

MICHIKO REGINA OZAKI

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***ESTUDO DO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM
RATOS SUBMETIDOS A INFARTO EXPERIMENTAL E TRATADOS
COM INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
E BLOQUEADORES ESPECÍFICOS DOS RECEPTORES AT1***

Campinas

2001



UNIDADE Bc
N.º CHAMADA:
T/Unicamp
021e
V. Ex.
TOMBO BC/ 45487
PROC. 16/392/01
C ☐ D ☐
PREC. 11,00
DATA 31/07/01
V.º CPO

CM00158077-7

ATA DA REUNIAO
COMITEE DE AVALIACAO
CURSOS DE GRADUACAO

MICHIKO REGINA OZAKI

**ESTUDO DO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM
RATOS SUBMETIDOS A INFARTO EXPERIMENTAL E TRATADOS
COM INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
E BLOQUEADORES ESPECÍFICOS DOS RECEPTORES AT1**

*Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Mestre em Clínica Médica, Área de
Concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. EROS ANTONIO DE ALMEIDA

Campinas

2001

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

Ozle

Ozaki, Michiko Regina

Estudo do relaxamento dependente do endotélio em ratos submetidos a infarto experimental e tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores específicos dos receptores AT1 / Michiko Regina Ozaki. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Eros Antonio de Almeida

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aorta. 2. Enfarte do miocárdio. 3. Angiotensina. I. Eros Antonio de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

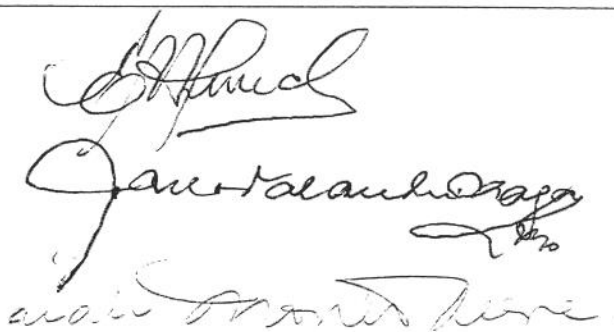
Orientador(a): Prof(a).Dr(a). Eros Antonio de Almeida

Membros:

1. Prof.Dr. Eros Antonio de Almeida

2. Prof.Dr. Antonio Carlos P. Chagas

3. Profa. Dra. Sarah Monte Alegre



Handwritten signatures of the three members of the examination board: Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida, Prof. Dr. Antonio Carlos P. Chagas, and Profa. Dra. Sarah Monte Alegre.

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 26.04.2001

DEDICATÓRIA

*“ A Camila, minha filha, que tem sido
minha companheira e que me dá
forças para as minhas realizações.”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e privilégio de ter, ao meu redor, pessoas que criaram o ambiente favorável à realização deste trabalho.

A meus pais, Kazuichi e Yosie, cuja herança de valores são as guias-mestras da minha vida.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida, meu orientador, pela dedicação, persistência, energia e incentivo, que convergiram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, e para a concretização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Afonso Ribeiro Jorge, que me proporcionou a visualização de novos horizontes e a minha inserção na área médica.

Aos Prof. Drs.

Kleber Gomes Franchini

Gilberto d'Assunção Fernandes

José Antonio Rocha Gontijo

José Francisco Figueiredo

Antônio Carlos P. Chagas

Maria Letícia Cintra

Pela valiosa colaboração no fornecimento das informações, materiais e pelas condições que facilitaram a concretização deste trabalho.

A Maria Madalena de Abreu Rodrigues, técnica do Laboratório onde foi executada a tese, pela valiosa colaboração e amizade sincera.

