

**RAQUEL PARDO ZANDAVALLI MARTINEZ**

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES CAUSADAS PELO  
TRATAMENTO PROLONGADO COM DOSE  
BAIXA DE NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-  
NAME) EM RATOS: EFEITO DO ENALAPRIL E  
LOSARTAN**

**CAMPINAS**

**2005**

**RAQUEL PARDO ZANDAVALLI MARTINEZ**

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES CAUSADAS PELO  
TRATAMENTO PROLONGADO COM DOSE BAIXA DE NITRO-L-  
ARGINA METIL ÉSTER (L-NAME) EM RATOS: EFEITO DO  
ENALAPRIL E LOSARTAN**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia, Área de Concentração Farmacologia.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES**

**CAMPINAS**

**2005**

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

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

M363a                      Martinez, Raquel Pardo Zandavalli  
                                 Alterações cardiovasculares causadas pelo tratamento prolongado  
                                 com dose baixa de nitro-L-argina metil éster (L-NAME) em ratos :  
                                 efeito do enalapril e losartan. / Raquel Pardo Zandavalli Martinez.  
                                 Campinas, SP : [s.n.], 2005.

                                 Orientador: Edson Antunes  
                                 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
                                 Faculdade de Ciências Médicas.

                                 1. Hipertensão. 2. Óxido nítrico. 3. Estereologia. I. Antunes,  
                                 Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
                                 Médicas. III Título.

(Slp/fcm)



**UNICAMP**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

**Orientador:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

---

**Membros:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Angelina ZanESCO**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga**

---

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

**Data: 19/08/2005**

---

ao Luiz Carlos, meu marido,  
pelo amor, incentivo e paciência dedicados diariamente.

aos meus pais, Gelso e Maria Teresa,  
pela formação, estímulo, devoção e amor sempre !

aos meus irmãos, Elisabete e Gelso,  
pelo apoio e felicidade de ter amigos incondicionais,

às minhas sobrinhas Thais e Carolina,  
pela alegria do presente.

## **Agradeço...**

em especial ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela oportunidade da excelente orientação e, mais que isso, o apoio, a compreensão nos momentos difíceis e a amizade;

à Prof.ª Dra. Lara de Luca do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela importante assessoria na realização das avaliações histológicas desta tese;

aos amigos que muito colaboraram na realização dos experimentos: Luciana Nathan, Simone, Enilton e Lúcia;

aos demais amigos do laboratório, pelo agradável convívio durante este período;

aos professores dos Departamentos de Farmacologia - ICB - USP e da FCM - UNICAMP, pelos importantes ensinamentos, que muito me auxiliaram no desenvolvimento dos meus trabalhos;

a todos os técnicos e funcionários do Departamento de Farmacologia - FCM - UNICAMP, e em especial ao Miguel Borges, pela dedicação e cuidado com os animais de minha pesquisa no Biotério;

à Dra. Lilian Abastogliesias, pelo apoio e incentivo, me auxiliando nas dificuldades desta caminhada;

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado.

"Afastar o olhar do mundo não auxilia a ida para Deus; olhar fixamente nele também não faz aproximar de Deus, porém, aquele que contempla o mundo em Deus está na presença d' Ele."

Martin Buber

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE MATERIAIS</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1. Endotélio	21
1.2. Óxido nítrico	22
1.2.1. Síntese de NO	23
1.2.2. Mecanismo de ação do NO	25
1.2.3. Inibidores da síntese de NO	26
1.2.4. Modulação do sistema cardiovascular pelos EDRFs	27
1.3. Modulação do tônus vascular pelo sistema renina-angiotensina	30
1.4. Bloqueio crônico de NO como modelo de hipertensão arterial	32
1.5. Doses de L-NAME e alterações cardiovasculares em ratos	33
1.6. Objetivos	34
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
2.1. Animais	36

2.1.1. Grupos Experimentais	37
2.2. Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda	38
2.3. Estereologia cardíaca	38
2.3.1. Índice de fibrose	39
2.3.2. Avaliação estereológica dos vasos da microcirculação	39
2.4. Determinação da atividade da NOS neuronal	42
2.5. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina	43
2.6. Análise estatística	44
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
3.1. Peso corpóreo	47
3.2. Pressão arterial	48
3.3. Atividade da NOS neuronal	50
3.4. Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)	52
3.5. Avaliação histológica dos capilares sangüíneos	53
3.6. Índice de fibrose	59
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Atividade da NO sintase cerebral em ratos após 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>51</b>
<b>FIGURA 2</b>	Atividade da ECA ao final de 6 meses de estudo	<b>52</b>
<b>FIGURA 3</b>	Fração de volume (Vv) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>54</b>
<b>FIGURA 4</b>	Densidade de comprimento (Lv) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>56</b>
<b>FIGURA 5</b>	Densidade de área (Sv) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>58</b>
<b>FIGURA 6</b>	Índice de fibrose ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>59</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Peso corpóreo dos ratos aos 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>47</b>
<b>TABELA 2</b>	Pressão arterial caudal dos ratos aos 2, 4 e 6 meses de estudo	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{M}$	Micromolar
Ang II	Angiotensina II
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMT	2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina
A <sub>T</sub>	Área-teste
ATP	Adenosina trifosfato
bNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
Ca <sup>+2</sup>	Íon cálcio
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDCFs	Fatores constritores derivados do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRFs	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EIT	S-etilisotiouréia
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
Fe <sup>+2</sup>	Íon ferro
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
I	Nº de intersecções dos vasos com as linhas do sistema-teste

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K <sup>+</sup>	Íon potássio
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil L-arginina
L-NNA	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
L <sub>T</sub>	Comprimento total da linha-teste
L <sub>V</sub>	Densidade de comprimento dos vasos da microcirculação
mmHg	Milímetro de mercúrio
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
p	Nº de pontos que caem sobre o elemento a se analisar
PAC	Pressão arterial caudal
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G2
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H2
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina

$P_T$	Nº total de pontos do sistema-teste
$Q_A$	Nº de perfis ou imagens dos capilares na área-teste
$S_V$	Densidade de área
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil) imidazol
$TXA_2$	Tromboxano
$V_V$	Densidade de volume
6-oxo-PGF <sub>1α</sub>	6-oxo-prostaglandina F1α

## LISTA DE MATERIAIS

Ácido hipúrico	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Ácido bórico	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Azida sódica	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Cloreto de cálcio	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Cloreto de sódio	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Corante Hematoxilina-eosina	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Corante Picrossirius	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Corante tricrômico de Masson	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Dioxano	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
EDTA dissódico	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
EGTA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Halothano	Cristália Prods. Farmac. (São Paulo, Brasil)
HEPES	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Hipuril-Histidil-Leucina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Hidróxido de sódio	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
L-arginina	Amersham Bioscience (UK)
L-citrulina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
L-NAME	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Losartan potássico	Merck & Co. (NJ, EUA)
Maleato de enalapril	Biosintética (São Paulo, Brasil)
NADPH	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

PMSF	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Tetraborato de sódio	Merck S. A. Inds. Qcas (Rio de Janeiro, Brasil)
Tris-HCl	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
2,4,6 tricloro - 1,3,5 triazina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

## RESUMO

A administração de doses altas ou moderadas do inibidor da síntese de NO, L-NAME, a ratos, causa hipertensão arterial, hipertrofia ventricular e fibrose miocárdica. O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos do enalapril e losartan nas mudanças estereológicas do ventrículo esquerdo causadas pela ingestão diária de baixa dose de L-NAME em ratos (7.5 mg/kg/dia). O enalapril (25 mg/kg/dia) e o losartan (30 mg/kg/dia) foram administrados a ratos machos Wistar ( $200 \pm 18$  g), adicionados à ingestão hídrica concomitantemente ao L-NAME. Os animais foram sacrificados aos 2 (N=44), 4 (N=45) e 6 (N=44) meses depois do tratamento. A atividade da cNOS foi inibida em 50% no grupo L-NAME, independentemente do tempo estudado. O tratamento com enalapril ou losartan, administrados individualmente, não mudaram a atividade da cNOS. A pressão sangüínea elevou em  $13 \pm 1.2$ ,  $15 \pm 1.1$  e  $15 \pm 2$  mmHg ( $P < 0.05$ ) nos ratos tratados com L-NAME aos 2, 4 e 6 meses, respectivamente, sendo tais alterações prevenidas pelo tratamento com enalapril ou losartan. A fração de volume (Vv), e a densidade de área (Sv) e de comprimento (Lv) da microcirculação nos ventrículos esquerdos foram significativamente reduzidas pelo L-NAME, sendo tais alterações prevenidas tanto pelo enalapril, quanto pelo losartan. A quantidade de tecido fibroso não foi alterada de modo significativo pelo tratamento com L-NAME. Em resumo, a redução marcante dos parâmetros vasculares cardíacos indicam a existência de intensa vasoconstrição

coronariana nos ratos tratados com L-NAME, mesmo na vigência de modesta elevação da pressão arterial; indicando uma elevada sensibilidade da microcirculação coronariana ao NO.

## ABSTRACT

Administration of high-to-moderate doses of the NO synthesis inhibitor L-NAME to rats causes arterial hypertension, ventricular hypertrophy and myocardial ischaemia. This study was designed to evaluate the effects of enalapril and losartan on the stereological changes in left ventricle caused by daily intake of a low dose of L-NAME in rats (7.5 mg/kg/day). Enalapril (25 mg/kg per day) and losartan (30 mg/kg per day) were given to male Wistar rats ( $200 \pm 18$  g) in the drinking water concomitantly to L-NAME. The animals were killed at 2 (N=44), 4 (N=45) and 6 (N=44) months after treatment. The bNOS activity was inhibited by 50% in the L-NAME group, irrespective of the studied time. Enalapril and losartan given alone had no effect on the bNOS activity. Blood pressure was elevated by  $13 \pm 1.2$ ,  $15 \pm 1.1$  and  $15 \pm 2$  mmHg ( $P < 0.05$ ) in L-NAME-treated rats at 2, 4 and 6 months, and this was prevented by enalapril or losartan. The volume density ( $V_v$ ), surface density ( $S_v$ ) and length density ( $L_v$ ) of microcirculation in left ventricles were all significantly reduced by L-NAME, and all of these alterations were prevented by either enalapril or losartan. The amount of fibrous tissue in left ventricles was not significantly modified by the L-NAME treatment. In conclusion, a modest increase in mean arterial blood pressure caused by a partial reduction of cNOS activity may lead to a marked and prolonged coronary vasoconstriction, attesting the high sensitivity of the rat coronary microcirculation to NO.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Endotélio

Os vasos sangüíneos são revestidos internamente por uma camada única de células denominada endotélio que, por muito tempo, foi considerada uma simples camada de revestimento, representando uma barreira passiva de difusão de elementos do sangue para os tecidos e vice-versa. Sabe-se hoje que o endotélio exerce uma variedade de funções biológicas, regulando o crescimento do músculo liso vascular e a agregação e adesão plaquetária, além de modular o tônus do músculo liso vascular, liberando simultaneamente fatores constritores derivados do endotélio (EDCF<sub>s</sub>) e fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs). Entre os primeiros, destacam-se a endotelina-1 (ET-1), o tromboxano (TXA<sub>2</sub>), a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e a angiotensina II (All). Os EDRFs compreendem basicamente o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF). O equilíbrio entre esses fatores constritores e relaxantes caracteriza a resposta vascular normal; dessa forma, o desequilíbrio na sua produção e/ou liberação pode contribuir para a gênese de doenças cardiovasculares como, por exemplo, a hipertensão arterial (CARVALHO et al., 1996). Daremos ênfase à fisiopatologia do NO uma vez que em nosso trabalho investigamos as alterações cardiovasculares morfofuncionais em ratos tratados cronicamente com inibidor da síntese de NO.

