by the University Hospital Ethics Committee. The volunteers were free of significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal, hematological and psychiatric disorders as determined by the individual history, physical examination, ECG and routine laboratory tests (blood glucose, urea, creatinine, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, gamma GT, cholinesterase, total bilirubin, total protein, albumin, uric acid, sodium, potassium, chloride, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate, and routine urinalysis). The volunteers were hospitalized at 11:00 pm on the night prior to the study having already eaten a normal evening meal. After an overnight fast on each of the two occasions, the subjects received a single oral dose of 20 mg of enalapril maleate (two 10 mg tablets) of either the test or the reference formulation in a randomized cross-over manner. The two test periods were separated by a two week wash-out interval. Three hours after dosing the subjects were given 200 ml of tap water, but abstained from food for six hours after the drug administration, after which time a standard lunch was available. No other food was permitted during the "in-house" period. Liquid refreshment was permitted *ad libitum* after lunch, but drinks containing xanthine (including tea, coffee and cola) were avoided.

Drugs and reagents

Commercially available 10 mg enalapril maleate tablets Eupressin[®] (lot N° 93030513) were obtained from Biosintética, SP and Renitec[®], (lot N° 92041446) from Merck Sharp & Dhome, SP, Brazil.

Compound 351A and rabbit anti-lisinopril [MK 521; N-(1-carboxy)-3-phenylpropyl) L-Lys- L-Pro] antiserum were a gift from Dr. M. Hichens, Merck, Sharp and Dhome Research Laboratories, USA.

Dibasic potassium phosphate was obtained from Merck Ind. Quim., RJ and other reagents, including disodium EDTA, sodium azide, bovine serum albumin, dextran (MW 162.000) and charcoal were obtained from Sigma Chem. Co., St. Louis, USA.

Blood sampling

Blood samples for serum drug quantification were taken from a suitable forearm vein before and at 0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 hours after dosing. On each occasion, one 10 ml sample was collected into a clean tube via an undwelling catheter. Blood samples were allowed to clot at room temperature and the sera were then separated by centrifugation (2,000 g, 10 min) and stored at -20°C until assayed. All samples from a given volunteer were assayed within the same run in order to avoid inter-assay variations.

Sample Analysis

Serum samples were analyzed for their content of enalaprilat and total enalapril (enalaprilat plus enalapril maleate) by radioimmunoassay (RIA). The method was originally developed for the determination of serum enalaprilat using the ¹²⁵I-labeled compound 351-A (351-A is the p-hydroxy-benzamidine derivative of lisinopril) as the tracer and a specific antibody raised against MK 521¹⁵.

Iodination of compound 351-A

Compound 351-A, an active site-directed inhibitor of ACE, was iodinated by the chloramine T method. Unreacted ^{125}I was eliminated by passing the iodination mixture through a Sep-Pak C_{18} cartridge. Iodinated 351-A was further purified by HPLC using a Bondapak C_{18} column equilibrated with 90 % solvent A (100 mM Na_2HPO_4 plus 0,2% H_3PO_4) and 10% solvent B (90 % aqueous acetonitrile plus 0,2 % H_3PO_4) and eluted with a linear gradient (10 - 50% B in 60 min) at 1.0 ml/min. Fractions of 0,5 ml were collected. Mono-[^{125}I]-compound 351-A (retention time: 34,3 min) was well resolved from the di-iodo-compound (retention time: 45 min) and from 351-A (retention time: 29,8 min). Fractions containing the mono-[^{125}I]-compound were pooled (4 ml) and contained a total activity of 156.5 μCi and specific activity of about 2000 Ci/mmol.

Radiomunoassay

Twenty μl of serum and standard curve samples (constructed by spiking blank serum with known amounts of enalaprilat ranging from 0,34 to 85 ng/ml) were added to 200 μl of the assay buffer (0,05 M dibasic potassium phosphate, 0,01M disodium EDTA, 0,1% sodium azide and 1 mg/ml bovine serum albumin, with the pH adjusted 7.5), 100 μl of ^{125}I -MK351-A diluted in assay buffer (equivalent to 16.000 cpm / tube) and 500 μl of a 1:10,000 dilution of rabbit anti-MK521 antiserum in assay buffer. After a 18-24 hour incubation period at 4 °C, a dextran-charcoal suspension (2% charcoal plus 0,4% dextran in assay buffer without albumin) were added and the tubes vortex mixed following a further incubation for 15 min in ice-cold water. All the tubes were centrifuged at 4°C (2,000 g during 20 min), and a 800 μl aliquot of the supernatants separated for radioactivity counting in a gamma spectrometer (Beckman Gamma 5500, Beckman, USA).

Total enalapril concentration was quantified by RIA, after a previous desesterification of enalapril maleate to enalaprilic acid by a crude rat liver esterases preparation. Briefly, a rat liver was homogenized in 10 volumes (W/V)

of cold saline and centrifuged during 30 min at 4,800 *g* at 4°C. The supernatant was aliquoted and stored at -20°C. The serum samples and standard curve (constructed by spiking free enalapril serum with known amounts of enalapril maleate, from 2.1 to 512 ng/ml) were incubated with 10 µl of a supernatant rat liver homogenate (diluted 1:5 at the time of use) during 12 h at room temperature. This mixture was subjected to RIA analysis as described above.

Sample enalaprilat and total enalapril concentrations were calculated from the linear plot obtained by linear regression between the logit transformation of corrected B/B_0 values and the log-transformed enalaprilat and total enalapril concentrations from the standard curves, respectively.

Serum ACE assay

Serum ACE activity was determined by measuring the amount of hippuric acid released by the enzyme from the synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) at pH 8.3 and 37°C²⁰. The released hippuric acid was quantified spectrophotometrically after reaction with cyanuric chloride at 382 nm²¹.

Pharmacokinetic and Statistical Analysis

Serum enalaprilat and total enalapril concentrations were plotted as a function of time and the following pharmacokinetic parameters were obtained for each formulation from the obtained pharmacokinetic curves: the area under the concentration vs. time curves from 0 to 24 hours ($AUC_{[0-24]}$), the maximum achieved concentration (C_{max}) and the time at which they occurred (T_{max}). From the terminal log-decaying phase, a first order elimination constant (K_e) was estimated by linear regression and a terminal half-life value ($T_{1/2}$) was estimated using the equation $T_{1/2} = \ln 2 / K_e$. These data were analyzed statistically employing parametric (one-way ANOVA) and non-parametric statistical tests (Wilcoxon rank sum test²⁴).

RESULTS

Figures 1 and 2 show the time-course of enalaprilat and total enalapril concentrations obtained in eighteen healthy male volunteers, respectively.

The pharmacokinetic parameters obtained from these volunteers for the two enalapril maleate tablet formulations are shown in Tables 1 (enalaprilat) and 3 (total enalapril).

The geometric means AUC [0-24], of the MK-422 were compared in both formulations and no significant difference was observed between Eupressin and Renitec (table 1). The C_{max} geometric mean for Eupressin and Renitec were 80 and 71 ng/ml, respectively (table 1). The T_{max} differences were not significantly different from 0 (table 2).

The geometric means for the AUC [0-24] and C_{max} were calculated for Total enalapril and no difference was observed in either of them (table 3). In addition no difference in the T_{max} was observed. As shown in table 4, the 90 % CI for the T_{max} differences : ranged from -0,3 to 1.4h.

Figure 3 shows the ACE activity versus time curves for both enalapril maleate formulations.

CONCLUSION

When MK-422 concentrations vs. time curves (figure 1) were employed to assess bioequivalence, no difference was observed between the two formulations of absorption. However, bioequivalence could not be concluded for the rate absorption, even though the individual T_{max} differences were not significantly different from 0 (Tables 1 and 2).

When Total enalapril concentrations vs. time curves (figure 2) were employed to assess bioequivalence, no difference was observed in either the extent or the rate of enalapril absorption (Tables 3 and 4).

These conclusions regarding the bioequivalence of the two formulations using the MK-422 and Total enalapril concentrations were based on FDA requirements (Food and Drug Administration, 1985) i. e. the pharmacokinetic analysis of AUC

[0-24], C_{max} , K_e , $T_{1/2}$, and T_{max} (Tables 1 and 3). Statistical treatments of AUC [0-24], C_{max} , K_e , and $T_{1/2}$ data (and their individual ratios) and of the T_{max} differences yielded the same results when either parametric or nonparametric tests were used for analysis (tables 2 and 4).

Enalapril is an orally active prodrug which is hydrolyzed by hepatic esterases to form MK-422. Thus endogenous enzymatic activity is an additional kinetic pathway influencing the circulating pro-drug concentration.

Our results indicate that quantification of the total drug is more appropriate for determining the bioequivalence of serum MK-422 concentrations vs. time.

ACE inhibition vs. time curves (Figure 3) were similar for both formulations with the degree of inhibition being about 80 % up to 12h after enalapril administration. Such inhibition appeared to be independent of the circulating concentration of MK-422 or Total enalapril.

This observation suggests that the measurement ACE activity is not a suitable pharmacodynamic approach for assessing bioequivalence.

REFERENCES

- 1-Todd PA, Goal KL. Enalapril: A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 1992; 43: 346-3831.
- 2-Todd PA, Heel RC. Enalapril: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*.1986;31:198-248.
- 3-PATCHETT,A.A., HARRIS,E., TRISTRAM,E.W., WYAVRATT,M.J., WU,M.T., TAUB,D., PETERSON,E.R., IKELER,T.J., ten BROEKE,J., PAYNE,L.G., ONDEYKA,D.L., THORSETT,E.D., GREENLEE,W.J., LOHR,N.S., HOFFSOMMER,R.D., JOSHUA,H., RUYLE,W.V., TOTHROCK, J.W., ASTER,S.D., MAUCCOCK,A.L., ROBINSON,F.M., HIRSCHMANN,R., SWEET,C.S., ULM,E.H., GROSS,D.M., VASSIL,T.C. and STONE,C.A. (1980): A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, 288: 280-283.