Às pessoas, que pelo espírito de solidariedade, profissionalismo e apoio, contribuíram

Gisele Clotilde Ferreira

Sérgio Paulo Magalhães

Jorge Airton Cicala

Alexandre Rebac de Paula

Cleonice Nascimento e Silva

Roberto Cesar Stahl

Jamilson Conceição Alves

William Adalberto e Silva

Ana Cristina de Moraes

Fátima Neder

Geralda Dominicianiana de Pádua

Renata Maia

Helymar da Costa Machado

Cleide Aparecida Moreira Silva

Emilton Barbosa de Oliveira

Mário Moreira da Silva

Ilzy Elaine da Silva

Sílvia Auxiliadora de Lúcio

Antônio Carlos da Silva

Yaeko Ozaki

E a todos os colegas e docentes do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Endotélio vascular.....	27
1.2. Síntese do óxido nítrico.....	30
1.3. Secreção e liberação de óxido nítrico.....	31
1.4. Funções do endotélio vascular.....	32
1.5. Disfunção endotelial.....	34
1.6. Reversão da disfunção endotelial.....	37
1.7. O infarto experimental do miocárdio.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Distribuição dos grupos.....	45
2.2. Medicamentos utilizados.....	45
2.3. Dose e administração dos medicamento.....	46
2.4. Indução do infarto do miocárdio.....	49
2.5. Extensão do infarto.....	54
2.6. Estudo da função endotelial.....	56
2.7. Análise estatística.....	58
3. RESULTADOS.....	59
3.1. Peso inicial dos animais.....	61
3.2. Mortalidade dos animais nos diferentes grupos.....	61

3.3. Relaxamento dependente do endotélio.....	61
4. DISCUSSÃO.....	71
5. CONCLUSÕES.....	87
6. SUMMARY.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
Ach	Acetilcolina
AIRE	Acute Infarction Ramipril Efficacy Study
AT1	Inibidores específicos dos receptores de angiotensina
CONSENSUS	Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study
EDCF	Fator de Contração Derivado do Endotélio
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
GISSI-3	Grupo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'I Infarto Miocárdio-3
Gcs	Guanilato-ciclase solúvel
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina.
ISIS IV	International Study of Infarct Survival -4
MHC	Antígenos Complexos de Maior Histocompatibilidade
NO	Óxido Nítrico
RIG	Ratos com Infarto Grande
RIM	Ratos com Infarto Médio
RNN	Ratos Controle
RSS	Ratos Sham
SAVE	Survival of Myocardial Infarction: Long Term Evolution
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio

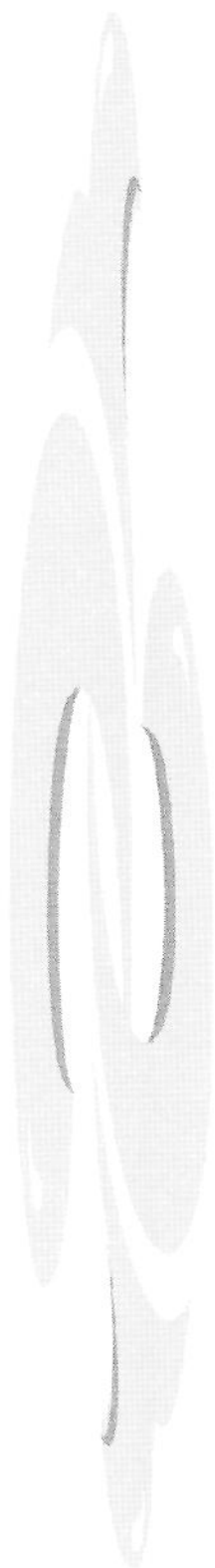
	PÁG.
Figura 1: Foto representando o Registrador Narcotrace 500, transdutor de pressão, utilizados na medida de pressão da cauda.....	47
Figura 2: Exemplifica a montagem da mesa cirúrgica para indução do infarto do miocárdio em ratos.....	50
Figura 3: Demonstração do preparo do animal, anestesia e local de incisão no 4º espaço intercostal esquerdo da abertura do tórax do animal.	50
Figura 4: Demonstração da incisão do 4º espaço expondo o gradeado costal por afastamento da musculatura do tórax.....	51
Figura 5: Demonstração da compressão das costelas, com exposição do coração visualizada pela ponta do ventrículo esquerdo.....	51
Figura 6: Demonstração do local por onde se passa o fio entre o cone da artéria pulmonar e o apêndice atrial esquerdo.....	52
Figura 7: Demonstração, após a ligadura, coração sendo recolocado na cavidade torácica.....	52
Figura 8: Demonstração do coração dentro da cavidade torácica.....	53
Figura 9: Visão da sutura terminal na parede do tórax.....	53
Figura 10: Lâmina demonstrando os locais do VE e do infarto sobre os quais foi aplicada a fórmula matemática para cálculo da área.....	55
Figura 10A: Fotomicrografia demonstrando o infarto do miocárdio. A Necrose de fibras miocárdicas e infiltrado inflamatório.B pormenor da figura anterior onde se observa infiltrado inflamatório agudo , fibrose e tecido de granulação.....	55