## 1.2. Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki, trabalhando com anéis e tiras de aorta isoladas, demonstraram que a acetilcolina produzia relaxamento apenas em preparações nas quais se mantinha o endotélio íntegro. A remoção mecânica do endotélio prevenia a resposta relaxante, podendo levar à constrição dos vasos, mesmo com concentrações crescentes de acetilcolina. Assim, demonstrou-se que a interação da acetilcolina com receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais estimulava a liberação de uma substância lábil, que induzia o relaxamento do músculo liso vascular. Trabalhos posteriores mostraram que a integridade da célula endotelial era fundamental para produzir o relaxamento mediado pela acetilcolina em vasos de várias espécies animais, inclusive a humana (FURCHGOTT, 1984).

O fator lábil liberado que provocava vasodilatação dependente do endotélio ficou conhecido como *fator relaxante derivado do endotélio* (ou EDRF). Verificou-se também que outras substâncias eram capazes de liberar o EDRF, como a noradrenalina, bradicinina, histamina e substâncias envolvidas no fenômeno de agregação plaquetária e coagulação sangüínea, incluindo o ADP, ATP e serotonina. A liberação do EDRF era ainda observada em resposta a fatores físicos, como o atrito exercido pelo fluxo sangüíneo sobre o endotélio (“shear stress”; RUBANYI et al., 1986).

Em 1987, Palmer e colaboradores demonstraram que a bradicinina liberava NO da célula endotelial, e que este mediador apresentava atividade biológica, labilidade e susceptibilidade a inibidores e potenciadores

indistinguíveis das do EDRF. Esses dados levaram à sugestão de que o EDRF era o próprio NO, descoberta essa simultaneamente feita por outro grupo de pesquisadores (IGNARRO et al., 1987). Inibidores da ciclooxigenase não impedem o relaxamento vascular dependente do endotélio, excluindo, assim, a prostaciclina como mediador dos relaxamentos vasculares dependentes do endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980a; FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980b). A meia-vida do NO é extremamente curta, estimada em aproximadamente 3 a 5 segundos (GRYGLEWSKI et al., 1986; WARNER et al., 1989), fato este que dificultou sua identificação química. Em 1998, os pesquisadores Robert F. Furchgott, Ferid Murad e Louis J. Ignarro receberam o prêmio Nobel de Medicina como reconhecimento pela descoberta, identificação e demonstração do mecanismo de ação do EDRF/NO no organismo.

### **1.2.1. Síntese de NO**

O óxido nítrico (NO) é um mediador produzido endogenamente pela oxidação de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal da L-arginina. Esta reação é mediada pela NO sintase (NOS), com formação equimolar de NO e L-citrulina (PALMER et al., 1988a). A NOS produz o NO em duas etapas de oxidação, utilizando o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Na primeira etapa, ocorre a formação de  $N^{\circ}$ -Hidroxi-L-arginina (reação esta que se assemelha às enzimas do citocromo P-450), e na etapa posterior, a  $N^{\circ}$ -Hidroxi-L-arginina é convertida a NO e citrulina (utilizando NADPH e  $O_2$ ).

Até o presente, foram isoladas três isoformas de NOS, sendo duas constitutivas (NOS endotelial e neuronal) e uma induzível:

i. NOS neuronal (nNOS, bNOS ou NOS do tipo I): Foi originalmente identificada como isoforma constitutiva em tecido neuronal. É encontrada no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, glândulas adrenais e neurônios nitrérgicos.

ii. NOS endotelial (eNOS ou NOS do tipo III). Foi identificada como isoforma constitutiva em células endoteliais vasculares.

iii. NOS induzível (iNOS ou NOS do tipo II). Foi identificada como isoforma induzível encontrada em macrófagos, hepatócitos, músculo liso e outros.

As bNOS e eNOS encontram-se sob a forma inativa, até que o complexo  $Ca^{+2}$ /calmodulina, ao ligar-se à enzima, ativa a mesma, determinando assim a liberação contínua de pequenas quantidades de NO por períodos curtos de tempo.

Ao contrário da NOS constitutiva, a iNOS não é normalmente encontrada no organismo saudável. Porém, sob ação de determinados estímulos como citocinas e endotoxinas bacterianas, a iNOS passa a ser expressa, sintetizando então quantidades elevadas de NO por longos períodos de tempo. A expressão desta isoforma ocorre independentemente do complexo  $Ca^{+2}$ /calmodulina.

Acredita-se que a iNOS seja a responsável pelas manifestações tóxicas do NO como, por exemplo, hipotensão sistêmica durante o choque endotóxico.

### **1.2.2. Mecanismo de ação do NO**

Nas células endoteliais, o NO, uma vez formado, difunde-se rapidamente para as células musculares lisas adjacentes onde interage com a guanilato ciclase solúvel, mais precisamente com o  $\text{Fe}^{+2}$ , na sua forma reduzida, contida nesta proteína. A ativação desta enzima promove estimulação da proteína quinase dependente do GMPc e elevação da concentração intracelular de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) (RAPAPORT et al., 1983; FORSTERMANN et al., 1986). O acúmulo de GMPc causa o relaxamento do músculo liso vascular pois leva à desfosforilação das cadeias leves de miosina, reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através do sarcolema, bem como a liberação de seus depósitos intracelulares. Isto resulta em diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico livre. Além das células musculares lisas, este mecanismo de transdução ocorre em outros elementos como plaquetas, leucócitos e macrófagos (MONCADA et al., 1991). O NO pode também abrir canais de potássio, promovendo hiperpolarização na célula do músculo liso vascular, ajudando assim a restabelecer o potencial de repouso da célula, com conseqüente relaxamento vascular (OHESSEN et al., 1988).

### 1.2.3. Inibidores da síntese de NO

As ações do NO são inibidas pela hemoglobina (através de ligação direta com o grupo heme), por inibidores da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno e ODQ) e geradores de radicais superóxido (GRYGLEWSKI et al., 1986; PALMER et al., 1987; GARTHWAITE et al., 1995). Por outro lado, suas ações são potencializadas pela superóxido dismutase, um removedor de radicais superóxido (GRYGLEWSKI et al., 1986).

No momento em que o NO se difunde da célula endotelial para a luz do vaso, esta molécula é rapidamente captada pela hemoglobina através do ferro, na sua forma reduzida, que existe nesta molécula. A reação com a hemoglobina origina os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) os quais serão eliminados por filtração glomerular. Os nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) são também produtos de degradação do NO; porém, através de reação oxidativa, são rapidamente convertidos a nitratos.

Compostos estruturalmente análogos à L-arginina inibem competitivamente a NOS. Inicialmente, observou-se que a  $\text{N}^G$ -monometil L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO, sendo este efeito dependente da dose e específico para a forma levógira desse composto (PALMER et al., 1988b; REES et al., 1988). Posteriormente, outros inibidores de NOS foram sintetizados, destacando-se a  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina (L-NNA),  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (PALMER et al., 1988b; MOORE et al., 1990; MÜLSCH e BUSSE, 1990). Os isômeros L são inibidores efetivos das NOSs enquanto os correspondentes isômeros D são ineficazes na maioria dos fenômenos biológicos estudados.

Uma variedade de compostos não derivados de aminoácidos também inibe a atividade da NOS; estes incluem os imidazóis, 7-nitroindazóis, guanidinas, imunobiotina, ácido  $\alpha$ -guanidinoglutárico, 3-amino-1,2,4-triazol, fenciclidina e azul de metileno. Entretanto, poucos compostos apresentam seletividade quanto a um tipo particular de NOS, como as aminoguanidinas, isotiouréias, certos imidazóis e indazóis (SOUTHAN e SZABÓ, 1996) e a guanidinoetildissulfito (SZABÓ et al., 1996). Dois inibidores seletivos reversíveis da NOS induzível foram também identificados: S-etilisotiouréia (EIT) e 2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina (AMT) os quais mostraram-se mais potentes que o L-NMMA, L-NNA, L-NIO e L-aminoguanidina em inibir a atividade da NOS em macrófagos J774 de camundongos (NAKANE et al., 1995). HANDY et al. (1995) foram os primeiros a caracterizar um inibidor da NOS derivado de imidazol, o 1-(2-trifluorometilfenil) imidazol (TRIM). Este composto é capaz de inibir a NOS neuronal e induzível em homogenados de cerebelo de camundongo e pulmão de ratos, respectivamente. Além destes inibidores, sabe-se que os glicocorticóides inibem a indução (mas não a atividade) da iNOS em diversos tipos celulares (MONCADA et al., 1991).

#### **1.2.4. Modulação do Sistema Cardiovascular pelos EDRFs**

A inibição da síntese de NO promove hipertensão arterial nas diferentes espécies animais, indicando que o NO é imprescindível para o controle da pressão arterial (GARDINER et al., 1990; KLABUNDE et al., 1991; BOWER e

LAW , 1993). A liberação contínua de NO pelo endotélio mantém as células musculares lisas em estado constante de vasodilatação (MONCADA e HIGGS, 1993). Dessa forma, acredita-se que a hipertensão arterial é resultado de diminuição na produção de NO. De fato, o relaxamento induzido pela acetilcolina no leito vascular do antebraço de pacientes hipertensos é menor em relação a voluntários sadios (CALVER et al., 1992; HIROOKA et al., 1992; COCKROFT et al., 1994). É provável que a liberação de NO seja regulada localmente, e, como tal, é possível que isto represente um dos mecanismos adaptativos mais simples e fundamental para o sistema cardiovascular. Camundongos desprovidos do gene que codifica a NOS endotelial (*knockout* para eNOS) tornam-se hipertensos e não apresentam vasodilatação em resposta à acetilcolina (HUANG et al., 1995).

O NO, entretanto, não é o único vasodilatador liberado pelas células endoteliais. A vasodilatação pode ser alcançada às custas da liberação do EDHF, cuja identidade química e mecanismo de ação ainda não estão inteiramente esclarecidos. A liberação do EDHF ocorre por ativação de receptores específicos presentes nas células endoteliais, e promove influxo de íons  $Ca^{2+}$  do meio extracelular e liberação deste íon dos estoques intracelulares. Uma vez formado, o EDHF atravessa a membrana da célula endotelial e hiperpolariza a célula muscular lisa adjacente onde produz sua ação relaxante. Acredita-se que o EDHF hiperpolarize as células do músculo liso e, conseqüentemente, induza relaxamento através da abertura de canais de  $K^+$  permitindo o efluxo de  $K^+$  que, por sua vez, reduz o potencial de membrana

(hiperpolarização) levando ao fechamento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. A modulação do tônus vascular pelo EDHF é mais pronunciada em vasos de pequeno calibre enquanto que a participação do NO é maior em vasos de grande calibre (CAMPBELL et al., 1996). Diversos candidatos têm sido apontados como sendo o EDHF; estes incluem os canais de  $\text{K}^+$ , os metabólitos derivados do ácido araquidônico ligados à via da citocromo P450-epoxigenas, as junções mioendoteliais e os endocanabinóides.

A prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) é outro vasodilatador de origem endotelial com a capacidade de regular o aparelho cardiovascular. A  $\text{PGI}_2$  foi descoberta a partir de microssomas de aorta de coelhos e porcos, tendo sido inicialmente descrita como uma substância instável, com propriedades vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária (MONCADA et al., 1976). Posteriormente, foi caracterizada bioquimicamente como um eicosanóide dienóico bicíclico, sendo o principal produto do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase na célula endotelial. Na célula endotelial, a ciclooxigenase, enzima ligada à membrana celular, atua sobre o ácido araquidônico formando os endoperóxidos cíclicos instáveis,  $\text{PGG}_2$  e  $\text{PGH}_2$ . Este último pode ser convertido para prostaciclina sob ação de uma enzima conhecida como prostaciclina sintetase. A prostaciclina possui meia-vida curta devido à sua rápida hidrólise para 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , um produto quimicamente estável, e desprovido de atividade biológica. Após sua formação nas células endoteliais, a  $\text{PGI}_2$  age em receptores específicos ligados à adenil ciclase, aumentando os níveis do segundo

mensageiro, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Este, por sua vez, reduz a disponibilidade intracelular de íons  $Ca^{2+}$ , produzindo potente ação vasodilatadora e inibidora da agregação e adesão plaquetária.