- 4-WILLIAMS,G.H. (1988): Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *The New England Journal of Med.*, 319(23): 1517-1524.
- 5-DZAU, V.J. (1988). Circulation versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 77(Suppl. I): 1-4.
- 6-FALKENHAHN,M., GOHLKE,P., PAUL,M., STOLL,M., and UNGER,T. (1994). The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. *Jour.Cardiovasc. Pharmac.*, 24(2): S6-S13.
- 7-VANHOUTTE,P.M, BOULANGER,C.M.,ILLIANO,S.C., NAGAO,T., VIDAL,M., and OMBOULI,J.V. (1993). Endothelium-Dependent Effects of Converting-Enzyme Inhibitors.*Jour.Cardiovasc. Pharmac.*, 22 (5): S10-S16.
- 8-TODD, P.A.; HEEL, R.C. (1986). Enalapril: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*. 31: 198-248.
- 9-KELLY, J.G. and O'MALLEY,K. (1990). Clinical pharmacokinetics of the newer ACE inhibitors, a review. *Clin. Pharmacokinet.* 19(3): 177-196.
- 10-MACFADYEN, R.J.; MEREDITH, P.A.; ELLIOT, H.L. (1993). Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. *Clin. Pharmacokinet.* 25(4): 274-282.
- 11-VERTES,V., and HAYNIE,R. (1992). Comparative pharmacokinetics of captopril, enalapril, and quinapril. *The Amer.Jour.of Cardio.*, 69: 8C-16C.
- 12-KELLY,J.G.; DOYLE,G.D.; CARMODY,M.; GLOVER,D.R. & COOPER,W.D. (1988). Pharmacokinetic of lisinopril, enalapril and enalaprilat in renal failure: effects of haemodialysis. *Br.J.Clin.Pharmac.* 26: 781-786.
- 13-KELLY, J.G.; DOYLE, J.; DONOHUE, J.; LAHER, M.; VANDEMBURG, M.J.; CURRIE, W.J.C.; & COOPER, W.D. (1986). Pharmacokinetics of enalapril in normal subjects and patients with renal impairment. *Br.J.Clin.Pharmac.* 21: 63-69.

- 14-LOWENTHAL,D.T., IRVIN,J.D., MERRILL,D., SARIS,S., ULM,E., GOLDSTEIN,S., HICHENS,M., KLEIN,L., TILL,A., and HARRIS,K. (1985). The effect of renal function on enalapril kinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 38(6): 661-666.
- 15-EDEKI,T. JONHSTON,A., LI KAM WA,E. and TURNER,P. (19??). Enalapril pharmacokinetics and ACE inhibition, following single and chronic oral dosing.
- 16-HITCHENS,M., HAND,E.L., MULCAHY,W.S. (1981). Radioimmunoassay for angiotensin converting enzyme inhibitors. Ligand Q, 4: 43.
- 17-DUNCAN,F.M., MARTIN,V.I., WILLIAMS,B.C., AL-DUJAILI,E.A.S., and EDWARDS C.R.W. (1983). Development and optimisation of a radioimmunoassay for plasma captopril. Clinica Chimica Acta. 131: 295-303.
- 18-SWANSON,B.N., HICHENS,M., MOJAVERIAN,P., FERGUSON,R.K., VLASSES,P.H. and DUDASH,M. (1981): Angiotensin converting enzyme activity in human serum: relationship to enzyme inhibitor *in vivo* and *in vitro*. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol., 33: 525-536.
- 19-BIOLLAZ,J.;BURNIER,M.;TURINI,G.A., BRUNNER,D.B., PORCHET,D.V.M.M., GOMEZ,H.J., JONES,K.H., FERBER,F., ABRAMS,W.B., GAVRAS,H., and BRUNNER, H.R. (1981). Three new long-acting converting-enzyme inhibitors: relationship between plasma converting-enzyme activity and response to angiotensin I. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 29: 665-670,
- 20-HAYAKARI,M.; KONDO,Y. and IZUMI,H. (1977). A rapid and simple spectrophotometric assay of ACE. Analytical Biochemistry. 84: 361-369.
- 21-HURST,P.L. and LOVELL-SMITH,C.J. (1981). Optimized assay for serum ACE activity. Clinical Chemistry. 27(12): 2048-2052.
- 22-CUSHMAN,D.W. and CHEUNG,H.S. (1970). Spectrophotometric assay and properties of the ACE of rabbit lung. Biochemical Pharmacology. 20: 1637-1648.

23-SHIOYA,H.; SHIMOTO,M. and DAWAHARA,Y. (1991). Determination in plasma of ACE inhibitor by inhibitor-binding assay. *Journal of Chromatography*. 568: 309-314.

24- Hauschke et al. [1990].