Figura 11:	Foto representando o miógrafo de Buchner e do Registrador Narcotrace, no qual foi realizado estudo do relaxamento dependente do endotélio.....	57
Figura 12:	Aorta de rato com 4 mm de comprimento banhado com Krebs e aerado.....	57
Figura 13:	Registro das curvas de concentração efeito com ACH e NPS.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1: Diminuição de pressão sistólica em % dos animais tratados com IECA nas doses de 5, 10 e 20 mg, respectivamente.....	48
Gráfico 2: Diminuição de pressão sistólica em % dos animais tratados com AT1 nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg, respectivamente.....	48
Gráfico 3: Peso dos animais dos grupos RNN, RSS, RIM e RIG.....	63
Gráfico 4: Peso dos animais dos grupos IECAM, IECAG, AT1M e AT1G.....	64
Gráfico 5: Mortalidade imediata nos grupos RI- ratos infartados, RIECA- infartados e tratados com inibidor da enzima conversora de angiotensina e AT1 - infartados e tratados com bloqueadores específicos dos receptores AT1.....	64
Gráfico 6: Mortalidade após 24 horas em animais dos grupos RI, RIECA e AT1.....	65
Gráfico 7: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN e RSS.....	66
Gráfico 8: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN e RIM.....	66
Gráfico 9: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN e RIG.....	67
Gráfico 10: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIM e RIG.....	67
Gráfico 11: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, IECAG e RIG.....	68

Gráfico 12: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, IECAM e RIG.....	68
Gráfico 13: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIG e IEATG.....	69
Gráfico 14: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIM e IEATM.....	69
Gráfico 15: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIM, IECAM e IEATM.....	70
Gráfico 16: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIM, IECAG e IEATG.....	70



RESUMO

O infarto do miocárdio é consequência de grave isquemia do coração, geralmente, causada por placas ateroscleróticas que se alojam nas coronárias e podem gerar trombos. Muito já se conhece sobre este evento, não havendo segredos da sua evolução natural, desde a apresentação clínica até a terapêutica. Entretanto, a repercussão do infarto do miocárdio sobre a reatividade do aparelho circulatório, no que se refere à sua fase recente, ainda se apresenta obscura. A disfunção endotelial ocorre precocemente na aterosclerose e encontra-se presente em uma outra série de patologias, tais como: hipertensão arterial, diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência cardíaca, etc; porém, há controvérsias se o infarto do miocárdio estaria entre elas. Com o intuito de contribuir para o entendimento deste assunto, realizamos este trabalho com os seguintes objetivos: 1) Estudar a função endotelial na vigência do infarto experimental do miocárdio em ratos, em sua fase recente; 2) verificar o efeito do inibidor da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e do receptor específico de angiotensina (AT1) sobre a função endotelial; 3) observar a influência do IECA e do inibidor específico do AT1 na mortalidade dos animais.