### **1.3. Modulação do tônus vascular pelo sistema renina-angiotensina**

A liberação de angiotensina II é resultado de um mecanismo complexo, envolvendo os rins e a liberação da enzima renina, pelos mesmos, em resposta à baixa pressão arterial. A renina catalisa a conversão do angiotensinogênio (circulante de origem hepática) à angiotensina I (decapeptídeo), que é rapidamente convertida a angiotensina II (octapeptídeo), pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Estas reações ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais (ZHOU et al., 2004).

A angiotensina II é um dos mais potentes agentes vasoconstritores conhecidos, estando presente na circulação, em concentrações elevadas, quando a pressão arterial sofre quedas acentuadas. A angiotensina II provoca vasoconstrição, aumenta a resistência periférica, elevando assim a pressão arterial. As ações vasoconstritoras da angiotensina II são quase exclusivamente mediadas por receptores do tipo  $AT_1$  (TIMMERMANS et al., 1993), embora receptores  $AT_2$  pareçam estar envolvidos nas respostas endotélio-dependentes da AII em artérias cerebrais de ratos (HABERL, 1994). Além destes efeitos, a AII também é um fator mitogênico, tendo a propriedade de ativar fatores oncogênicos e de estimular a produção de fatores de crescimento. Dessa

forma, é possível que a angiotensina II esteja envolvida no desencadeamento da hipertrofia vascular associada à hipertensão e na hiperplasia mio-intimal (POWELL et al., 1989; PRATT e DZAU, 1993).

As contrações induzidas pela angiotensina II, em preparações diversas de músculo liso vascular, podem estar aumentadas (LIN e NASJLETTI, 1991), diminuídas (BOULANGER et al., 1995; CORTES et al., 1996) ou inalteradas (JUUL et al., 1987) na presença do endotélio. Acredita-se que os efeitos vasoconstritores da AII sejam modulados pelo NO. De fato, estudos prévios demonstraram que a angiotensina II libera NO, sendo o receptor envolvido do tipo AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>, dependendo da preparação usada (HABERL, 1994; BOULANGER et al., 1995).

Em cães, primatas e humanos, demonstrou-se que além da ECA, a angiotensina II pode ser formada a partir de enzimas conhecidas como quimases, presentes nos tecidos vasculares e cardíacos (FUKAMI et al., 1998). Nestes tecidos, pode ocorrer a conversão de angiotensina I para angiotensina II, mesmo na presença de completa inibição da ECA. No coração, em particular, os mastócitos e células endoteliais são os sítios de síntese e armazenamento da mesma, mas níveis elevados de quimase são também encontrados no interstício cardíaco, associada à matrix extracelular (LIAO e HUSAIN, 1995).

Os efeitos anti-hipertensivos dos inibidores da enzima de conversão (ECA) dependem, além de inibição da geração de angiotensina II, do acúmulo de cininas vasodilatadoras no organismo pela capacidade destas substâncias de inibir a degradação das cininas (ERDUS, 1990). Admite-se também que a

redução da pressão arterial e o aumento do fluxo sangüíneo resultantes do bloqueio da formação da angiotensina II e do acúmulo de bradicinina sejam devidos ao aumento da produção de NO, o qual contribuiria para o efeito hipotensor.

#### **1.4. Bloqueio crônico de NO como modelo de hipertensão arterial**

Estudos prévios relataram que a administração diária de inibidores da síntese de NO, tal como o L-NAME, causa hipertensão marcante e sustentada em ratos (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992). Um vasto número de estudos subsequentes empregou esta estratégia experimental para avaliar mudanças fisiopatológicas diversas mediadas pelo NO (ZATZ e BAYLIS, 1998). A hipertensão arterial induzida pelo L-NAME é geralmente acompanhada por mudanças morfológicas e funcionais no coração (JOVER et al., 1993; RHALEB et al., 1994; MORENO-JR et al., 1995, 1996) e no rim (RIBEIRO et al., 1992; FUJIHARA et al., 1994), assim como nos vasos arteriais (DELACRETAZ et al., 1995; NUMAGACHI et al., 1995; BABAL et al., 1997; CHILLON et al., 1997; MOREAU et al., 1998). No coração, as anormalidades morfológicas consistem principalmente de hipertrofia ventricular, e focos de necrose e fibrose intersticiais, resultante de fenômeno reparativo e cicatricial, fator este indicativo de isquemia miocárdica (NUMAGACHI et al., 1995; MORENO-JR et al., 1996; BABAL et al., 1997; DEVLIN et al., 1998; AKUZAWA et al., 1998; LUVARA et al., 1998; K-LAFLAME et al., 1998). O fluxo coronariano também é significativamente reduzido pelo tratamento crônico com L-NAME (TAKEMOTO

et al., 1997). No entanto, o mecanismo responsável por tais alterações não está ainda completamente elucidado, mas parece envolver alterações do sistema renina-angiotensina, em nível de receptor AT<sub>1</sub> ou de atividade da ECA (ZHOU et al., 2004).

### **1.5. Doses de L-NAME e alterações cardiovasculares em ratos**

Os estudos cardiovasculares em ratos compreendendo a ingestão diária de L-NAME relatam o uso de doses altas (70-250 mg/kg/dia) ou moderadas (40-50 mg/kg/dia) por períodos variando de 1 a 8 semanas. Usando esta faixa de doses, a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME é geralmente acompanhada por mudanças morfológicas e funcionais no coração e no rim, assim como nos vasos arteriais (RIBEIRO et al., 1992; JOVER et al., 1993; RHALEB et al., 1994; FUJIHARA et al., 1994; DELACRETAZ et al., 1995; NUMAGACHI et al., 1995; MORENO-JR et al., 1995, 1996; BABAL et al., 1997; CHILLON et al., 1997; MOREAU et al., 1998), conforme descrito acima. Embora os estudos tenham mostrado que a ingestão concomitante de agentes anti-hipertensivos previne a hipertensão induzida pelo L-NAME nestas doses moderadas/elevadas, as lesões cardíacas e hipertrofia podem estar inalteradas (MORENO-JR et al., 1995) ou apenas atenuadas por estes agentes (NUMAGACHI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1999), indicando que as lesões isquêmicas cardíacas podem ocorrer independentemente da hipertensão arterial.

## **1.6. OBJETIVOS**

### **a) Geral:**

- Investigar se as alterações cardiovasculares miocárdicas produzidas pelo L-NAME estão presentes na vigência de discreta elevação da pressão arterial;

- Investigar o efeito das drogas anti-hipertensivas sobre as alterações cardiovasculares produzidas pelo L-NAME.

### **b) Específico:**

- Investigar o efeito da administração de dose baixa de L-NAME (7,5 mg/Kg/dia), ao longo de 24 semanas, sobre o índice de fibrose miocárdica e a estereologia da microcirculação coronariana;

- Investigar o efeito do tratamento concomitante com enalapril e losartan sobre as alterações cardiovasculares produzidas pelo L-NAME.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## **2.1. Animais**

Todos os procedimentos usados nesta tese estão de acordo com os *Princípios Éticos na Experimentação Animal* adotado pelo *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo (CEEA - protocolo nº 055/2000).

Foram utilizados ratos Wistar machos (com aproximadamente 200 g no começo do estudo) provenientes do Biotério Central (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram mantidos sob condições (luz e temperatura) controladas, com 12 horas de período diurno e 12 horas de período noturno e à temperatura de 25°C, e foram alimentados com ração padrão (Nuvilab CR-1<sup>®</sup>, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil).

### 2.1.1. Grupos experimentais

O tratamento prolongado com L-NAME e/ou agentes anti-hipertensivos foi realizado adicionando-se os mesmos à ingestão hídrica diária dos animais, os quais foram divididos em seis grupos, a saber:

- a. Controle: animais que receberam apenas água de torneira;
- b. L-NAME: animais que receberam apenas nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 7,5 mg/Kg/dia).
- c. L-NAME + Enalapril: animais que receberam concomitantemente o L-NAME (7,5 mg/Kg/dia) e o enalapril (25 mg/Kg/dia);
- d. L-NAME + Losartan: animais que receberam concomitantemente o L-NAME (7,5 mg/Kg/dia) e o losartan (30 mg/Kg/dia);
- e. Enalapril: animais que receberam apenas o enalapril (25 mg/Kg/dia);
- f. Losartan: animais que receberam apenas o losartan (30 mg/Kg/dia).

O estudo começou simultaneamente com todos os grupos experimentais, envolvendo um total de 133 ratos. Os animais foram sacrificados aos 2 ( $n = 44$ ), 4 ( $n = 45$ ) e 6 ( $n = 44$ ) meses após o início dos tratamentos. A dose diária de L-NAME e de enalapril foi empregada de acordo com a literatura (MORENO-JR et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2000). Para a dose de losartan, fizemos inicialmente um experimento piloto onde administramos doses crescentes de losartan (10, 20 e 30 mg/Kg/dia) em ratos tratados cronicamente com L-NAME por duas semanas, avaliando-se a pressão arterial caudal. Apenas na dose maior (30

mg/Kg/dia) obtivemos efeito anti-hipertensivo, tendo esta dose sido selecionada para os próximos experimentos.

## **2.2. Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda**

Os animais foram pesados semanalmente utilizando-se uma balança digital convencional (marca Mettler).

A pressão arterial da cauda foi medida por método indireto (pletismografia de cauda), utilizando-se um manguito colocado em torno da cauda do animal, o qual era conectado a um sensor. O manguito era insuflado a um valor superior à pressão arterial do animal para, em seguida, ser desinsuflado até que as pulsações arteriais fossem visíveis ao osciloscópio (ZATZ, 1990). Os ratos foram previamente aquecidos em gaiola especial, para que se produzisse vasodilatação da artéria caudal. Os valores médios das medidas semanais do peso corporal e da pressão arterial de cauda foram utilizados como representativos de cada semana.

## **2.3. Estereologia cardíaca**

No final de cada período de estudo, os animais foram sacrificados pela inalação de halotano. Os corações foram dissecados, lavados em salina (0,9%, p/v) e fixados em solução de Bouin por 24 horas. As análises histológicas foram realizadas de acordo com o método descrito por AHERNE (1970). Para este procedimento, o ventrículo esquerdo e o septo foram cortados em cinco anéis equidistantes perpendiculares ao maior eixo do ventrículo. Os anéis foram

então embebidos em parafina, e secções de 5 µm foram coradas com tricrômico de Masson, hematoxilina-eosina e picro-sirius. As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico (Zeiss, Alemanha).