Figure 1

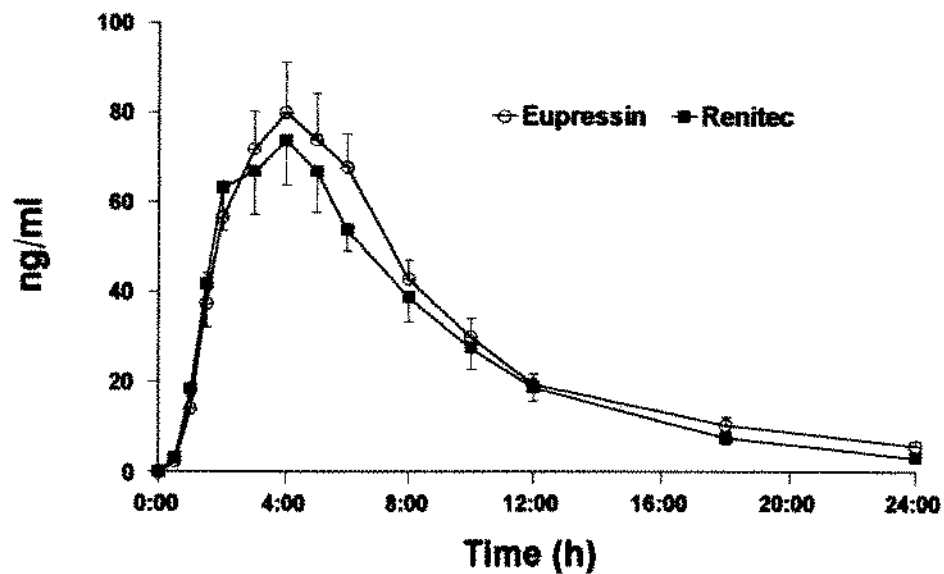


Figure 2

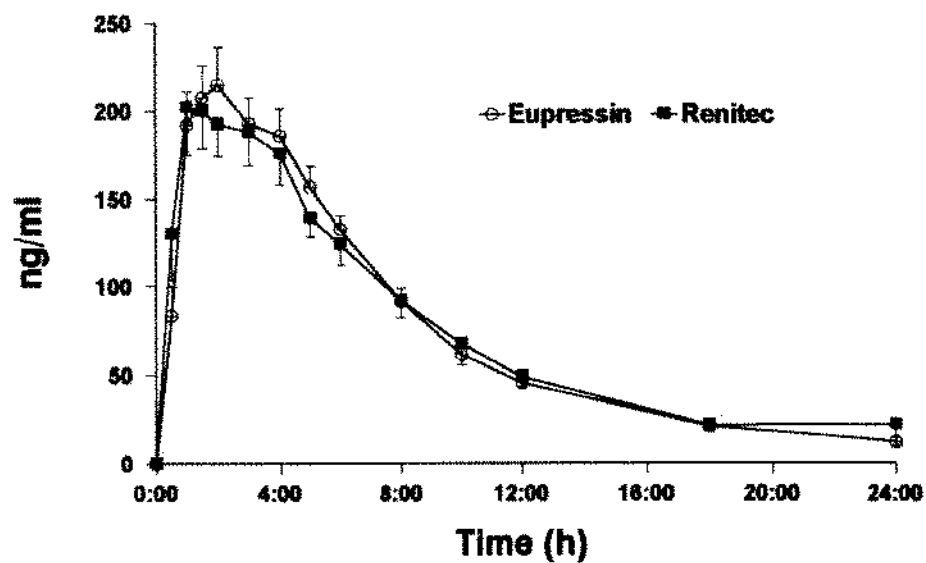


Figure 3

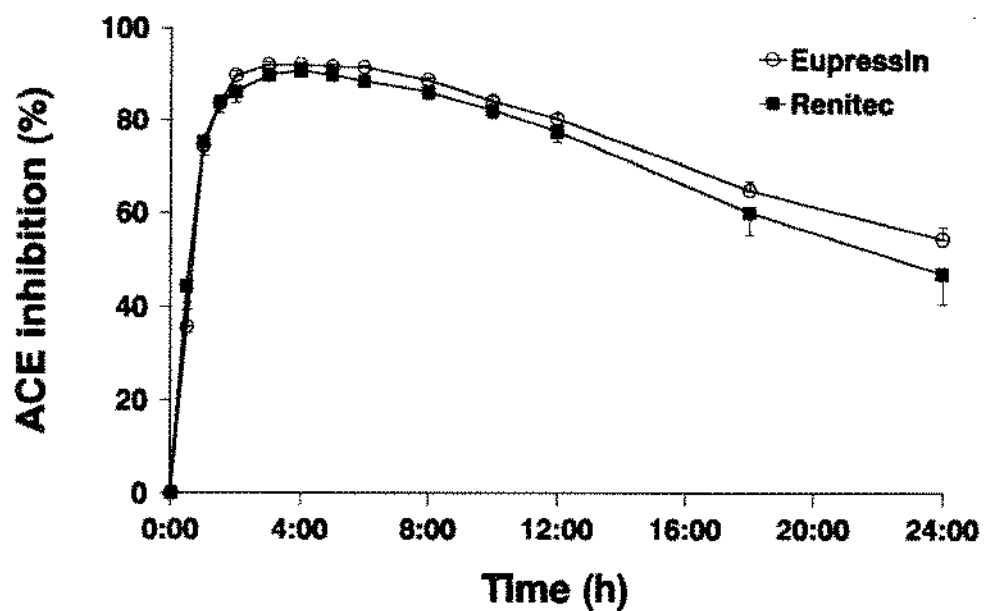


TABLE 1

	EUP	REN
AUC _[0-24] (ng h ml ⁻¹)		
Geom. mean	631	553
90% CI	516 - 771	443 - 691
C _{max} (ng/ml)		
Geom. mean	80	71
90% CI	65 - 98	55 - 92
K _e (h ⁻¹)		
Geom. mean	0,17	0,18
90% CI	0,15 - 0,20	0,15 - 0,20
T _{1/2} (h)		
Geom. mean	4.0	3.9
90% CI	3.5 - 4.7	3.4 - 4.5
T _{max} (h)		
Median	4.0	4.0
Range	1.5 - 8.0	1.5 - 8.0

TABLE 2

EUP / REN	PARAMETRIC		NON PARAMETRIC*	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
AUC _[0-24] % Ratio	110,9	99.6 - 123.6	112.4	99.8 - 125.0
C _{max} % Ratio	112.3	96.2 - 131.0	114.6	92.6 - 136.1
K _e % Ratio	114.2	84.2 - 111.3	93.5	79.7 - 108.8
T _{1/2} %Ratio	103.1	90,0 - 118.0	106.3	91.7 - 123.4
T _{max} Difference (h)	-0,1**	-0,7 - 0,6	0,0	-0,5 - 0,5

TABLE 3

	EUP	REN
AUC _[0-24] (ng h ml ⁻¹)		
Geom. mean	1682	1736
90% CI	1501 - 1886	1544 - 1953
C _{max} (ng/ml)		
Geom. mean	227	242
90% CI	196 - 262	203 - 289
K _e (h ⁻¹)		
Geom. mean	0,16	0,16
90% CI	0,14 - 0,19	0,14 - 0,18
T _{1/2} (h)		
Geom. mean	4.4	4.4
90% CI	3.7 - 5.1	3.9 - 5.0
T _{max} (h)		
Median	2.0	1.5
Range	1.0 - 6.0	0,5 - 6.0

TABLE 4

EUP / REN	PARAMETRIC		NON PARAMETRIC*	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
AUC _[0-24] % Ratio	96.9	84.1 - 111.7	105.2	86.3 - 113.7
C _{max} % Ratio	93.8	81.1 - 108.4	95.9	82.9 - 109.1
K _e % Ratio	101.3	89.3 - 115.0	97.1	88.7 - 108.9
T _{1/2} %Ratio	98.5	86.9 - 111.5	104.0	92.7 - 112.0
T _{max} Difference (h)	0,6**	-0,3 - 1.4	0,5	-0,25 - 1.25

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Serum enalaprilat concentrations (mean $\pm$ S.E.M.) versus time curves obtained from eighteen healthy male volunteers after a single administration (2 x 10 mg) of each enalapril maleate tablet formulation.

Figure 2. Serum total enalapril concentrations (mean $\pm$ S.E.M.) versus time curves obtained from eighteen healthy male volunteers after a single administration (2 x 10 mg) of each enalapril maleate tablet formulation.

Figure 3. Serum ACE inhibition (relative to basal activity values, as mean $\pm$ S.E.M) vs. time curves obtained from eighteen healthy male volunteers after a single administration (2 x 10 mg) of each enalapril maleate tablet formulation.

LEGENDS TO TABLES

TABLE 1: Mean enalaprilat pharmacokinetic parameters obtained from eighteen healthy male volunteers for both 10 mg enalapril maleate tablet formulations.

TABLE 2: Statistical analysis of individual $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , K_e and $T_{1/2}$ ratios and T_{max} differences obtained for enalaprilat between EUP and REN enalapril maleate tablet formulations.

(*) According to Hauschke et al. [1990]. (**) Arithmetic mean.

TABLE 3: Mean total enalapril pharmacokinetic parameters obtained from eighteen healthy male volunteers for both 10 mg enalapril maleate tablet formulations.

TABLE 4: Statistical analysis of individual $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , K_e and $T_{1/2}$ ratios and T_{max} differences obtained for total enalapril between EUP and REN enalapril maleate tablet formulations.

(*) According to Hauschke et al. [1990]. (**) Arithmetic mean.

Editors: D. De Wied, J. Bruinvels, F.P. Nijkamp and D.H.G. Versteeg

Please mention the manuscript number in all your correspondence!

30 May 1995

Ref.95/2072/H

Dr. E. Antunes
Dept. of Pharmacol.
Fac. of Med. Sciences
UNICAMP
P.O. Box 6111
13081-970 CAMPINAS (SP)
Brazil

Dear Dr. Antunes,

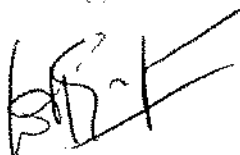
Thank you for the revised manuscript no. E4823 (E4183), entitled:

Effect of chronic nitric oxide inhibition on the inflammatory
responses induced by carrageenin in rats,

which can be accepted for publication in the EUROPEAN
JOURNAL OF PHARMACOLOGY as it stands now.

I have forwarded the manuscript to the publisher, who will
contact you directly with regard to galley proofs and other
business matters.

Yours sincerely,



W.H. Gispen, Ph.D. (editor)

Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats

Marta V. Medeiros, Iramaia M. Binhara, Heitor Moreno Jr., Gilberto De Nucci, Edson Antunes *

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, P.O. Box 6111, 13081-970 Campinas (SP), Brazil

Received 5 December 1994; revised 10 March 1995; accepted 30 May 1995

Abstract

The effect of chronic inhibition of nitric oxide (NO) biosynthesis has been investigated in two models of acute inflammation induced by carrageenin, i.e., paw oedema and pleurisy. Chronic inhibition of NO biosynthesis was achieved by including *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in the drinking water to give a dose of approximately 75 μmol/rat/day for 2 and 4 weeks. Control animals received either tap water alone or the inactive enantiomer D-NAME. Since chronic NO inhibition increases blood pressure, rats made hypertensive (2 kidney-1 clip model; 2K-1C) were used to evaluate the effect of hypertension on the carrageenin-induced paw oedema. In a separate set of experiments, L-NAME-treated animals concomitantly received captopril (140 μmol/rat/day) to prevent hypertension. Animals chronically treated with L-NAME (but not D-NAME) for 2 and 4 weeks developed hypertension to the same extent as 2K-1C rats. Carrageenin-induced paw oedema was significantly reduced in animals chronically treated with L-NAME, but not with D-NAME or in 2K-1C rats. Subplantar injection of iloprost completely reversed the inhibition of paw oedema caused by L-NAME. Captopril (140 μmol/rat/day) significantly lowered the high blood pressure levels induced by L-NAME but it did not significantly affect the inhibition of paw oedema caused by L-NAME. No changes in vascular permeability, as assessed by Evans blue extravasation, were observed in L-NAME-treated animals. The chronic treatment with L-NAME for 2 and 4 weeks did not inhibit carrageenin-induced leucocyte migration and fluid exudation into the pleural cavity. Although carrageenin-induced paw oedema is reduced in L-NAME-treated rats, this response reflects a decrease in local blood flow rather than an effect on vascular permeability.

Keywords: Iloprost; Nitric oxide (NO); Acute inflammation; Captopril; Hypertension; (2K-1C rat)

1. Introduction

The acute inflammatory reaction is characterised by exudation of fluid and plasma proteins leading to a local oedema formation consisting of leucocyte-dependent and leucocyte-independent components (for review see Garcia-leme, 1989). These vascular changes are produced by different mediators which act mainly by increasing microvascular permeability to macromolecules in the postcapillary venules thus enhancing plasma protein efflux. The administration of vasodilators such as prostaglandin E₁ (Williams and Peck, 1977; Chahl, 1977; Amelang et al., 1981; Yong and

Mayhan, 1992), prostaglandin E₂ (Ikeda et al., 1975), prostacyclin (Williams, 1979), tachykinins (Brain et al., 1985; Gamse and Saria, 1985) and vasoactive intestinal polypeptide (Williams, 1982) markedly potentiates the increased vascular permeability induced by various agents. This potentiation has been explained as a result of an arteriolar vasodilator action of vasodilators further increasing local blood flow (Williams and Peck, 1977). In contrast, the potentiation of oedema formation induced by prostaglandin E₁ in hamster cheek pouch (Joyner et al., 1979) and canine forelimb (Amelang et al., 1981) has been attributed to a direct action of this agent on the microvascular membrane leading to an increase in the number of large venular gaps which is not influenced by major changes in blood flow.

* Corresponding author. Fax 55 192 52 1516.

Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator agent produced by the endothelium (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987) and modulates the microvascular tone in certain vascular beds (Gardiner et al., 1990). Nitric oxide is involved in the modulation of the acute inflammation since acute administration of NO inhibitors affects both the interaction of inflammatory cells with the endothelium (Kubes et al., 1991; Kurose et al., 1993) and the vascular protein leakage (Hughes et al., 1990; Ialenti et al., 1992; Antunes et al., 1992; Kubes and Granger, 1992; Paul et al., 1994; Giraldelo et al., 1994). In this study, we have investigated the involvement of NO in the inflammatory responses (paw oedema and pleurisy) induced by carrageenin in rats chronically treated with the NO synthase inhibitor *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and its inactive enantiomer D-NAME. Since the chronic treatment of rats with L-NAME leads to hypertension (Ribeiro et al., 1992), we have carried out experimental studies using animals made hypertensive by the occlusion of the left renal artery (2 kidney-1 clip model). Captopril was also added to the drinking water in order to reduce the increased blood pressure induced by chronic L-NAME administration.

2. Materials and methods

2.1. Measurement of paw oedema

Male Wistar rats (150–200 g) were used. Oedema was induced by a single sub-plantar injection of carrageenin (1 mg/paw) into the left hind paw of the rat under light ether anaesthesia. The total volume injected was always 0.1 ml. The paw volume was measured immediately before the injection and at hourly intervals thereafter using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). The results were expressed either as the increase in paw volume (ml) calculated by subtracting the basal volume or by calculating the area under the time-course curve (AUC; ml h) for each group.

2.2. Assessment of vascular response with Evans blue

Evans blue (25 mg/kg, 2.5% w/v in 0.45% NaCl) was injected i.v. immediately before subplantar injection of carrageenin into the left hind paw. Four hours later, the animals were killed and the paws were removed and minced. The minced paws were then incubated with formamide (5 ml) for 48 h at 37°C. The solution was subsequently filtered and the optical density of the filtrate measured at 619 nm in a Uvikon 810 spectrophotometer (Lykke and Cummings, 1969). The amounts of Evans blue were expressed as µg/paw and the results presented as the difference in the amounts

of Evans blue between the oedematogenic paw and the contralateral paw.

2.3. Measurement of pleurisy

Male Wistar rats (150–200 g) were lightly anaesthetised under ether and submitted to a skin incision at the level of the left sixth intercostal space. The underlying muscles were dissected and either carrageenin (0.1, 0.5 and 1 mg/cavity) or sterile saline injected into the pleural cavity. The total volume injected was always 0.2 ml. The skin incisions were closed with a suture and the animals allowed to recover. At 2, 4 and 6 h after the injection of carrageenin, the animals were exsanguinated under ether anaesthesia by cutting the cervical vessels. The chest was carefully opened and the pleural cavity washed with 5 ml of heparinized (10 U/ml) phosphate buffered saline (0.1 M, pH 7.4). The exudate and washings were removed by aspiration and the total volume measured. Exudates contaminated with blood were discarded. The results were calculated subtracting the volume injected (5 ml) from the total volume recovered. The number of leucocytes in the exudate was counted by conventional techniques.

2.4. Two kidney-1 clip (2K-1C) model

Male Wistar rats (150–180 g) anaesthetised with sodium pentobarbital (Sagatal, 40 mg/kg i.p.) were used. Two kidney-1 clip hypertension was induced by compression of a silver clip reduced to 0.2 mm aperture around the left renal artery.

2.5. Chronic treatment with L-NAME and D-NAME

The chronic treatment with L-NAME was performed as previously described (Ribeiro et al., 1992). Briefly, the animals received L-NAME (or D-NAME) in the drinking water for up to 4 weeks. L-NAME (or D-NAME) was dissolved in the drinking water at a concentration of 1.2 mM to give a daily intake of approximately 75 µmol/rat/day. Control animals received tap water alone. The average daily intake of both water and food did not differ significantly between L-NAME-treated and untreated rats. In some experimental groups, captopril (2.3 mM) was added to the drinking water together with L-NAME to give a daily intake of approximately 140 µmol/rat/day. Systemic arterial pressure was estimated weekly by a tail-cuff method (Zatz, 1990).

2.6. Drugs

N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester and λ -carrageenin were obtained from Sigma Chemical Co. (USA). Nitro-D-arginine methyl ester and iloprost were obtained

from Bachem (Switzerland) and Schering (Germany), respectively. Captopril was provided by Squibb (USA).

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. for n experiments. Statistical comparison was undertaken by means of Student's unpaired t -test (two-tailed) or analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni corrected P value for multiple comparisons. Values of $P < 0.05$ were considered as significant.

3. Results

3.1. Blood pressure

Fig. 1 shows that addition of L-NAME, but not D-NAME, to the drinking water resulted in a significant elevation of mean arterial blood pressure ($P < 0.05$), as measured 2 and 4 weeks after the treatment ($n = 20$ –50). In addition, 2K-1C rats ($n = 30$) developed hypertensive levels which did not differ significantly from the L-NAME-treated rats after 2 and 4 weeks (Fig. 1). The blood pressure of 2K-1C rats was not further increased by concomitant treatment with L-NAME (Fig. 1). The co-administration of captopril ($n = 20$) in the drinking water significantly reduced the increased blood pressure induced by L-NAME administration (Fig. 1).

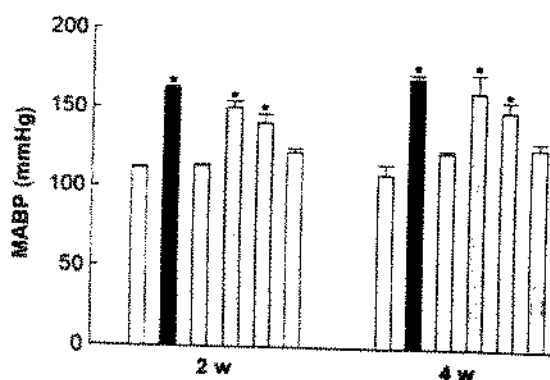


Fig. 1. Addition of L-NAME (approximately 75 μ mol/rat/day) to the drinking water for 2 (2 W) and 4 weeks (4 W) markedly enhances the mean arterial blood pressure (MABP; solid columns) compared to the control animals (open columns). D-NAME had no effect on MABP (horizontal striped columns). The addition of captopril to the drinking water for 2 and 4 weeks significantly reversed the increased MABP induced by L-NAME (vertical striped columns). The MABP of 2K-1C rats 2 and 4 weeks following the sub-occlusion of the left renal artery (cross-hatched columns) and for 2K-1C rats receiving L-NAME (white dotted columns) is also shown. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 15–20 animals. * $P < 0.05$ compared to control animals receiving tap water alone.

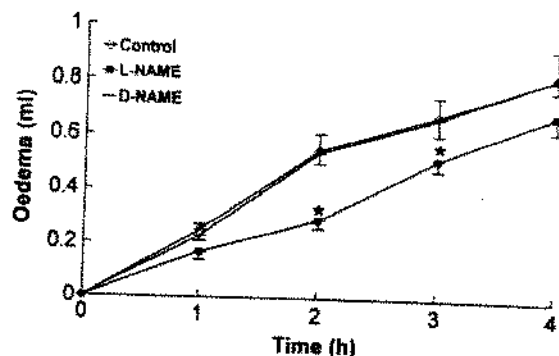


Fig. 2. The inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by chronic treatment with L-NAME for 2 weeks (■) compared to control animals receiving either tap water (O) or D-NAME (□). The procedure for L-NAME administration is described in the Materials and methods section (see also the legend to Fig. 1). The oedema is expressed as the increase in volume (ml) of the injected paw compared to its basal volume. Each point represents the mean of five rats; S.E.M. is shown by the vertical bars. * $P < 0.05$ compared to control animals.

3.2. Carrageenin-induced oedema

The carrageenin-induced oedema was significantly reduced in animals chronically treated with L-NAME for either 2 weeks (2.6 ± 0.2 and 1.7 ± 0.1 ml h, AUC for control- and L-NAME-treated animals, respectively, $n = 15$, $P < 0.01$; Fig. 2) or 4 weeks (3.2 ± 0.3 and 1.6 ± 0.2 ml h, AUC for control- and L-NAME-treated animals, respectively, $n = 15$ –20, $P < 0.01$; Fig. 3). The reduction of carrageenin-induced oedema by chronic L-NAME was not accompanied by significant changes in the protein leakage (at 2 weeks: 291 ± 49 and 268 ± 29 μ g Evans blue/paw for control- and L-NAME-treated animals, respectively; at 4 weeks: 312 ± 32 and 243 ± 31 μ g Evans blue/paw for control- and L-NAME-treated animals, respectively, $n = 5$). The

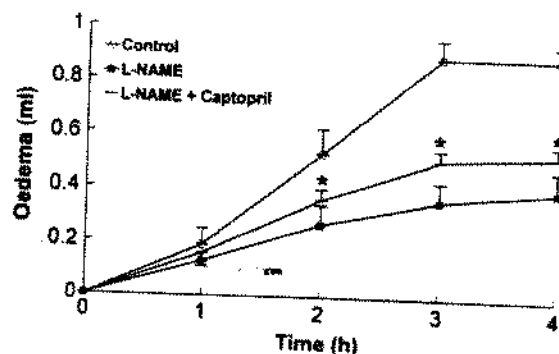


Fig. 3. Captopril does not significantly reverse the L-NAME-induced inhibition of carrageenin (1 mg/paw)-induced rat paw oedema. The symbols represent control animals receiving tap water (O), L-NAME alone (■) and L-NAME + captopril (□). Captopril (140 μ mol/rat/day) was added to the drinking water together with L-NAME for 4 weeks. The oedema is expressed as the increase in volume (ml) of the paw compared to its basal volume. Each point represents the mean of ten rats; S.E.M. is shown by the vertical bars. * $P < 0.05$ compared to control animals.

basal protein leakage was also not affected by chronic treatment with L-NAME (22 ± 3.0 , 23 ± 1.7 and 24 ± 1.8 μg Evans blue/paw for control and for L-NAME-treated animals at 2 and 4 weeks, respectively, $n = 5-10$). Chronic administration of D-NAME did not significantly affect the carrageenin-induced oedema ($n = 5$, Fig. 2). The subplantar injection of iloprost (0.3 nmol/paw) significantly potentiated carrageenin-induced oedema (2.1 ± 0.4 and 4.9 ± 0.3 ml h, AUC for control- and iloprost-treated paws, respectively, $n = 5$, $P < 0.01$). At this dose, iloprost impaired the inhibition by L-NAME (4 weeks treatment) of the carrageenin-induced oedema (1.4 ± 0.3 and 5.0 ± 0.7 ml h, AUC for control- and iloprost-treated animals, respectively, $n = 5$).