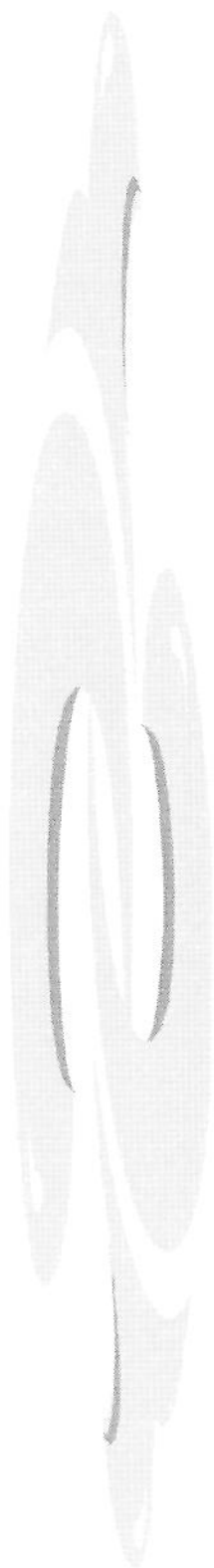
Usou-se 80 ratos wistar machos pesando, entre 350-400 g, os quais foram divididos em oito grupos: grupo controle (RNN), grupo sham (RSS), grupo infarto médio (RIM), grupo infarto grande (RIG), grupo infarto médio e tratado com lisinopril (IECAM), grupo infarto grande e tratado com lisinopril (IECAG), grupo infarto médio tratado com losartan (AT1M) e o grupo infarto grande tratado com losartan (AT1G). O IECA e AT1 escolhidos foram lisinopril e losartan, nas doses de 20 mg/kg/dia e 30 mg/kg/dia, respectivamente, sendo estas doses suficiente para a redução de aproximadamente 25% da pressão arterial confirmada pela medida na cauda dos animais.

Os medicamentos foram administrados através de intubação orogástrica, dois dias antes de se submeterem à cirurgia e continuando por sete dias após o infarto do miocárdio. O infarto foi realizado por ligadura proximal da coronária descendente anterior esquerda, após toracotomia. Os animais operados foram mantidos em gaiolas com água e alimentação "ad libitum" e sacrificados através de inalação com éter etílico. Verificou-se a presença do infarto do miocárdio através da técnica de coloração com TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) a 1% e o estudo histopatológico foi realizado com coloração pela hematoxilina-eosina.

Os infartos foram classificados em médio, quando ocupava de 20 a 40% da área do ventrículo esquerdo, e grande, quando ultrapassava os 40%, sendo os cálculos efetuados sobre as verificações macroscópicas (TTC) e nas lâminas através de fórmula matemática para cálculo da área de um semi-círculo era verificada a porcentagem deste sobre a área total do círculo.

A função endotelial foi estudada em anéis de aorta torácica através de curvas de concentração-efeito, usando-se noradrenalina, acetilcolina e nitroprussiato, com técnica amplamente conhecida para este fim. Verificou-se então a mortalidade nos grupos, a correlação do tamanho do infarto e a ação das drogas na função endotelial. Os animais foram observados todos os dias, anotado o grupo a que pertenciam e o número de óbitos. Os resultados indicam que, para a mortalidade imediata dos animais, não houve diferença significativa entre os grupos infartados, tratados com lisinopril e com losartan, sendo, 17,71%, 23,64% e 12,33%, respectivamente. A mortalidade após 24 horas, foi de 7,59%, 9,52% e 10,94%, respectivamente.