### **2.3.1. Índice de fibrose**

O grau de fibrose do miocárdio foi avaliado pela volumetria de pontos (AHERNE, 1970; WEIBEL,1979), utilizando-se um sistema-teste, no caso, uma ocular da Zeiss Kpl 8x, com retículo de integração de 25 pontos. Numa alíquota do órgão (40 campos microscópicos), para cada um dos animais dos diferentes grupos experimentais foi contado o número de pontos que caíram sobre o tecido conjuntivo. Após as contagens obteve-se a fração de volume (densidade de volume ou volume relativo - **Vv**) ocupada pelo tecido conjuntivo em relação aos outros componentes do órgão, mediante o uso de uma fórmula baseada em um conceito da estereologia, onde:

$$Vv = p / P_T$$

Sendo,

p = número de pontos que caíram sobre o tecido conjuntivo

P<sub>T</sub> = número total de pontos do sistema teste em 10 campos microscópicos

### **2.3.2. Avaliação estereológica dos vasos da microcirculação**

Na determinação dos parâmetros quantitativos da microcirculação, (densidades de volume, de comprimento e de área) utilizou-se um sistema-

teste; no caso, uma ocular da Zeiss Kpl 8x, com retículo de 100 pontos, exibindo 10 linhas paralelas em uma área quadrangular e uma objetiva de 100 x. Numa alíquota do órgão (5 campos microscópicos tomados ao acaso), foi contado o número de pontos que caíam sobre os capilares bem como o número de intersecções que os capilares faziam com as linhas desse sistema-teste. Além disso, contou-se o número de perfis dos capilares ( $Q_A$ ) contidos numa determinada área ( $A_T$ ), no caso, a área dada pelo sistema-teste que é igual  $0,08712 \text{ mm}^2$  referente a cinco campos microscópicos. O valor da área teste ( $A_T$ ) foi obtido medindo-se o comprimento ( $l$ ) de um dos lados do quadrado do sistema-teste com uma escala graduada contida na ocular (micrômetro ocular). Utilizando-se a fórmula que se segue, foi então possível, calcular o parâmetro discriminado:

$$A_T = \text{área-teste}$$

$$\text{No caso } l = 0,132 \text{ mm}$$

$$A_T = (l)^2 \Rightarrow A_T = (0,132)^2 \Rightarrow A_T = 0,017424 \text{ mm}^2$$

$$A_T \text{ total} = A_T \times \text{número de campos analisados:}$$

$$A_T \text{ total} = 0,017424 \times 5 = 0,08712 \text{ mm}^2$$

Para a determinação do  $V_v$  (fração de volume ou volume relativo), utilizou-se o mesmo sistema-teste descrito acima, contando-se os pontos que caíam sobre os capilares sanguíneos.

A fórmula usada para se determinar  $V_v$ , é baseada em um conceito de estereologia e representado sempre em porcentagem (%), ou seja :

$$V_v = P_p/P_T$$

Sendo,

$P_p$  = pontos que caem sobre os capilares

$P_T$  = número total de pontos do sistema-teste em 5 campos microscópicos.

Nos mesmos campos microscópicos contou-se também o número de perfis ou imagens ( $Q_A$ ) dos capilares da microcirculação, como também o número de intersecções ( $I$ ) desses vasos com as linhas do sistema-teste.

Para a determinação do  $L_v$  (densidade de comprimento), aplicou-se a seguinte fórmula:

$$L_v = 2 \times Q_A$$

Onde,

$Q_A$  = número de perfis dos capilares na área teste /  $A_T$

Na avaliação do  $S_v$  (densidade da área dos capilares), utilizou-se o mesmo sistema-teste, contando-se o número de intersecções que os capilares

faziam com as linhas do sistema-teste, para o cálculo do Sv usou-se a fórmula abaixo:

$$Sv = 2I / L_T$$

Onde,

I = intersecções dos capilares com a linha-teste

$L_T$  = comprimento total da linha-teste

No caso,

$$L_T = 10 \times 0,132 \times 5 = 6,6 \text{ mm}$$

(pois o sistema-teste contém 10 linhas com um comprimento igual a 0,132 mm em cinco campo analisados).

#### **2.4. Determinação da atividade da NO sintase neuronal (bNOS)**

A determinação da atividade da NOS no cérebro dos ratos foi conduzida de acordo com o método previamente descrito, o qual é baseado na conversão da [<sup>3</sup>H]-L-arginina a [<sup>3</sup>H]-L-citrulina (FORSTERMANN et al., 1990). Para este propósito, o cérebro dos ratos foi rapidamente removido, pesado e homogeneizado em 5 volumes de solução tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de L-citrulina. Os homogenatos foram incubados à temperatura ambiente por 30 min na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 10 μM de L-arginina contendo 100.000 dpm de monocloreto de L-[2,3,4,5-<sup>3</sup>H] arginina. A determinação da atividade da bNOS

foi também efetuada na ausência de cálcio (omissão de  $\text{CaCl}_2$  e adição de 1 mM de EGTA). O conteúdo de proteína das amostras foi determinado (PETERSON, 1977), e a atividade da NOS neuronal foi expressa como pmol de L-citrulina produzida por minuto e por mg de proteína.

## **2.5. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A determinação da atividade da ECA em soro dos ratos foi conduzida de acordo com o método previamente descrito, o qual é baseado na leitura à 382 nm da liberação do ácido hipúrico pela mesma, após reação com o ácido tricloro-triazina (CUSHMAN et al., 1971; HURST et al., 1981). Ao final de 6 meses de estudo, antes de os animais serem sacrificados pela inalação com halotano, coletou-se 5 ml de sangue através da aorta abdominal e os mesmos foram armazenados em freezer até o processamento. Para a realização deste protocolo, sangue e reagentes foram levados à temperatura ambiente, tendo sido obtido do sangue por centrifugação, o soro (contendo a ECA). Cada amostra teve o seu respectivo "branco" (sem substrato na incubação) e todo ensaio foi realizado em duplicata.

Foi pipetado em cada tubo, 20  $\mu\text{l}$  de amostra e 60  $\mu\text{l}$  de tampão borato de sódio 150 mM (pH 8,3) os quais foram pré-aquecidos a 37°C durante 5 min. Em seguida, foi adicionado em todos os tubos (exceto os "brancos") 20  $\mu\text{l}$  de solução de substrato a qual é composta de 25 mM de Hipuril-Histidil-Leucina,

preparada em solução de hidróxido de sódio 25 mM. Essa mistura foi incubada a 37°C durante 15 min, após o qual interrompeu-se a reação pela adição de 600 µl de tampão HEPES (100 mM, pH 9,0). Na seqüência, adicionou-se 20 µl de substrato nos tubos brancos e, a seguir, 300 µl do reagente cromogênico (que contém 2,5 % de 2,4,6 triclora - 1,3,5 triazina em dioxano ). Após agitação em vórtex aguardou-se 10 min, quando então as proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 1500 g por 5 min. As absorbâncias dos sobrenadantes foram registradas em espectrofotômetro a 382 nm, contra água destilada no decorrer dos 30 min após a adição do reagente cromogênico, devido à instabilidade do composto formado.

Padrões aquosos de ácido hipúrico (de concentrações compreendidas entre 18 e 1200 µM) foram processados em paralelo com as amostras biológicas, e a quantidade de ácido hipúrico liberado enzimaticamente foi quantificado por extrapolação da curva-padrão obtida em função das absorbâncias após correção das leituras pelos respectivos brancos.

As atividades da ECA foram obtidas relativizando-se a quantidade de ácido hipúrico gerado pelo tempo de incubação e pelo volume, e expressas como nmol/ml/min.

## **2.6. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão das médias. Para análise estatística dos dados, usamos análises da variância (ANOVA)

seguidas pelo teste de Bonferroni ou pelo teste de Tukey. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados significantes.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Peso corpóreo

Durante os 6 meses de tratamento, notamos que o L-NAME causou uma queda do peso corpóreo de aproximadamente 10%; porém esta redução não foi significativa em relação ao grupo controle (Tabela 1). Da mesma forma, nos demais grupos experimentais, não observamos variações significativas dos pesos corpóreos.

**Tabela 1** - Peso corpóreo dos ratos aos 2, 4 e 6 meses de estudo para os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM.

Grupos	2 meses	% $\Delta$	4 meses	% $\Delta$	6 meses	% $\Delta$
Controle	358 $\pm$ 6.5	-	404 $\pm$ 9.5	-	426 $\pm$ 12	-
L-NAME	327 $\pm$ 8.0	8.6	377 $\pm$ 12	6.7	383 $\pm$ 11	10.1
L-NAME+Enalapril	331 $\pm$ 8.3	7.5	373 $\pm$ 8.8	7.7	393 $\pm$ 10	7.7
L-NAME+Losartan	335 $\pm$ 8.1	6.4	363 $\pm$ 11	10.1	399 $\pm$ 12	6.3
Enalapril	343 $\pm$ 6.2	4.2	386 $\pm$ 8.6	4.4	398 $\pm$ 9.7	6.6
Losartan	363 $\pm$ 18	1.4	404 $\pm$ 18	0.0	422 $\pm$ 21	0.9

### **3.2. Pressão arterial**

A tabela 2 mostra que a administração diária de L-NAME por 2, 4 e 6 meses causou uma elevação discreta, porém significativa ( $P<0.05$ ), da pressão arterial. Este aumento foi detectado com 2 meses de tratamento, mantendo-se presente até o final do estudo (6<sup>o</sup> mês), não seguindo portanto um padrão de resposta do tipo tempo-dependente.

A administração concomitante de losartan preveniu o aumento de pressão arterial causado pelo L-NAME ao longo de todo o estudo. Não detectamos diferenças significativas entre animais do grupo controle e animais que receberam L-NAME+Losartan. De modo similar ao losartan, a administração de enalapril preveniu o aumento de pressão arterial causado pelo L-NAME em todos os tempos estudados. Os níveis pressóricos do grupo que recebeu L-NAME+Enalapril mantiveram-se inferiores aos animais do grupo controle.

Notamos que o grupo que recebeu somente enalapril apresentou a pressão arterial significativamente reduzida em relação ao grupo controle ao final de 2, 4 e 6 meses de tratamento (Tabela 2). Da mesma forma, o grupo que recebeu apenas o losartan apresentou a pressão arterial reduzida em relação ao grupo controle no 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> mês de tratamento.

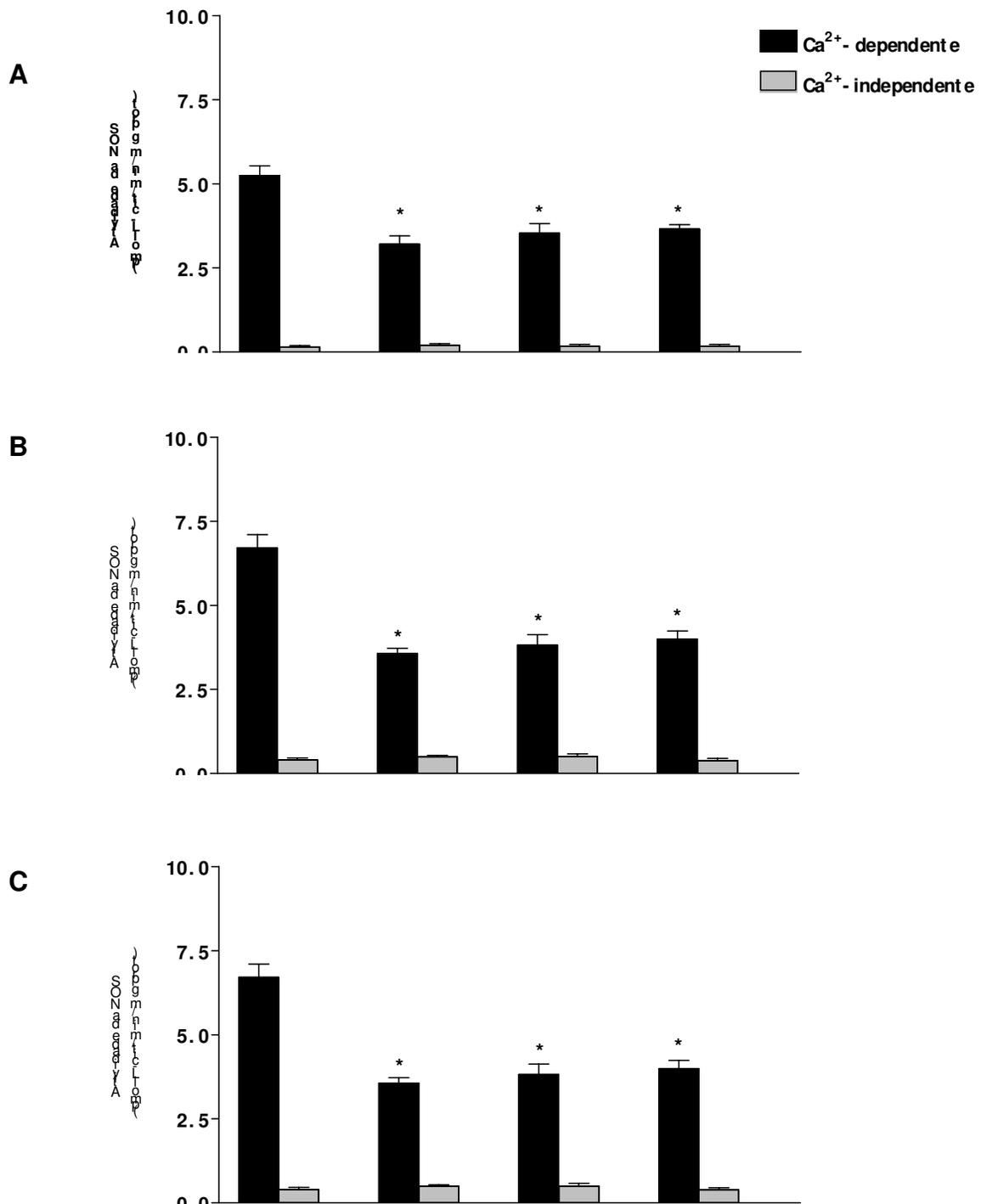
**Tabela 2** - Pressão arterial caudal (PAC, mmHg) dos ratos aos 2, 4 e 6 meses de estudo para os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM.