In contrast to the L-NAME-treated group, the carrageenin-induced oedema was not reduced in 2K-1C rats ($n = 24$; Fig. 4); actually, a significant increase was observed (Fig. 4). In addition, the paw oedema was not further inhibited in 2K-1C rats which received L-NAME for 4 weeks ($n = 5$, Fig. 4) compared to L-NAME-treated animals. Chronic treatment of the animals with captopril for 4 weeks (Fig. 3) did not significantly affect the inhibition by L-NAME of the carrageenin-induced oedema (2.6 ± 0.3 , 1.2 ± 0.2 and 1.6 ± 0.2 ml h, AUC for control-, L-NAME- and L-NAME + captopril-treated animals, respectively, $n = 10$).

3.3. Carrageenin-induced pleurisy

Intrapleural injection of carrageenin caused dose-dependent (0.2 ± 0.1 , 0.7 ± 0.08 and 1.1 ± 0.2 ml 6 h

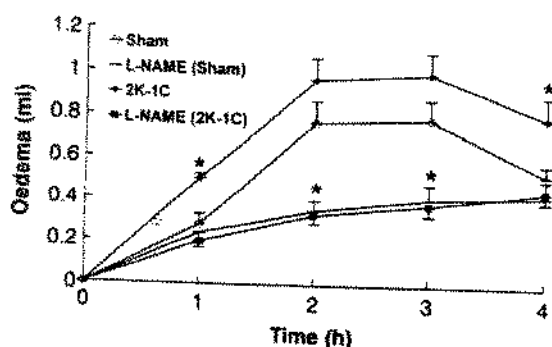


Fig. 4. Two kidney-one clip (2K-1C) rats (◆) did not show diminished carrageenin (1 mg/paw)-induced paw oedema as compared to normotensive sham-operated animals (○). The surgical procedure involved in the ligation of the left renal artery is described in the Materials and Methods section. Four weeks treatment of sham-operated animals with L-NAME significantly inhibited carrageenin-induced oedema (■). The oedematogenic response in 2K-1C rats receiving L-NAME (dose above; ●) was not different from sham-operated animals receiving L-NAME. The oedema is expressed as the increase in volume (ml) of the paw compared to its basal volume. Each point represents the mean of five rats; S.E.M. is shown by vertical bars. * $P < 0.05$ compared to normotensive sham-operated animals.

Table 1

Formation of pleural exudate and leucocyte infiltration induced by carrageenin in rats chronically treated with either L-NAME or D-NAME for 2 and 4 weeks

Treatment	Pleural exudate (ml)		Leucocyte counts (cells $\times 10^6$ /cavity)	
	Two weeks	Four weeks	Two weeks	Four weeks
Control	0.84 ± 0.1	0.45 ± 0.12	78.0 ± 8.1	64.6 ± 5.2
D-NAME	0.74 ± 0.2	n.d.	77.0 ± 10.5	n.d.
L-NAME	0.78 ± 0.15	0.4 ± 0.18	68.8 ± 3.6	60.8 ± 5.9

Pleural exudate and leucocyte counts (cells $\times 10^6$ /cavity) were evaluated 6 h after the intrapleural injection of carrageenin (0.5 mg/cavity). L-NAME and D-NAME were added to the drinking water at a dose of approximately $75 \mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$. The counts represent the mean number of leucocytes $\pm$ S.E.M. for 8–10 animals. n.d., not determined.

after 0.1, 0.5 and 1.0 mg carrageenin/cavity, respectively; $n = 5$) and time-dependent (0.6 ± 0.2 , 0.7 ± 0.1 and 1.1 ± 0.2 ml for 2, 4 and 6 h, after intrapleural administration of 0.5 mg carrageenin/cavity, respectively; $n = 5$) exudate formation into the pleural cavity. Intrapleural injection of carrageenin also induced dose-dependent (10.8 ± 1.0 , 43.3 ± 6.7 and $75.8 \pm 9.4 \times 10^6$ cells/cavity 4 h after 0.1, 0.5 and 1.0 mg carrageenin/cavity, respectively, $n = 5-15$) and time-dependent (12.2 ± 1.7 , 37.4 ± 4.7 and $71.0 \pm 7.5 \times 10^6$ cells/cavity for 2, 4 and 6 h, after intrapleural administration of 0.5 mg carrageenin/cavity, respectively, $n = 5$) leucocyte infiltration into the pleural cavity. The dose of 0.5 mg/cavity and the 6 h time point were selected for further studies. Chronic treatment with L-NAME for either 2 or 4 weeks affected neither the formation of pleural exudate nor the leucocyte infiltration (Table 1). At the 6 h time point, intra-pleural administration of carrageenin (0.5 mg/cavity) in control animals ($n = 5$) induced migration of neutrophils ($72.6 \pm 3.8\%$), eosinophils ($2 \pm 0.3\%$) and mononuclear cells ($26.2 \pm 3.8\%$). Chronic treatment with L-NAME for 4 weeks did not alter the cell pattern observed following carrageenin administration ($76.2 \pm 9\%$, $2.4 \pm 0.6\%$ and $21.4 \pm 0.7\%$ for neutrophils, eosinophils and mononuclear cells respectively, $n = 5$).

4. Discussion

We have demonstrated here that the chronic administration of L-NAME (but not D-NAME) inhibits carrageenin-induced rat paw oedema, indicating that endogenous NO modulates local oedema formation. However, the mechanism by which NO modulates protein and fluid leakage has not been definitely established. Although it is believed that acute administration of L-NAME reduces albumin extravasation in response to a decrease in local microvascular blood

flow in both rat (Hughes et al., 1990; Ialenti et al., 1992), guinea-pig (Teixeira et al., 1993) and rabbit (Mariani-Pedroso et al., 1995) skin as well as oedema formation in the rat hind-paw (Antunes et al., 1990, 1992; Ialenti et al., 1992; Giraldeho et al., 1994), NO *per se* seems to modulate microvascular permeability in the hamster cheek pouch by a mechanism independent of local blood flow (Mayhan, 1992). However, our results showing that the vasodilator prostacyclin analogue iloprost (Skuballa et al., 1987) reversed the inhibition by L-NAME of the carrageenin-induced oedema indicate that instead of directly affecting permeability, L-NAME probably acts by reducing regional blood flow. This conclusion is supported by the observation that both basal and carrageenin-induced plasma extravasation are not significantly affected by the administration of L-NAME. Whether this discrepancy (inhibition of oedema without concomitant inhibition of protein extravasation) reflects different kinetics of the two events, remains to be further investigated.

In contrast to our observations in the rat hind-paw, in other microcirculatory beds including rat large airways, liver, spleen, pancreas, kidney, stomach and duodenum (Filep and Foldes-Filep, 1993), cat mesenteric circulation (Kubes and Granger, 1992), rat coronary circulation (Filep et al., 1993) and rat mesenteric venules (Kurose et al., 1993), L-NAME increases microvascular protein efflux indicating that NO has a protective role in the endothelium by minimising the loss of fluid and protein. Whether this discrepancy could be due to atropine-like properties of L-NAME (Buxton et al., 1993) remains to be investigated.

The hypertension induced by chronic treatment with L-NAME is mediated by activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (Ribeiro et al., 1992). However, rats made hypertensive by activation of this system (2K-1C) did not show reduced oedema formation indicating that high circulating levels of angiotensin II are not a major component responsible for the modulation of local microvascular blood flow in the rat paws. Furthermore, captopril markedly reduced the increased blood pressure resulting from chronic L-NAME treatment but did not significantly reverse the L-NAME-mediated inhibition of the carrageenin-induced oedema. These results suggest that the reduction in microvascular blood flow in response to L-NAME is not dependent on the increased blood pressure of the animals but probably reflects a local absence of NO production.

Carrageenin-induced oedema in the 2K-1C rats was significantly higher as compared to sham-operated animals. Interestingly, 1K-1C animals present increased blood kinin levels as compared to normotensive controls (Salgado et al., 1986). Since kinins are involved in the carrageenin-induced oedema (Di Rosa et al., 1971), it is possible that the augmented oedematogenic re-

sponse observed in these animals could be due to increased kinins levels. This could also explain the increased oedematogenic response observed in the L-NAME-treated rats that received captopril.

The inflammatory response induced by carrageenin is dependent on circulating leucocytes (Spector and Willoughby, 1959; Di Rosa et al., 1971). Neutrophils and mononuclear cells synthesise NO (Salvemini et al., 1989) and this mediator is believed to exhibit an inhibitory effect on the adherence and emigration of leucocytes in the postcapillary venules (Kubes et al., 1991). However, the ability of NO inhibitors of suppressing leukocyte accumulation is controversial (Mulligan et al., 1991; Teixeira et al., 1993), probably reflecting sensitivity of the vascular bed to NO. Our finding that chronic treatment with L-NAME affected neither the formation of pleural exudate nor the leukocyte migration induced by carrageenin indicates that NO does not modulate these phenomena in this particular microcirculatory bed.