Houve correlação entre o tamanho do infarto e o relaxamento dependente do endotélio, obtendo-se os seguintes resultados: RNN 78,24% $\pm$ 3,57; RSS 40,40% $\pm$ 4,33; RIM 29,29% $\pm$ 6,33; RIG 14,04% $\pm$ 5,20; IECAM 32,69% $\pm$ 4,73; IECAG 48,94% $\pm$ 9,29; AT1M 30,59% $\pm$ 4,65 e AT1G 26,98% $\pm$ 7,80. Ocorreu melhora da disfunção endotelial somente no grupo de ratos infartados de tamanho grande e tratados com lisinopril e losartan. As curvas feitas com nitroprussiato de sódio mostraram-se semelhantes, demonstrando que não ocorreu comprometimento da musculatura lisa. Concluiu-se que: 1) ocorre disfunção endotelial na fase recente do infarto experimental do miocárdio em ratos; 2) tanto o IECA lisinopril, como o inibidor específico dos receptores AT1, melhoraram a disfunção endotelial determinada pelo infarto do miocárdio de grande extensão; 3) na fase recente do infarto experimental do miocárdio em ratos não houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade entre os diferentes grupos.



1. INTRODUÇÃO

1.1. ENDOTÉLIO VASCULAR

O primeiro estudo sobre o endotélio que tem sido publicado data de 1866 e foi feito por Langhans, que descreveu a histologia do endotélio em artéria aórtica com o objetivo de descrever sua morfologia. Baseado nos estudos de Langhans, O' Neil, em 1947, realizou estudos anatômicos de patologia vascular induzida por alterações do fluxo sanguíneo.

Depois de O' Neil, e baseado em seus estudos, outros pesquisadores concluíram que alterações do fluxo sanguíneo modificavam o tônus vascular e hipóteses foram aventadas de que isso ocorria devido à ação de uma substância autacóide produzido localmente. No entanto, até meados do século XX, o interesse pelo endotélio manteve-se exclusivamente anatômico.

A partir da segunda metade do século XX, atenção começou a ser prestada na fisiologia do endotélio. Do antigo conhecimento de que a acetilcolina, sob certas condições, podia induzir relaxamento vascular, em 1966, Jeliffe demonstrou que a acetilcolina produzia relaxamento em tiras de aorta de coelhos pré-contraídas com noradrenalina. Em 1979, Brassani & Vinter, sugeriram que seria possível que as células endoteliais liberassem fatores que poderiam regular, local e sistemicamente, o tônus vascular. Em 1979, Toda estudou os efeitos da acetilcolina em artérias de cães e propôs que a mesma deveria liberar um polipeptídeo vasodilatador.

O marco fundamental do conhecimento referente à fisiologia do endotélio vascular ocorreu em 1980. FURCHGOTT & ZAWADSKI descobriram que a presença do endotélio é o requisito indispensável para o relaxamento das artérias, assim como o relaxamento ocorria na presença de acetilcolina (Ach). Os autores chegaram a essas conclusões estudando anéis e tiras de aorta torácica de coelhos, perfundidos em solução de Krebs Henseleit, aerados com carbogênio, pré-contraídas com Noradrenalina e expostas, posteriormente, à acetilcolina. Foi descrita assim a técnica de avaliação da função endotelial, que é até hoje utilizada. Os autores observaram que a fricção da superfície intimal durante a preparação do tecido impedia o relaxamento do vaso, quando exposto à acetilcolina. (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980b) demonstraram, posteriormente que,

na presença do endotélio, a Ach produzia um relaxamento dependente da dose que não se verificava quando a superfície intimal não estava íntegra. FURCHGOTT & ZAWADSKI contribuíram para a resolução de um antigo paradoxo acerca das ações da Ach, que *in vivo* possuía um potente efeito vasodilatador, mas em algumas preparações vasculares isoladas ao contrário, apresentava um efeito vasoconstritor.

A descoberta de que a acetilcolina age como vasodilatador na presença do endotélio íntegro fez com que as pesquisas em doenças cardiovasculares levassem em conta o papel do endotélio na regulação do tônus vascular. O conceito de que o endotélio era apenas uma simples camada de células achatadas, funcionando como uma barreira entre o sangue e a parede do vaso deixou de existir, atribuindo-se a ele funções, que hoje se sabe são várias, sendo considerado o maior órgão endócrino do organismo.