<b>Grupos</b>	<b>2 meses</b>	<b>4 meses</b>	<b>6 meses</b>
Controle	126 $\pm$ 2.4	130 $\pm$ 0.4	126 $\pm$ 2.0
L-NAME	142 $\pm$ 2.1*	143 $\pm$ 3.5*	144 $\pm$ 1.3*
L-NAME+Enalapril	114 $\pm$ 2.1 <sup>#</sup>	110 $\pm$ 1.7 <sup>#</sup>	116 $\pm$ 2.7 <sup>#</sup>
L-NAME+Losartan	117 $\pm$ 2.6 <sup>#</sup>	121 $\pm$ 4.2 <sup>#</sup>	120 $\pm$ 2.6 <sup>#</sup>
Enalapril	113 $\pm$ 2.8*	106 $\pm$ 3.9*	107 $\pm$ 3.5*
Losartan	121 $\pm$ 3.7	113 $\pm$ 2.7*	114 $\pm$ 3.3*

\* $P < 0,05$  comparado aos valores controle; <sup>#</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo L-NAME.

### **3.3. Atividade da NOS neuronal**

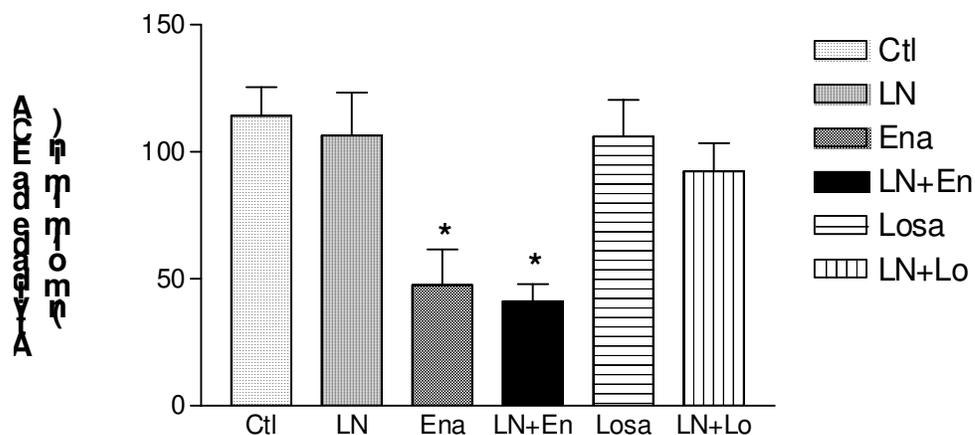
O tratamento dos ratos por 2, 4 e 6 meses com L-NAME acarretou inibição significativa da atividade da NOS cerebral, tendo a inibição máxima atingida aos 2 meses de tratamento (Figura 1). A associação do enalapril (ou losartan) ao L-NAME não modificou essa resposta inibitória. A remoção de  $\text{Ca}^{+2}$  e a adição concomitante de EGTA ao homogenato cerebral dos diversos grupos experimentais mostraram que a atividade da NOS foi praticamente abolida, comprovando-se tratar de NOS do tipo constitutiva.



**Figura 1** – Atividade da NO sintase cerebral (bNOS) em ratos após 2, 4 e 6 meses de estudo para os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril e L-NAME+Losartan. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, tratamentos de 2, 4 e 6 meses. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  comparado aos valores controle.

### 3.4. Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)

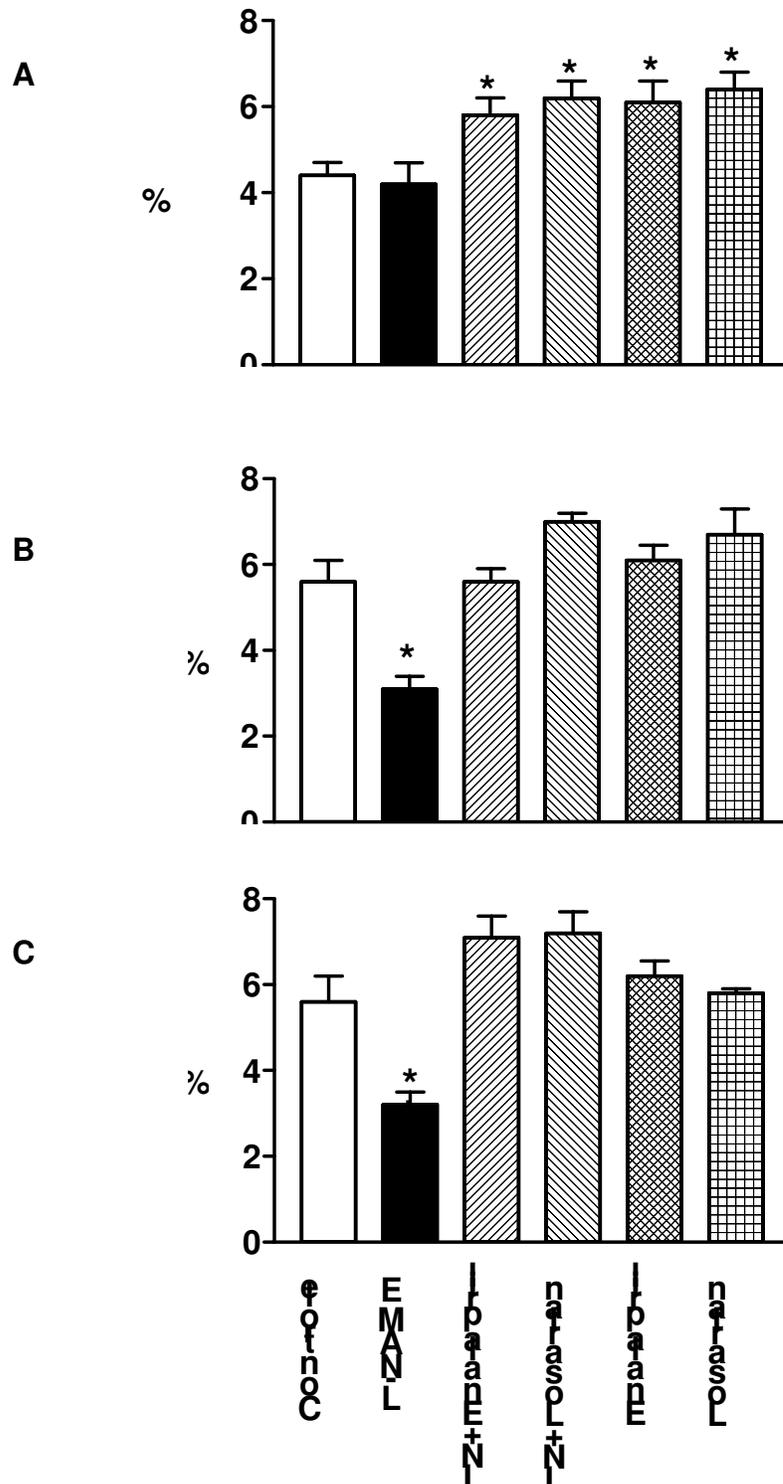
A atividade da ECA foi avaliada somente aos 6 meses de estudo. Notamos que a atividade da ECA reduziu significativamente após o tratamento dos ratos com o inibidor desta enzima, enalapril, conforme esperado (Figura 2). Os resultados mostram também que o tratamento com L-NAME, na dose empregada, não modificou a atividade da ECA. Os tratamentos concomitantes do L-NAME com enalapril ou losartan também não exerceram influência sobre o efeito inibitório do enalapril.



**Figura 2** - Atividade da ECA ao final de 6 meses de estudo. A figura mostra animais controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle.

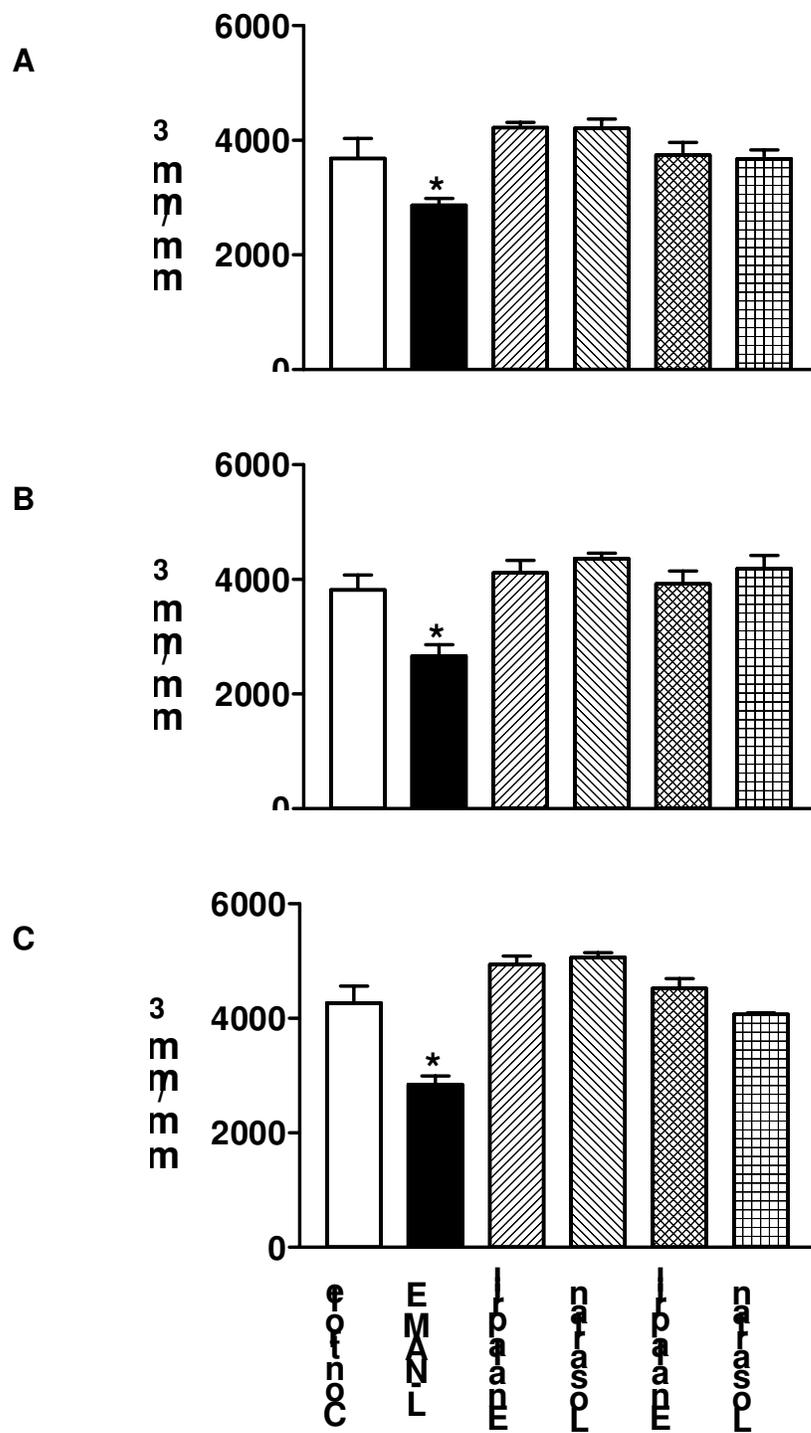
### **3.5. Avaliação histológica dos capilares sangüíneos**

A figura 3 mostra que a administração diária de L-NAME por 4 e 6 meses causou uma queda significativa da fração de volume ou volume relativo (Vv) dos capilares sangüíneos em relação aos demais componentes estruturais do miocárdio. Esta redução foi revertida pelo tratamento concomitante com enalapril ou losartan. É curioso que o tratamento com losartan ou enalapril, quer administrados individualmente, quer associados ao L-NAME, provocou um aumento discreto do Vv em relação ao grupo controle aos 2 meses.