Acknowledgments

M.V.M. is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). G.D.N. thanks FAPESP (Grant No. 92/3496-9).

References

- Amelang, E., C.M. Prasad, R.M. Raymond and G.J. Grega, 1981, Interactions among inflammatory mediators on edema formation in the canine forelimb, *Circ. Res.* 49, 298.
- Antunes, E., M. Mariano, G. Cirino, S. Levi and G. De Nucci, 1990, Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema, *Br. J. Pharmacol.* 101, 986.
- Antunes, E., C.M.M. Giraldeho, G. Cirino and G. De Nucci, 1992, Effects of *N*^G-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat hind-paw oedema, in: *Biology of Nitric Oxide – Physiological and Clinical Aspects*, eds. S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs and E.A. Higgs (Portland Press, New York) p. 264.
- Brain, S.D., T.J. Williams, J.R. Tippins, H.R. Morris and I. MacIntyre, 1985, Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator, *Nature* 313, 54.
- Buxton, I.L.O., D.J. Check, D. Eckman, D.P. Westall, K.M. Sanders and K.D. Keef, 1993, *N*^G-Nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginines are muscarinic receptor antagonists, *Circ. Res.* 72, 387.
- Chahl, L.A., 1977, Interactions of substance P with putative mediators of inflammation and ATP, *Eur. J. Pharmacol.* 44, 45.
- Di Rosa, M., J.P. Giroud and D.A. Willoughby, 1971, Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine, *J. Pathol.* 104, 15.
- Filep, J.G. and E. Foldes-Filep, 1993, Modulation by nitric oxide of platelet-activating factor-induced albumin extravasation in the conscious rat, *Br. J. Pharmacol.* 110, 1347.
- Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, 1980, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288, 373.
- Gamse, R. and A. Satta, 1985, Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide, *Eur. J. Pharmacol.* 114, 61.

- Garcia-Leme, J., 1989, Chemical mediation in inflammation, in: *Hormones and Inflammation*, ed. J. Garcia-Leme (CRC Press, Boca Raton, FL) p. 49.
- Gardiner, S.M., A.M. Compton, P.A. Kemp and T. Bennett, 1990, Regional and cardiac haemodynamic effects of *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats, *Br. J. Pharmacol.* 101, 625.
- Giraldelo, C.M.M., A. Zappellini, M.N. Muscará, I.M.S. De Luca, S. Hyslop, G. Cirino, R. Zatz, G. De Nucci and E. Antunes, 1994, Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro, *Eur. J. Pharmacol.*, 257, 87.
- Hughes, S.R., T.J. Williams and S.D. Brain, 1990, Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P, *Eur. J. Pharmacol.* 191, 481.
- Ialenti, A., A. Iannaro, S. Moncada and M. Di Rosa, 1992, Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, *Eur. J. Pharmacol.* 211, 177.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns and G. Chaudhuri, 1987, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265.
- Ikeda, K., K. Tanaka and M. Katori, 1975, Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increase by prostaglandin E₂ and arachidonic acid in rabbit skin, *Prostaglandins* 10, 747.
- Joyner, W.L., E. Svensjo and K.-E. Arfors, 1979, Simultaneous measurements of macromolecular leakage and arteriolar blood flow as altered by PGE₁ and B₂-stimulation in the hamster cheek pouch, *Microvasc. Res.* 18, 301.
- Kubes, P., M. Suzuki and D.N. Granger, 1991, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4651.
- Kurose, I., P. Kubes, R. Wolf, D.C. Anderson, J. Paulson, M. Miyasaka and D.N. Granger, 1993, Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage, *Circ. Res.* 73, 164.
- Lykke, A.W.J. and R. Cummings, 1969, Inflammation in healing. I. Time course and mediation of exudation in wound healing in the rat, *Br. J. Exp. Pathol.* 50, 309.
- Mariani-Pedroso, S., L. Bizeto, R. Zatz, E. Antunes and G. De Nucci, 1995, Dissimilarity between prostaglandin E₁ and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* (in press).
- Mayhan, W.G., 1992, Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin, *Inflammation* 16, 295.
- Mulligan, M.S., J.M. Hevell, M.A. Marietta and P.A. Ward, 1991, Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6338.
- Palmer, R.M.J., A.G. Ferrige and S. Moncada, 1987, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327, 524.
- Paul, W., G.J. Douglas, L. Lawrence, A.M. Khawaja, A.C. Perez, M. Schachter and C.P. Page, 1994, Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.* 111, 159.
- Ribeiro, M.O., E. Antunes, G. De Nucci, S.M. Lovisolo and R. Zatz, 1992, Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension, *Hypertension* 20, 298.
- Salgado, M.C.O., S.F. Rabito and O.A. Carretero, 1986, Blood kinin in one-kidney, one-clip hypertensive rats, *Hypertension* 8, 1-110.
- Salvemini, D., G. De Nucci, R. Gryglewski and J.R. Vane, 1989, Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6328.
- Skuballa W., B. Radüchel and H. Vorbrüggen, 1987, Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost, in: *Prostacyclin and its Stable Analogue Iloprost*, eds. R. Gryglewski and G. Stock (Springer-Verlag, Berlin) p. 17.
- Spector, W.G. and D.A. Willoughby, 1959, The demonstration of the role of mediators in turpentine pleurisy in rats by experimental suppression of the inflammatory changes, *J. Pathol. Bact.* 77, 1.
- Teixeira, M.M., T.J. Williams and P.G. Hellewell, 1993, Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin, *Br. J. Pharmacol.* 110, 1515.
- Williams, T.J., 1979, Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 65, 517.
- Williams, T.J., 1982, Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E₂ as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin, *Br. J. Pharmacol.* 77, 505.
- Williams, T.J. and M.J. Peck, 1977, Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation, *Nature* 270, 530.
- Yong, T. and W.G. Mayhan, 1992, Effect of prostaglandin E₁ on leukotriene C₄-induced increases in vascular permeability of hamster cheek pouch, *Inflammation* 16, 159.
- Zatz, R., 1990, A low-cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats, *Lab. Anim. Sci.* 42, 198.

Influence of gastric acid secretion blockade and food intake on the bioavailability of a potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers.

Poli, A*, Moreno, RA, Ribeiro, W, Dias HB, Moreno Jr H, Muscará, MN and de Nucci, G.

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP, and (*) Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Author for correspondence:

Gilberto de Nucci, MD, PhD,

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit,

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences,

UNICAMP, PO Box 6111, 13084-100 Campinas, SP, Brazil.

Prof. Dr. G. Hitzemberger, Kinderspitalgasse 10/16, A-1090 Vienna

Gilberto de Nucci, MD, PhD,
Miquel Servet Clinical Pharmacology Unit
Department of Pharmacology,
Faculty of Medical Sciences
UNICAMP, PO Box 6111
13084-100 CAMPINAS, SP
B R A Z I L

Intern. Journal of *Clinical*
pharmacology and
therapeutics

Dustri-Verlag Dr. Karl Felsch
D-82032 Deisenhofen - Postfach 49

Editor-in-Chief:
Prof. Dr. G. Hitzemberger
Gesellschaft für
Klinische Pharmakologie
Kinderspitalgasse 10/16
A-1090 Vienna / Austria

Tel. (+43) 1-4084511
Fax (+43) 1-4084511-17

Vienna, May 24th, 1995

**Man.: „Influence of gastric acid secretion blockade and food
intake on the bioavailability of a potassium diclofenac
suspension in healthy male volunteers.“ by A. Poli et al.**

Dear Dr. de Nucci,

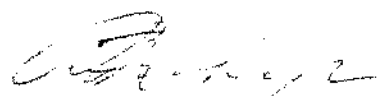
your above mentioned manuscript has been reviewed by two members of the editorial board. Whereas one of the reviewers has no objections the other one has some remarks (see encl.).

I will be glad to publish your article in our journal provided you could rewrite it according to the enclosed comments.

If you resubmit your paper please change „Methods“ into „Subjects, Materials and Methods“ and please enclose the tables and figures in original and a disk compatible with MS-DOS.

I remain,

Sincerely yours



Prof. Dr. G. Hitzemberger
Editor-in-Chief

Enclosure

Abstract.

The bioavailability of a single dose of a potassium diclofenac suspension (Flogan[®], Merck, 7ml, 105 mg) was studied in thirteen healthy male volunteers in the fasting state (placebo phase), after gastric acid secretion blockade (sub-acute pre-treatment with omeprazole, OME phase) and after food intake (FOOD phase). A 14-day washout period between phases was adopted. Serum samples were obtained over a 24 hour interval and diclofenac concentrations were determined by high pressure liquid chromatography with ultraviolet detection. From the serum diclofenac concentrations versus time curves, $AUC_{[0-24]}$ (area under the concentration vs time curves from 0-24 h), C_{max} (maximum achieved concentration), T_{max} (time to achieve C_{max}), K_e (terminal first order elimination constant) and the half-life values ($T_{1/2}$) were obtained. No significant differences in extent of absorption were observed. However, the T_{max} of the food phase was significantly greater when compared to both placebo and omeprazole phase. The delay in the rate of diclofenac absorption produced by food intake is not due to increase in the gastric pH, and could be of particular importance when therapeutic levels must be rapidly achieved in the treatment of inflammatory disease.

Key words: potassium diclofenac suspension - human volunteer pharmacokinetics - bioavailability - gastric acid blockade - omeprazole - food intake.