Após os achados de FURCHGOTT, questionou-se o mecanismo pelo qual a acetilcolina produzia relaxamento vascular na presença do endotélio, aventando-se a existência de um fator relaxante. A possível substância denominou-se, genericamente, de fator relaxante derivado do endotélio, traduzido do inglês *endothelial derived relaxing factor* (EDRF).

Em 1985, COCKS & ANGUS foram capazes de cultivar células endoteliais e instalá-las em um circuito de perfusão, permitindo assim a obtenção de grandes quantidades de EDRF para manipulação bioquímica e farmacológica. Esse fato possibilitou várias descobertas sobre esta substância, tais como a relação entre o relaxamento dependente do endotélio e a elevação de GMP cíclico na musculatura lisa vascular, sua inibição pelo azul de metileno e pela hemoglobina. Descobriu-se que, também, o EDRF podia ser destruído por ânions superóxidos e outros radicais livres, suportando o conceito de que EDRF, por si só, não era um radical. Os autores, através de cultura de células endoteliais injetados em coronária de coelhos descobriram que o EDRF possuía meia-vida de 3 a 6 segundos, sendo descartada a hipótese de que o EDRF poderia ser uma prostaciclina ou outro metabólito semelhante cuja ação é mais prolongada, concluindo que o EDRF é uma agente humoral de curta duração, substância química hidrofóbica, de característica aniônica semelhante ao óxido nítrico, mas sem a confirmação que era o óxido nítrico.

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 uma EDRF (GRIFFITH *et al.*; 1985; RUBANYI *et al.*; 1985) caracterizada como uma substância instável, com meia-vida da ordem de segundos (HENDERSON *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 a hipótese de que o EDRF seria o óxido nítrico (NO), um metabólito final dos nitrovasodilatadores com potente ação estimulante sobre a guanilato-ciclase solúvel (GCs) (DIAMOND & BLISARD, 1976), que apresentava semelhança com o EDRF quanto aos seus efeitos biológicos.

O achado de que ambas as substâncias ativam diretamente a GCs levou a hipótese de que o EDRF poderia ser o NO, ou uma substância precursora lábil, da qual o NO seria imediatamente liberado.

De acordo com pesquisas que evidenciaram que o EDRF e o NO tinham muitas características semelhantes como: liberação pelas células endoteliais, relaxamento da musculatura lisa, inibição da agregação plaquetária, indução de desagregação plaquetária, inibição da adesão plaquetária, estabilidade em 30 segundos, inibição direta por hemoglobina e reação com ânions superóxido e O₂, FURCHGOTT e IGNARRO, em 1988, consideraram que o EDRF era o óxido nítrico. Uma vez descoberta a substância responsável pelo relaxamento vascular dependente do endotélio, outras perguntas foram formuladas, sendo a indagação seguinte sobre como o endotélio produzia o radical. A questão foi respondida com os trabalhos de PALMER e colaboradores, em 1987, que postularam ser a L-arginina a fonte de óxido nítrico. O mecanismo pelo qual a célula endotelial produzia o NO envolvia a metabolização da L-arginina mediada pela enzima óxido nítrico sintetase.

1.2. SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO é sintetizado a partir da oxidação da L-arginina, reação mediada pela NO sintetase Ca^{++} dependente, com formação simultânea de L-citrulina (PALMER *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 NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), a L-NAME (N-nitro-L-arginina, etil ester) e a N-nitro-L-arginina (L-NOARG) que são bloqueadores da NO sintetase (PALMER *et al.*, 1988b).

Como essa inibição ocorre por competição, a adição de grande quantidade de L-arginina reverte o bloqueio da enzima (REES DD *et al.*, 1988), determinado por seus análogos.