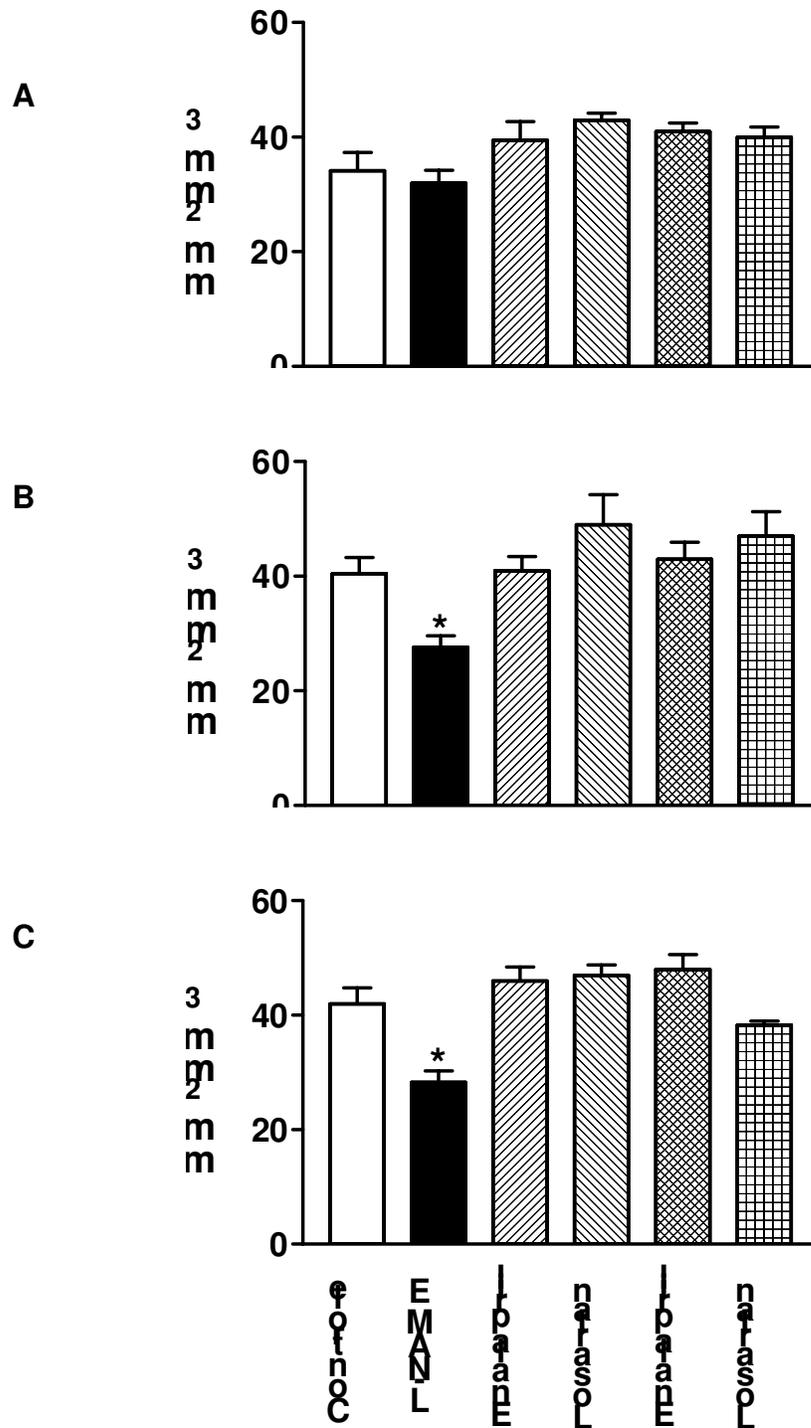
**Figura 3** - Fração de volume (Vv) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo. A figura mostra os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, tratamentos de 2, 4 e 6 meses. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle.

Em relação à densidade de comprimento dos capilares ( $L_v$ ), notamos uma queda significativa no grupo L-NAME em todos os tempos estudados, em relação ao grupo controle (Figura 4). Nos animais que receberam enalapril (ou losartan), associados ao L-NAME, houve uma reversão da queda do  $L_v$ . O tratamento individual com enalapril ou losartan não modificou significativamente este parâmetro.



**Figura 4** - Densidade de complemento (Lv) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo. A figura mostra os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, tratamentos de 2, 4 e 6 meses. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle.

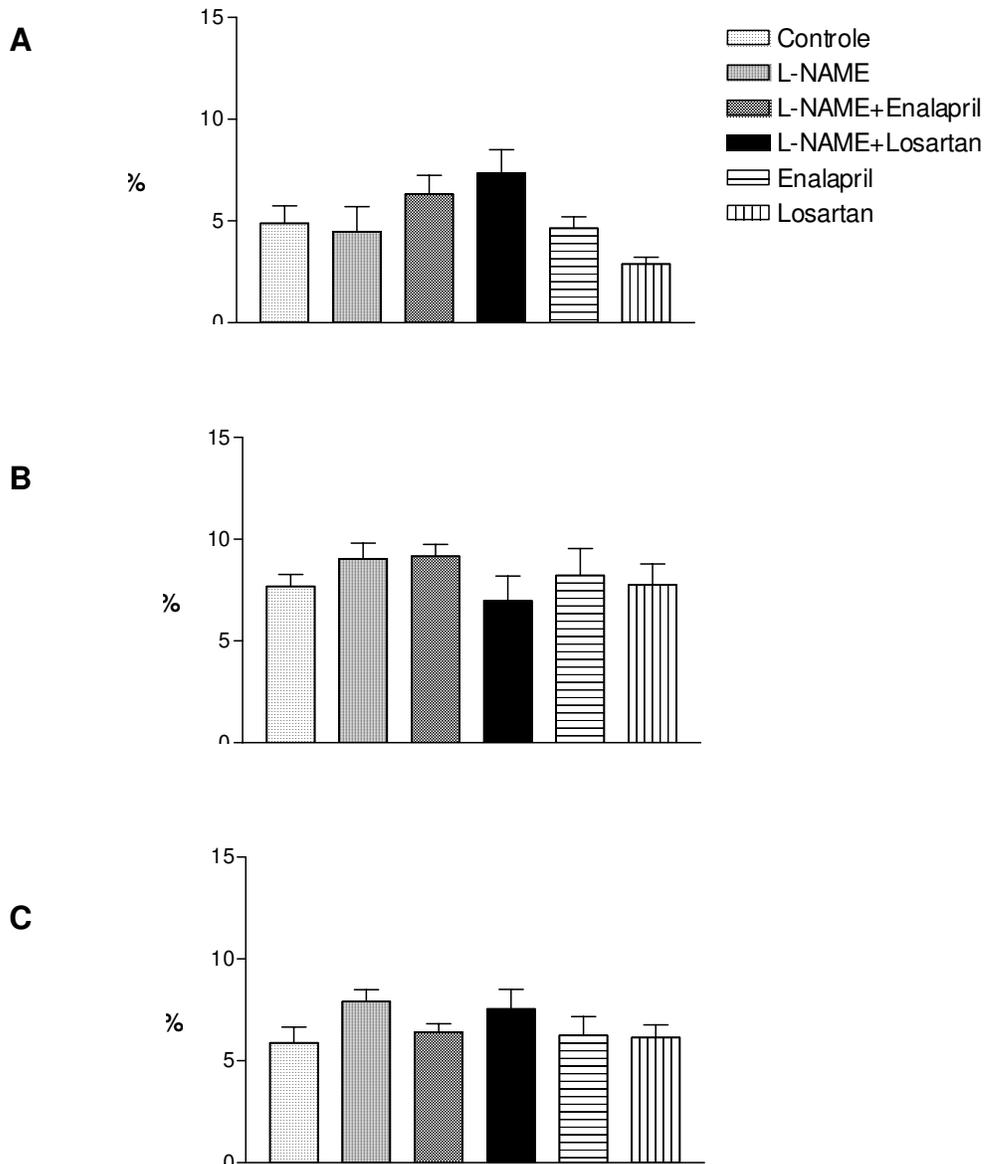
Resultados semelhantes foram observados para a densidade de área (Sv), onde o tratamento com L-NAME causou redução significativa do Sv aos 4 e 6 meses de tratamento. A administração de losartan (ou enalapril) associados ou não ao L-NAME manteve os valores de Sv próximos aos do grupo controle (Figura 5). O tratamento individual com enalapril ou losartan não modificou significativamente este parâmetro.



**Figura 5** - Densidade de área (mm<sup>3</sup>) ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo. A figura mostra os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, tratamentos de 2, 4 e 6 meses. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM. \*P<0,05 comparado ao grupo controle.

### 3.6. Índice de fibrose

A Figura 6 mostra que o grau de fibrose entre os diferentes grupos experimentais não diferiu significativamente aos 2, 4 e 6 meses de tratamento.



**Figura 6** - Índice de fibrose ao final de 2, 4 e 6 meses de estudo. A figura mostra os grupos controle (não-tratados), L-NAME, L-NAME+Enalapril, L-NAME+Losartan, Enalapril e Losartan. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, tratamentos de 2, 4 e 6 meses. Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM.

## 4. DISCUSSÃO

O NO gerado pelas células endoteliais é reconhecidamente capaz de regular o fluxo sanguíneo e a pressão arterial, além de modular a adesão e agregação plaquetária e a proliferação de músculo liso (HARRISON, 1997). Através do uso de modelos animais, é possível induzir tanto alterações na produção como na biodisponibilidade do NO. Assim, a administração de inibidores de NOS em animais de experimentação, particularmente quando realizada de modo prolongado, causa hipertensão arterial (RIBEIRO et al., 1992; BAYLIS et al., 1992) acompanhada de alterações estruturais e funcionais da microcirculação coronariana (ITO et al., 1995; NUMAGACHI et al., 1995; KADOKAMI et al., 1996). Além de servir como modelo experimental de hipertensão arterial, a administração crônica de L-NAME também é usada como modelo de miocardiopatia uma vez que induz isquemia cardíaca e disfunção mecânica não relacionada a hipertrofia cardíaca (MORENO-JR et al, 1996). No presente trabalho, mostramos que o tratamento crônico de ratos com dose baixa de L-NAME (7,5 mg/kg/dia) causou elevação discreta da pressão arterial (13%, 10% e 14% aos 2, 4 e 6 meses de tratamento, respectivamente), mas significativa em relação ao grupo controle. Entretanto, esta elevação da pressão arterial com dose baixa de L-NAME é marcadamente menor do que aquela observada com doses maiores de L-NAME (> 10 mg/kg/dia), onde os valores absolutos de pressão arterial podem alcançar a faixa de 175 a 200 mmHg (RIBEIRO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2000; PACCA et al., 2002). Parece-nos claro, portanto, que o discreto aumento da pressão arterial com a dose de 7,5 mg/kg/dia de L-NAME foi reflexo da inibição parcial da cNOS (de

aproximadamente 50%) que foi máxima aos 2 meses, mantendo-se estável até os 6 meses de tratamento. Dessa forma, esta dose de L-NAME mostrou-se adequada aos nossos propósitos, ou seja, os de investigar a remodelação do ventrículo esquerdo (remodelamento vascular e fibrose) na vigência de discreta alteração da pressão arterial.