INTRODUCTION

Diclofenac ([2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetic acid) is a potent non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), belonging to the phenyl acetic group, and is widely used in its sodium salt form in cases of chronic and acute inflammation [Altman 1986, Calabro 1986, Kantor 1986, Zuckner 1986]. The potassium salt of diclofenac (KDIC) has been marketed mainly in Latin America and has been prescribed for acute conditions to provide fast analgesic and anti-inflammatory effects [Bahamonde and Saavedra 1990, Verstraeten and Bakshi 1991].

The main problem associated with NSAID therapy is the ability of these drugs to induce gastrointestinal injury, most notably gastric ulceration, bleeding and perforation, as well as an increased risk of bleeding from pre-existing peptic ulcers [Soll et al. 1991]. In an attempt to reduce NSAID-induced mucosal lesions and ulcer formation or exacerbation, several clinical practices have been adopted including the oral administration of the drug at mealtimes, the use of special preparations such as enteric-coated tablets or the concomitant administration of antacids [Brzozowski et al. 1993], histamine H₂ receptor antagonists [Van Berge Henegouwen and Smout 1991], prostanoids [Miller 1992] or proton-pump inhibitors [Sheiman et al. 1994].

Drugs dissolved in biological fluids exist as predominantly weakly ionisable species and are absorbed across the plasma membrane in their non-polar or unionised forms. The ionised forms cannot cross the membrane due to the hydrophobic nature of the latter. Consequently, the pH of the microenvironment is critical in determining movement across the membrane [Wilson et al. 1989].

The major physiological stimulus for acid secretion in the stomach is the ingestion of food, especially if the meal has a high protein content which possesses the greatest buffering capacity. The buffering action of food usually produces a temporary increase in gastric pH [Wilson et al. 1989]. Furthermore, the presence of food may influence the absorption of several drugs and can

either enhance, delay or reduce their uptake thereby changing their bioavailabilities [Toothaker and Welling 1980].

Omeprazole is a proton-pump inhibitor and a potent blocker of basal gastric acid secretion, thus increasing the gastric pH. This drug therefore represents a therapeutic option for the treatment of certain peptic acid disorders [Lampkin et al. 1990].

Since KDIC can be clinically co-administered with the proton-pump inhibitor omeprazole and/or with food intake, pharmacokinetic interactions which could affect the bioavailability of diclofenac may occur.

In this study, we have compared the pharmacokinetic of KDIC suspension in healthy male volunteers in the fasting state (placebo phase, PLA), after gastric acid secretion blockade (attained by sub-acute pre-treatment of the volunteers with omeprazole, OME phase) and after food intake (FOOD phase).

METHODS

Clinical protocol

Thirteen healthy male volunteers aged between 21 and 47 years (mean $\pm$ S.E.M.: 29.4 ± 6.3 yr) and weighing 55 to 95 kg (mean $\pm$ S.E.M.: 77.5 ± 10.1 kg) were selected for the study. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, gastrointestinal, neurological and haematological diseases as determined within four weeks before the start of the study, by medical history, physical examination and laboratory screenings: fasting blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, total bilirubin, total protein, serum albumin, alkaline phosphatase, sodium, potassium, chloride, uric acid, urinalysis, hemoglobin, hematocrit, total and differential white blood cell counts. All volunteers gave written informed consent, and the clinical protocol was approved by Ethics Committee of the University Hospital.

The study had a three-stage design with a 14-day washout period between treatments. During each stage, the volunteers were hospitalised at 09:00 p.m.

having already had a regular evening meal. After an overnight fast they received 105 mg of KDIC as a suspension (Flogon®).

Gastric acid secretion blockade was achieved by administering omeprazole (Losec®, 20 mg/day, p.o, as a single dose, for five days prior to hospitalisation). Placebo was administered in the same manner as described for omeprazole. The efficacy of the treatment was assessed by measuring the pH of the gastric juice (collected via an intragastric cannula) before the first administration of either placebo or Losec® and then before KDIC administration. This part of the study (administration of placebo and Losec®) was carried out in a double-blind manner.

The influence of food intake on the pharmacokinetics of KDIC was assessed by comparing the pharmacokinetic profile after a standard breakfast with the placebo profile. The standard breakfast was composed of one sandwich consisting of two slices of bread (~40 g) and two slices of cheese (~30g), one cup of whole milk (~250ml), and two pieces of papaya (~250g).

Blood samples were collected at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 hours after KDIC administration.

Serum diclofenac concentrations were determined by reversed-phase HPLC with ultraviolet detection as previously described [Mendes et al. 1994].

Pharmacokinetic and statistical analysis

The maximum observed serum concentration (C_{max}) and the time taken to be attained (T_{max}) were obtained from the drug concentration versus time curves. The areas under the diclofenac concentration versus time curves from 0 to 24 hours ($AUC[0-24]$) were calculated using the trapezoidal method and the terminal elimination rate constant (K_e) was estimated by the least square regression of the points describing a terminal log-linear decay phase. The half-life values ($T_{1/2}$) were derived from K_e where $T_{1/2} = \ln 2 / K_e$. The results are expressed as geometric means with their respective 90% confidence intervals.

Individual ratios were statistically analysed using both parametric (one-way ANOVA for ln-transformed data) and non-parametric methods [Hauschke et al. 1990].

MATERIAL

Commercial KDIC suspension Flogan® (7 ml equivalent to 105 mg KDIC) is marketed by Merck S.A. Ind. Quím., RJ, Brazil, and omeprazole (Losec®, 20 mg tablet) by Merrel Lepetit Farm. Ind. Ltda., SP, Brazil.

RESULTS

Diclofenac and omeprazole were well tolerated at the administered doses and no adverse effects were reported. After omeprazole treatment, gastric juice pH was significantly increased from 1.67 ± 0.11 (PLA phase) to 6.90 ± 0.13 ($p < 0.01$, $n = 13$; paired Student's *t*-test,).

Figure 1 shows mean serum diclofenac concentration vs. time curves for the PLA, OME and FOOD phases. The major mean pharmacokinetic parameters derived from the serum diclofenac concentration vs. time curves are presented in Table 1.

Parametric and non-parametric analysis of individual AUC[0-24] and C_{max} percentual ratios and T_{max} differences did not show any significant difference between the OME phase and the PLA one (Table 2).

FOOD phase was not significantly different from PLA phase as shown by the analysis of individual percentual ratios of either AUC[0-24] or C_{max} . However, T_{max} was significantly greater for the FOOD phase when individual T_{max} differences between FOOD and PLA phase were analysed by either parametric or non-parametric tests (Table 2).

Diclofenac K_e and $T_{1/2}$ values were not affected by OME and FOOD treatment when compared with the PLA phase (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

Omeprazole, like diclofenac, is biotransformed in the organism [Stierlin et al. 1979; Gugler and Jensen 1985]. Apart from its activity as proton-pump inhibitor and gastric acid secretion [Lampkin et al., 1990; Sheiman et al., 1994], omeprazole is a potent inhibitor of hepatic microsomal enzyme activity and has the potential to interact with drugs by this mechanism [Rogerson et al. 1977]. In this way, omeprazole prevents metabolism of diazepam and phenytoin by inhibiting this enzyme system [Gugler and Jensen 1985]. However, no alterations were observed in the pharmacokinetic parameters of KDIC after OME suggesting that, at the dose used, omeprazole did not influence the metabolism of diclofenac.

Another mechanism by which omeprazole can affect drug pharmacokinetics is by altering its absorption. Such is the case with the increase in the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate, which prevents ulcer relapse by eradication of *Helicobacter pylori*. [Treiber et al., 1994].

Diclofenac is a weak acid ($pK_a = 4.0$) and very liposoluble (partition coefficient n-octanol/buffer, pH 7.4= 13.4). In this way, it could be well absorbed in the stomach under its unionised form at low pH. Due to its high liposolubility, diclofenac is absorbed by the transdermal route. The maximum concentration of the drug, reaching the blood after cutaneous absorption is less than 10% of that obtained after parenteral administration [Seth 1992]. This fact "per se" could be explained by the absorption of diclofenac at the gastric mucosa. However, the presence of a layer of mucus covering the stomach wall can complicate transport across the membrane, disqualifying, in this way, a significant absorption of diclofenac in the stomach. On the other hand, the small intestine is the most extensive and specialised surface for the absorption of drugs and nutrients.

Taken as a whole, these considerations could provide an explanation for the fact that the increase in gastric pH induced by omeprazole (from 1.67 to 6.90) did not modify KDIC bioavailability.

The presence of food in the stomach affects the pH, the viscosity of stomach contents, the volume of gastric secretion and hence the rate of dissolution and degree of dispersion of the formulation. In addition, food affects the motility patterns, which in the fed state can discriminate between large and small units. In the fasted state, emptying can be extremely unpredictable, ranging from a few minutes to 3 hours [Wilson et al. 1989].

The administration of the KDIC suspension in the presence of food led to a delay in the rate of diclofenac absorption (as shown by lower C_{max} and greater T_{max} values). However, the extent of absorption (given by the $AUC_{[0-24]}$ values) was not affected despite the observed biphasic profile in the serum concentration vs. time curves (Fig. 1). As shown above, with the exception of gastric pH increase, other effects of food should be responsible for the observed delay in KDIC absorption.

Diclofenac T_{max} values are of particular importance when therapeutic levels must be rapidly achieved in the treatment of inflammatory disease. Todd and Sorkin [1988] reported T_{max} values of 1.5 to 2.5 hours for enteric coated sodium diclofenac tablets, suggesting that the KDIC suspension formulation here tested exposes the active therapeutic moiety to the absorption sites at a faster rate.