A produção endógena de L-arginina, em vasos normais, a partir de outros aminoácidos, é suficiente para conversão máxima em NO, não havendo dependência de L-arginina exógena, como descritos por PALMER *et al.*, 1988; e REES *et al.*, 1988. Os autores verificaram que L-arginina exógena não aumenta o relaxamento dependente do endotélio, quando as células endoteliais estão em meio de cultura deficientes em arginina. Também, em casos de inibição do relaxamento dependente do endotélio por análogos estruturais, a inibição pode ser revertida pela arginina exógena. Esse fato confirma a participação de arginina na gênese do NO (PALMER RMJ *et al.*, 1988; REES DD *et al.*, 1988). Isso tem sido demonstrado pela administração endovenosa de L-arginina (0,1 a 3mM), a qual normaliza agudamente o relaxamento dependente do endotélio na aorta torácica de cobaias hipercolesterolêmicas (COOKS *et al.*, 1991) e também, pela administração intracoronária em pacientes com aterosclerose difusa não-obstrutiva da artéria descendente anterior, indicando melhora do relaxamento dependente do endotélio em artérias coronárias humanas (DUBOIS-RANDÉ *et al.*; 1992).

Os fatos indicam que, embora a arginina exógena não influencia a função endotelial em vasos normais, podem fazê-lo em situações patológicas.

1.3. SECREÇÃO E LIBERAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO é liberado em condições basais e por estímulos a células endoteliais, mantendo a vasculatura em estado de dilatação. 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, o stress da parede vascular e a 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. A liberação fluxo-dependente é provavelmente, de crucial importância na circulação coronária, para perfusão sanguínea miocárdica ótima durante o exercício. Nessas ocasiões, o fluxo coronário pode aumentar até 4 a 6 vezes, sendo necessário para suprir as demandas miocárdicas de oxigênio.

Outros mecanismos contribuem também, para a regulação do tônus arterial coronário como: ação de prostaciclina, estimulação β adrenérgica, metabólitos vasodilatadores e aumento de pressão de perfusão; porém, não parece que desempenham papel significativo no controle da vasodilatação fluxo-dependente em artérias normais (VRINTS G & HERMAN AG.; 1991).

O aumento do stress parietal (shear stress) - relação força/unidade de área em 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 do endotélio (OHESSEN SP *et al.*, 1988). Esse efeito pode ter importância no mecanismo sensor do fluxo pelas células endoteliais (VRINTS & HERMAN, 1991), as quais funcionam também como sensores de oxigênio.

Tais células endoteliais contribuem para regulação local do fluxo sanguíneo, dentro de variações fisiológicas de tensão de O_2 liberando: prostaciclina e PGE_2 (BASSENGE & BUSSE, 1988; VRINTS & HERMAN; 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 de trombo - ADP, serotonina e trombina (BASSENGE & BUSSE, 1988; VANE *et al.*; 1990).

O relaxamento de artérias isoladas induzida pela Ach é o exemplo mais clássico da participação do endotélio neste evento. (FURCHGOTT and ZAWADZKI, 1980a; FURCHGOTT, 1983). Quando a função endotelial está preservada, a Ach, atuando em receptores muscarínicos da membrana da célula endotelial, estimula a liberação de NO por estas e provoca o relaxamento das células musculares lisas vasculares. Em presença de disfunção endotelial, a Ach não induz à vasodilatação e pode desencadear vasoconstricção por ação direta na musculatura lisa (NABEL *et al.*, 1990; McLENACHAN *et al.*, 1991). Assim, a Ach exerce ações distintas e opostas nos vasos sanguíneos: constricção direta da musculatura lisa vascular e vasodilatação indireta mediada pelo endotélio.

1.4. FUNÇÕES DO ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio deve ser considerado como um “órgão” endócrino e metabólico altamente ativo na manutenção de anticoagulação sanguínea e do tônus vascular, liberando, simultaneamente, fatores relaxantes e constritores.