Os nossos presentes resultados de análise estereológica dos vasos cardíacos mostraram redução da microcirculação (Vv, Lv e Sv) nos animais tratados com L-NAME, particularmente aos 4 e 6 meses. Isto parece falar a favor da redução da microcirculação como consequência de episódio isquêmico que se instala e se mantém ao longo de 6 meses de tratamento com L-NAME. Entretanto, estranhamos o fato de o tratamento crônico com L-NAME não ter levado à fibrose ventricular ao longo do tempo, a julgar pela inexistência de variações significativas na fração de volume ocupada pelo tecido conjuntivo em relação aos demais componentes estruturais do miocárdio. É possível que a fibrose só se instale na presença de isquemia miocárdica mais intensa, decorrente de maior inibição de NOS. De fato, a fibrose é claramente observada com doses mais elevadas de L-NAME (20 mg/rato/dia) a partir de quatro semanas de tratamento (MORENO-JR et al., 1995, 1996; PACCA et al., 2002), e tem sido atribuída à deficiência sistêmica de NO, levando à redução no fornecimento de sangue ao músculo cardíaco. Ao nível de fluxo coronariano, ocorreria um fornecimento de oxigênio e contratilidade miocárdica inadequados, resultando em diminuição do cardiomiócito e, em estágios mais avançados, em morte do miócito e substituição dos mesmos por tecido fibroso. Mesmo

agudamente (72 horas após administração oral), o L-NAME pode causar lesões cardíacas, levando à fibrose miocárdica (MORENO-JR et al., 1997). Nesse aspecto, estranhamos um estudo prévio mostrando que o tratamento com L-NAME (130 mg/kg/dia) por oito semanas alterou apenas modestamente a densidade de capilares no ventrículo esquerdo, mesmo tendo levado os animais à hipertensão arterial e fibrose miocárdica (GOTO et al., 1999).

Os agentes anti-hipertensivos utilizados concomitantemente ao tratamento crônico por 6 meses com baixa dose de L-NAME foram o enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) e o losartan (antagonista de receptor de angiotensina II). A angiotensina II é um potente vasoconstritor e o principal hormônio determinante da fisiopatologia da hipertensão, já que ao ligar-se ao receptor  $AT_1$  (encontrado em muitos tecidos como músculo liso vascular, glândulas adrenais, rins e coração) desencadeia vasoconstrição, liberação de aldosterona e estimula a proliferação do músculo liso vascular. Ambas as drogas são indicadas para o tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca, porém o losartan bloqueia todas ações fisiologicamente relevantes da angiotensina II, sem levar em consideração sua fonte ou via de síntese, e o enalapril é inibidor também da degradação da bradicinina, potente vasodilatador, que portanto tem sua ação aumentada.

Nossos resultados mostraram que o tratamento dos animais com o enalapril ou losartan impediu a elevação de pressão arterial induzida pelo L-NAME e reverteu a redução de praticamente todos os parâmetros da microcirculação (Sv, Vv e Lv). Conforme esperado, a atividade da ECA diminuiu

significativamente com a dose utilizada de enalapril, sendo que no grupo L-NAME, a mesma não foi modificada.

A hipertensão e alterações morfológicas cardíacas produzidas pela administração prolongada de L-NAME em ratos parecem ser dependentes da ativação do sistema renina-angiotensina. Tais conclusões foram baseadas em resultados mostrando que tanto inibidores da ECA (captopril e enalapril) como antagonistas de receptores de angiotensina II (losartan) reduzem a hipertensão arterial (RIBEIRO et al., 1992; HROPOT et al., 1994; MORENO-JR et al., 1995; PECHANOVA et al., 1997; AKUZAWA et al., 1998; MATSUBARA et al., 1998). Entretanto, é curioso que, enquanto o enalapril reduz a pressão arterial sem modificar as lesões cardíacas, o losartan previne ambos, hipertensão e lesões cardíacas. Dessa forma, especula-se que a formação de angiotensina II no tecido cardíaco não esteja relacionada unicamente à ECA, mas sim à quimase. Entretanto, a via da quimase parece ser pouco expressiva em roedores quando comparada com humanos, no que se refere à formação de angiotensina II (BALCELLS et al., 1997). Outro estudo demonstrou que a atividade da ECA não está alterada em corações de ratos tratados cronicamente com L-NAME (TEIXEIRA et al., 2005). Assim, a discrepância de efeitos de inibidores da ECA e antagonistas de receptores  $AT_1$  de angiotensina II no que se refere à prevenção (ou não) dos distúrbios cardiovasculares produzidos pelo L-NAME ainda é pouco compreendida. Além disso, os efeitos da inibição crônica de NO sobre a atividade da renina plasmática são também bastantes contraditórios, onde se encontra desde redução, aumento ou ausência de efeito (RIBEIRO et

al., 1992; GARDES et al., 1992; DANANBERG et al., 1993; NAVARRO et al., 1994; ELSNER et al., 1992). Estudos futuros medindo-se a atividade da quimase em corações (e vasos) de animais tratados cronicamente com L-NAME talvez sejam necessários. Em relação aos nossos resultados, acreditamos que a reversão dos parâmetros da microcirculação (Sv, Vv e Lv) pelo enalapril ou losartan seja devida à capacidade destes agentes de restaurar a perfusão sangüínea ventricular, pelo impedimento de formação de angiotensina II ou de bloqueio de receptores AT<sub>1</sub>.

Trabalho prévio mostrou que as curvas concentração-resposta de pressão arterial à angiotensina II em animais tratados com L-NAME é semelhante às curvas de animais tratados concomitantemente com enalapril e L-NAME, excluindo que o NO interfere com a função dos receptores de angiotensina II (ACKERMANN et al., 1998). Por outro lado, apesar de ter sido publicado que o tratamento prolongado com L-NAME causa uma regulação positiva (*upregulation*) para a ECA tissular (TAKEMOTO et al., 1997; ACKERMANN et al., 1998), nosso presente estudo mostra que a atividade da ECA sérica não é alterada pelo tratamento com L-NAME (seis meses). Outro estudo mostrou que o L-NAME (20 mg/kg/dia, 8 semanas) não modifica significativamente a atividade da ECA tissular em coração, fígado e pulmões de ratos, mas diminui a atividade da ECA renal, descartando que a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona pelo bloqueio crônico de NO seja devido a aumento de ECA tissular (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, o fato do enalapril e do losartan não terem interferido com a atividade da NOS

neuronal descarta que tais compostos estejam atuando em nível de sistema nervoso central restaurando a perda de atividade da cNOS.

A angiogênese é a formação de novos capilares a partir de estruturas vasculares pré-existentes. Isto representa um fenômeno de grande importância na manutenção da integridade vascular, tanto no reparo do dano tecidual quanto na formação de vasos colaterais (FOLKMAN, 1995). A angiogênese é um processo complexo orquestrado por citocinas (principalmente TNF- $\alpha$ ) e fatores de crescimento (VEGF e  $\beta$ -FGF). O endotélio é descrito como um tecido necessário e suficiente para a formação de novos vasos. Além de exercer ações vasodilatadoras e antiplaquetárias, o NO, de natureza endotelial, parece também controlar a angiogênese, mas isto ainda é bastante controverso, uma vez que a literatura mostra o NO tanto como angiogênico (ZICHE et al., 1994) ou como antiangiogênico (PILIPI-SYNETOS et al., 1994). Pensando no NO como um fator angiogênico, em nosso estudo, não poderíamos descartar a hipótese que a redução dos parâmetros vasculares coronarianos pelo L-NAME se deve à simples retirada do NO da circulação cardíaca, independentemente da condição de isquemia imposta pelo L-NAME.

## 5. CONCLUSÕES

O tratamento crônico com dose baixa de L-NAME, durante 6 meses:

- Causa discreta elevação da pressão arterial;
- Reduz moderadamente a atividade da cNOS;
- Não modifica a atividade da ECA;
- Reduz significativamente os parâmetros vasculares da circulação coronariana;
- Não induz fibrose miocárdica.

O tratamento concomitante com Enalapril ou Losartan:

- Normaliza o aumento da PAC induzido pelo L-NAME;
- Reverte a queda de Vv, Lv e Sv.

Os resultados sugerem que a microcirculação coronariana é altamente dependente de NO, pois na vigência de apenas discreta elevação da pressão arterial sistêmica pelo L-NAME, ocorre marcante redução da esteologia miocárdica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, A.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S.; SANCHEZ DE ROJAS, R.; ORTEGA, T.; PAUL, M.; GONZALEZ, C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. **Br J Pharmacol**, 124: 291-8, 1998.
- AHERNE, W. Quantitative methods in histology. **J Med Lab Technol**, 27: 160-70, 1970.
- AKUZAWA, N.; NAKAMURA, T.; KURASHINA, T.; SAITO, Y.; HOSHINO, J.; SAKAMOTO, H. et al. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. **Am J Hypertens**, 11: 697-707, 1998.
- BABAL, P.; PECHANOVA O.; BERTANOVA, I.; STVRTINA, S. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. **Histol Histopathol**, 12: 623-9, 1997.
- BALCELLS, E.; MENG, Q. C.; JOHNSON-JR, W. H.; OPARIL, S.; DELL'ITALIA, L. J. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. **Am J Physiol**, 273: H1769-74, 1997.
- 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: 278-81, 1992.
- BOULANGER, C. M.; CAPUTO, L.; LEVY, B. I. Endothelial AT<sub>1</sub>-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. **Hypertension**, 26: 752-7, 1995.
- BOWER, E. A.; LAW, A. C. K. The effects of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside and noradrenaline on venous return in the anaesthetized cat. **Br J Pharmacol**, 108: 933-40, 1993.
- CALVER, A.; COLLIER, J.; MONCADA, S.; VALLANCE, P. Effect of local intra-arterial N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator appears abnormal. **J Hypertens**, 10: 1025-31, 1992.
- CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIM, D.; PRATT, P. F.; HARDER, D. R. Identification of epoxyeicotrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarization factors. **Circ Res**, 78: 415-23, 1996.
- CARVALHO M. H. C.; SCIVOLLETTO, R.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Funções fisiológicas do endotélio vascular. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 2: 121-8, 1996.