In conclusion, the results presented in this study are of immediate application to the clinical use of KDIC for treatment of inflammatory diseases.

REFERENCES

- Altman R 1986 International experience with diclofenac in osteoarthritis. *Am J Med* 80 (Suppl 4B):48-52.

- Bahamonde BLA, Saavedra CH 1990 Comparison of the analgesic and antiinflammatory effects of diclofenac potassium versus piroxicam versus placebo in ankle sprain patients. *J Int Med Res* 18: 104-111.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Majka J, Drozdowicz D, Pytko-Polonczyk J, Nauert C 1993 Supralox: a novel aluminium containing antacid with gastroprotective and ulcer healing activity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5: 165-171.
- Calabro JJ 1986 Efficacy of diclofenac in ankylosing spondylitis. *Am J Med* 80 (Suppl 4B):58-63.
- Gugler R, Jensen JC 1985 Omeprazole inhibits oxidative drug metabolism. Studies with diazepam and phenytoin in vivo and 7-ethoxycoumarin in vitro. *Gastroenterology* 89: 1235-41.
- Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E 1990 A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 28:72-78.
- Kantor TG 1986 Use of diclofenac in analgesia. *Am J Med* 80 (Suppl 4B):64-69.
- Lampkin TA, Ouellet D, Hak LJ, Dukes GE 1990 Omeprazole: a novel antisecretory agent for the treatment of acid-peptic disorders. *DICP, Ann Pharmacother* 24:393-402.
- Mendes GBB, Franco LM, Moreno RA, Fernandes AG, Muscará MN, de Nucci G.1994 Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 26: 399-405.
- Miller DR 1992 Treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *Clin Pharm* 11:690-704.
- Rogerson TD, Wilkinson CF, Hetarski K 1977 Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol* 26: 1039 - 1042.
- Scheiman JM, Behler EM, Loeffler KM, Elta GH 1994 Omeprazole ameliorates aspirin-induced gastroduodenal injury. *Dig Dis Sci* 39: 97-103.

- Seth BL 1992 Comparative pharmacokinetics and bioavailability study of percutaneous absorption of diclofenac from two topical formulations containing drug as a solution gel or as an emulsion gel. *Arzneim Forsch Drug Res* 42: 120-122.
- Soll AH, Weistein WM, Kurata J, McCarthy D 1991 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. *Ann Intern Med* 114: 307-319.
- Stierlin H, Faigle JW, Sallman A, K ng W, Richter WJ, Kriemler H-P, Alt KO, Winkler T 1979 Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica* 9: 601 - 610,
- Todd PA, Sorkin EM 1988 Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 35: 244-285.
- Toothaker RD, Welling PG 1980 The effect of food on drug bioavailability. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20: 173-199.
- Treiber G, Walker S, Klotz U 1994 Omeprazole-induced increase in the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate. *Clin Pharmacol Ther* 55: 486-491.
- Van Berge Henegouwen GP, Smout AJPM 1991 The management of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal ulcers. *Scand J Gastroenterol* 26 (*Suppl 188*):87-91.
- Verstraeten A, Bakshi R 1991 Diclofenac potassium for the treatment of traumatic joint distortion: an open multicentre study. *J Int Med Res* 19:165-170,
- Wilson CG, Washington C, Washington N 1989 Overview of epithelial barriers and drug transport. In: Wilson CG, Washington N. *Physiological Pharmaceutics. Biological barriers to drug absorption*. Chichester, Ellis Horwood Limited. p.17-68.

Zuckner J 1986 International experience of diclofenac in rheumatoid arthritis.
Am J Med 80 (*Suppl 4B*):39-42.

TABLE 1

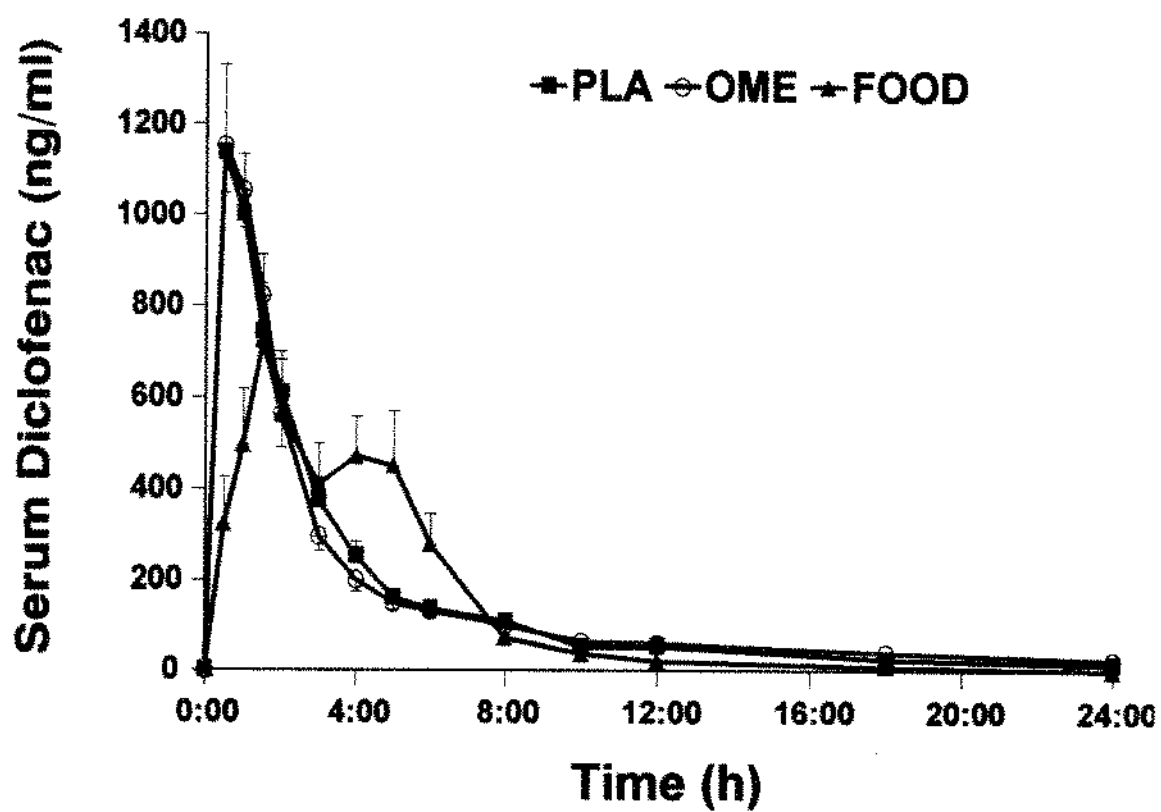
	PLA	OME	FOOD
$AUC_{[0-24]}$ ($ng\ h\ ml^{-1}$)			
Geom. mean	3459	3564	3114
90% CI	2987 - 4005	3186 - 3986	2617-3706
C_{max} (ng/ml)			
Geom. mean	1330	1276	1052
90% CI	1084 - 1631	1136 - 1435	827-1338
K_e (h^{-1})			
Geom. mean	0,37	0,32	0,45
90% CI	0,29 - 0,47	0,26 - 0,39	0,37-0,55
$T_{1/2}$ (h)			
Geom. mean	1.95	2.21	1.54
90% CI	1.55 - 2.47	1.80 - 2.71	1.26-1.88
T_{max} (h)			
Median	0,5	0,5	3.0
Range	0,5 - 4.0	0,5 - 1.0	0,5-5.0

TABLE 2

OME / PLA	PARAMETRIC		NON - PARAMETRIC *	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
AUC[0-24]				
% Ratio	103.0	89.9 - 118.1	103.0	89.2 - 119.9
C _{max}				
% Ratio	96.0	80.2 - 115.0	96.8	78.1 - 115.8
K _e				
% Ratio	85.4	67.9 - 107.4	86.6	67.2 - 112.1
T _{1/2}				
%Ratio	113.5	79.8 - 161.3	99.5	76.3 - 164.6
T _{max}				
Difference (h)	-0,42**	-0,93 - 0,08	-0,25	-0,5 - 0,0

FOOD / PLA	PARAMETRIC		NON - PARAMETRIC *	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
AUC[0-24]				
% Ratio	90,0	76.6 - 105.8	89.6	76.5 - 107.6
C _{max}				
% Ratio	79.1	56.7 - 110,4	80,4	54.3 - 111.0
K _e				
% Ratio	120,1	88.2 - 163.6	120,1	87.2 - 165.1
T _{1/2}				
%Ratio	78.8	57.2 - 108.6	75.1	56.1 - 100,5
T _{max}				
Difference (h)	1.8**	0,8 - 2.8	1.8	0,8 - 2.5

Figure 1.



LEGENDS TO TABLES:

TABLE 1. Mean KDIC pharmacokinetic parameters obtained from 13 healthy male volunteers after the ingestion of a Flogon[®] suspension (7ml, 105 mg KDIC) under different conditions.

PLA, placebo; OME, omeprazole; FOOD, food intake; CI, confidence interval.

TABLE 2. Statistical analysis of the intergroup AUC_[0-24], C_{max}, K_e and T_{1/2} individual ratios and T_{max} individual differences for KDIC.

PLA, placebo; OME, omeprazole; FOOD, food intake. CI, confidence interval.

(*) According to Hauschke et al. [1990]. (**) Arithmetic mean.

LEGEND TO FIGURE:

Figure 1. Serum diclofenac concentrations (mean $\pm$ SEM) versus time curves obtained in 13 healthy male volunteers following a single administration of 7 ml of Flogon[®] suspension 105 mg KDIC after placebo (PLA), gastric acid secretion blockade (OME) and food intake (FOOD).