- CHILLON, J. M.; GHONEIM, S.; BAUMBACH, G. L. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in rats. **Hypertension**, 30: 1097-104, 1997.
- COCKROFT, J. R.; CHOWIENCZYK, P. J.; BENJAMIN, N.; RITTER, J. M. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. **New Engl J Med**, 330: 1036-40, 1994.
- CORTES, S. F.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J. C. Alterations of cyclo-oxygenase and NO in responses to angiotensin II of resistance arteries from the spontaneously hypertensive rat. **Br J Pharmacol**, 119: 1635-41, 1996.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNH, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochem Pharmacol**, 20(7): 1637-48, 1971.
- DANANBERG, J.; SIDER, R.; GREKIN, R. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. **Hypertension**, 21: 359-63, 1993.
- DELACRETAZ, E.; ZANCHI, A.; NUSSBERGER, J.; HAYOZ, D.; AUBERT, J. F.; BRUNER, H. R. et al. Chronic nitric oxide synthase inhibition and carotid artery distensibility in renal hypertensive rats. **Hypertension**, 26: 332-6, 1995.
- DEVLIN, A. M.; BROSNAN, M. J.; GRAHAM, D.; MORTON, J. J.; MCPHADEN, A. R.; MCINTYRE, M. et al. Vascular smooth muscle cell polyploid and cardiomyocyte hyperthrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. **Am J Physiol**, 274: H52-9, 1998.
- ELSNER, D.; MUNTZE, A.; KROMER, E. P.; RIEGGER, G. A. Inhibition of synthesis of endothelium-derived nitric oxide in conscious dogs. Hemodynamic, renal, and hormonal effects. **Am J Hypertens**, 5: 288-91, 1992.
- ERDUS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. **Hypertension**, 19: 365-70, 1990.
- FOLKMAN, J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med**, 333: 1757-63, 1995.
- FORSTERMANN, U.; MÜLSCH, A.; BOHME, E.; BUSSE, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circ Res**, 58: 5311-538, 1986.

- FORSTEMANN, U.; GORSKY, L. D.; POLLOCK, J. S.; SCHMIDT, H. H. H. W.; HELLER, M.; MURAD, F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem Biophys Res Comm**, 168: 727-32, 1990.
- FUJIHARA, C. K.; MICHELAZZO, S. M.; DE NUCCI, G.; ZATZ, R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. **Am J Physiol**, 266: F697-705, 1994.
- FUKAMI, H.; OKUNISHI, H.; MIYAZAKI, M. Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors. **Curr Pharm Des**, 6: 439-53, 1998.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-6, 1980a.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells. **Fed Proc**, 39: 581A, 1980b.
- FURCHGOTT, R. F. The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. **Ann Ver Pharmacol Toxicol**, 24: 175-97, 1984.
- GARDES, J.; POUX, J. M.; GONZALEZ, M. F.; ALHENC-GELAS, F.; MENARD, J. Decreased renin release and constant kallikrein secretion after injection of L-NAME in isolated perfused rat kidney. **Life Sci**, 50: 987-93, 1992.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNET, T. Regional and cardiac haemodynamic effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. **Br J Pharmacol**, 101: 746-52, 1990.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K. ; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol**, 48: 184-8, 1995.
- GRYGLEWSKI, R.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 320: 454-6, 1986.
- GOTO, D.; FUJII, S.; ZAMAN, A. K.; SAKUMA, I.; GAO, M.; KOYAMA, T. Long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats modulates coronary capillary network remodeling. **Angiogenesis**, 3: 137-46, 1999.

- HABERL, R. L. Role of angiotensin receptor subtypes in the response of rabbit brain arterioles to angiotensin. **Stroke**, 25: 1476-9, 1994.
- HANDY, R. L. C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z. A.; WHITEHEAD, K. J.; MOORE, P. K. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase *in vitro*, in the mouse. **Br J Pharmacol**, 116: 2349-50, 1995.
- HARRISON, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **J Clin Invest**, 100: 2153-7, 1997.
- HIROOKA, Y.; IMAIZUMI, T.; MASAKI, H.; ANDO, S.; HARADA, S.; MOMOHARA, N. et al. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilatation in hypertensive patients. **Hypertension**, 20: 175-780, 1992.
- HROPOT, M.; GROTSCH, H.; KLAUS, E.; LANGER, K. H.; LINZ, W.; WIEMER, G. et al. Ramipril prevents the detrimental sequels of chronic NO synthase inhibition in rats: hypertension, cardiac hypertrophy and renal insufficiency. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 350: 646-52, 1994.
- HUANG, P. L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K. D.; MOSKOWITZ, M. A.; BEVAN, J. A. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, 377: 239-42, 1995.
- HURST, P. L.; LOVELL-SMITH, C. J. Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. **Clin Chem**, 27(12): 2048-52, 1981.
- IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties to those of nitric oxide radical. **Circ Res**, 61: 866-79, 1987.
- ITO, A.; EGASHIRA, K.; KADOKAMI, T.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAKAIKE, R. et al. Chronic inhibition of endothelium-derived nitric oxide synthesis causes coronary microvascular structural changes and hyperreactivity to serotonin in pigs. **Circulation**, 92: 2636-44, 1995.
- JOVER, B.; HERIZI, A.; VENTRE, F.; DUPONT, M.; MIMRAN, A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. **Hypertension**, 21: 944-8, 1993.
- JUUL, B.; AALKJAER, C.; MULVANY, M. J. Responses of femoral resistance vessels to angiotensin *in vitro*. **Eur J Pharmacol**, 135: 61-8, 1987.

- KADOKAMI, T.; EGASHIRA, K.; KUWATA, K.; FUKUMOTO, Y.; KOZAI, T.; YASUTAKE, H. Altered serotonin receptor subtypes mediate coronary microvascular hyperreactivity in pigs with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Circulation**, 94: 182-9, 1996.
- KLABUNDE, R. E.; RITGER, R. C.; HELGREN, M. C. Cardiovascular actions of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anaesthetized dogs. **Eur J Pharmacol**, 199: 51-9, 1991.
- K-LAFLAME, A.; FOUCART, S.; MOREAU, P.; LAMBERT, C.; CARDINAL, R.; DE CHAMPLAIN, J. Sympathetic functions in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. **J Hypertens**, 16: 63-73, 1998.
- LIAO, Y.; HUSAIN, A. The chymase-angiotensin system in humans: biochemistry, molecular biology and potential role in cardiovascular diseases. **Can J Cardiol**, Suppl F: 13F-9F, 1995.
- LIN, L.; NASJLETTI, A. Role of endothelium-derived prostanoid in angiotensin II-induced vasoconstriction. **Hypertension**, 18: 158-64, 1991.
- LUVARA, G.; PUEYO, M. E.; PHILLOPPE, M.; MANDET, C.; SAVOIE, F.; HENRION, D. et al. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 18: 1408-16, 1998.
- MATSUBARA, B. B.; MATSUBARA, L. S.; ZORNOFF, L. A.; FRANCO, M.; JANICKI, J. S. Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. **Basic Res Cardiol**, 93: 173-81, 1998.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, 263(5579): 663-5, 1976.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Res**, 43: 109-42, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New Engl J Med**, 329: 2002-12, 1993.
- MOORE, P. K.; AL-SWAYEH, O. A.; CHONG, N. W. S.; EVANS, R. A.; GIBSON, A. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine

- reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". **Br J Pharmacol**, 99: 408-12, 1990.
- MOREAU, P.; TAKASE, H.; D'USCIO, L. V. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. **Stroke**, 29: 1035-6, 1998.
- MORENO-JR, H.; NATHAN, L. P.; COSTA, S. K. P.; METZE, K.; ATUNES, E.; ZATZ, R. et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischaemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur J Pharmacol**, 287: 93-6, 1995.
- MORENO-JR, H.; METZE, K.; BENTO, A. C.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Res Cardiol**, 91: 248-55, 1996.
- MORENO-JR, H.; NATHAN, L. P.; METZE, K.; COSTA, S. K. P.; ANTUNES, E.; HYSLOP, S. et al. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 24: 349-52, 1997.
- MÜLSCH, A.; BUSSE, R. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (N5-[imino (nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 341: 143-7, 1990.
- NAKANE, M.; KLINGHOFER, V.; KUK, J. E.; DONNELLY, J. L.; BUDZIK, G. P.; POLLOCK, J. S. et al. Potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Mol Pharmacol**, 47: 831-4, 1995.
- NAVARRO, J.; SANCHEZ, A.; SAIZ, J.; RUILOPE, L. M.; GARCIA-ESTAN, J.; ROMERO, J. C. et al. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. **Am J Physiol**, 267: R1516-21, 1994.
- NUMAGACHI, K.; EGASHIRA, K.; TAKEMOTO, M.; KADOKAMI, T.; SHIMOKAWA, H.; SUEISHI, K. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension**, 26: 957-62, 1995.
- OHESSEN, S. P.; CLAPHAM, D. E.; DAVIES, P. Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current vascular endothelial cells. **Nature**, 331: 168-70, 1988.

- OLIVEIRA, C. F.; NATHAN, L. P.; METZE, K.; MORENO-JR, H.; DE LUCA, I. M. S.; SUCUPIRA, M. et al. Effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat. **Eur J Pharmacol**, 373: 195-200, 1999.
- OLIVEIRA, C. F.; CINTRA, K. A.; TEIXEIRA, S. A.; DE LUCA, I. M. S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. **Eur J Pharmacol**, 391: 121-6, 2000.
- PACCA, S. R.; AZEVEDO, A. P.; OLIVEIRA, C. F.; DE LUCA, I. M.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. **J Cardiovasc Pharmacol**, 39: 201-7, 2002.
- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-6, 1987.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-6, 1988a.
- PALMER, R. M. J.; REESET, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Commun**, 153: 1251-6, 1988b.
- PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I.; PELOUCH, V.; SIMKO, F. Protein remodeling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 3365-74, 1997.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. **Anal Biochem**, 83: 346-56, 1977.
- PILIPI-SYNETOS, E.; SAKKOULA, E.; HARALABOPOULOS, G.; ANDRIOPOULOU, P.; PERISTERIS, P.; MARAGOUDAKIS, M. E. Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator. **Br J Pharmacol**, 111: 894-902, 1994.
- POWEL, J. S.; CLOZEL, J. P.; MULLER, K. M. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. **Science**, 245: 186-8, 1989.

- PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Trophic effects of angiotensin on blood vessels and heart. In: ROBERTSON, J.I., NICHOLLS, M.G., eds. **The renin-angiotensin system**. London: Gower Medical Publishing, 1: 31.1-31.7, 1993.
- RAPAPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, 306: 174-6, 1983.
- REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85: 2334-8, 1988.
- RHALEB, N.E.; YANG, X. P.; SCICLI, G.; CARRETERO, O. A. Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. **Hypertension**, 23: 865-8, 1994.
- RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis – A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, 20: 298-303, 1992.
- RUBANYI, G. M.; ROMERO, J. C.; VANHOUTTE, P. M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**, 250: H1145-9, 1986.
- SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem Pharmacol**, 51: 383-94, 1996.
- SZABÓ, C.; BRYK, R.; ZINGARELLI, B.; SOUTHAN, G. J.; GAHMAN, C.; BHAT, V. et al. Pharmacological characterization of guanidinoethyldisulphide (GED), a novel inhibitor of nitric oxide synthase with selectivity towards the inducible isoform. **Br J Pharmacol**, 118: 1659-68, 1996.
- TAKEMOTO, M.; EGASHIRA, K.; USUI, M.; NUMAGACHI, K.; TOMITA, H.; TSUTSUI, H. et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. **J Invest**, 99: 278-87, 1997.
- TEXEIRA, S. A.; NATHAN, L. P.; COSTA, S. K. P.; ZAPPELLINI, A.; ZATZ, R.; ANTUNES, E. et al. Chronic nitric oxide synthesis inhibition does not change tissular angiotensin converting enzyme activity in the rat. Em fase de redação.

- TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol Rev**, 45: 205-51, 1993.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. **J Cardiovasc Pharmacol**, 13: 585-9, 1989.
- WEIBEL, E. R. Practical methods for Biological Morphometry. Stereological methods. **Academic Press**, New York, 1979.
- ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Anim Sci**, 40: 198-201, 1990.
- ZATZ, R.; BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32: 958-64, 1998.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MANSINI, E.; AMERINI, S.; GRANJER, H. J.; MAGGI, C. A. et. al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **J Clin Invest**, 94: 2036-44, 1994.
- ZHOU, M. S.; SCHULMAN, I. H.; RAIJ, L. Nitric oxide, angiotensin II, and hypertension. **Semin Nephrol**, 24(4): 366-78, 2004.