Possui função no metabolismo de substâncias vasoativas, como a conversão da angiotensina I em angiotensina II, cuja conversão é dependente da enzima conversora de angiotensina (ACE) que está localizada na membrana da célula endotelial (PALMER *et al.*; 1997).

Também participa na resposta imune por apresentar, na sua superfície, uma variedade de antígenos, alguns dos quais são expressos apenas após sua ativação. Entre estes estão os antígenos do sistema ABO, os antígenos complexos de maior histocompatibilidade (MHC) de classe I e de classe II. A expressão de várias dessas moléculas pode variar em função do calibre do vaso e do tecido onde ele está localizado

(STUNLOFF *et al.*; 1995). A expressão dessas moléculas, importantes na apresentação de antígenos e na adesão de células do sistema imune ao endotélio, conferem à célula endotelial importância na resposta imune, nos processos inflamatórios e na hemodinâmica. Também apresentam diversas moléculas de adesão, algumas das quais atuam como importantes sinais co-estimulatórios para ativação de linfócitos.

As citocinas e fatores de crescimento produzido pelas células endoteliais são potentes moduladores de uma variedade de funções endoteliais relevantes não apenas no contexto de resposta imunológica, mas também na regulação de fenômenos de hemostasia e trombose. As respostas da célula endotelial a esses fatores inflamatórios solúveis incluem: alteração na expressão de moléculas de adesão, alterações na coagulação e alteração da permeabilidade capilar. Além disso, as células endoteliais podem induzir efeitos nas células da musculatura lisa dos vasos adjacentes a ela.

O endotélio vascular, além de desempenhar importante papel na regulação do tônus vasomotor arterial, também é o principal mediador de dois processos biológicos extremamente importantes na gênese da reestenose arterial: a proliferação de células musculares lisas e o remodelamento vascular. Além de sintetizar fatores estimuladores e inibidores de crescimento celular, o endotélio é responsável pela manutenção da trombo-resistência, impedindo a ativação de plaquetas. O endotélio vascular tem importante papel na modulação da contração miocárdica e do tônus vasomotor coronário, por meio de síntese e do metabolismo de agentes vasodilatadores e vasoconstritores.

A pesquisa sobre o endotélio vascular pode ser considerada relativamente nova uma vez que ocorre, seriamente, há apenas duas décadas. Compreende um campo amplo, fascinante e, dia-a-dia, outras funções do endotélio são descobertas, tornando-se cada vez mais complexa sua atuação na regulação do aparelho cardiovascular.

1.5. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Vários fatores como a idade avançada, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, radicais livres, fumo, diabetes, insuficiência cardíaca e outros são capazes de ocasionar disfunção endotelial.

A liberação de óxido nítrico diminui com o avançar da idade, assim como o aumento do fluxo coronário induzido pela infusão de acetilcolina, fato demonstrado em humanos por ZEIHNER *et al.*;1993. Experimentalmente, em ratos idosos, essas mudanças são vistas com a utilização de agonistas como acetilcolina e cálcio ionóforo. Não se detecta disfunção de receptores muscarínicos ou seu modelo de sinais de transdução, mas são relatados como dependentes da diminuição da atividade de NO sintetase. Também já se demonstrou produção aumentada de endotelinas em ratos idosos (TSCHUDI *et al.*; 1996).

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 & LEUSEN, 1986; VANHOUTTE & LUSCHER, 1987; REES *et al.*,1989; PEARSON *et al.*, 1990). A diminuição do relaxamento dependente do endotélio por ação da Ach, nos modelos de hipertensão arterial genética, 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 *et al.*; 1990; VANE *et al.*; 1990). O aumento da reatividade vascular em vários modelos de hipertensão arterial 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 que a inibição da produção endotelial de NO suprime totalmente o relaxamento dependente do endotélio, em vasos de resistência de ratos com hipertensão renovascular, o que não ocorre em ratos normotensos. Isso 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 *et al.*; 1990). Por outro lado, a produção de um fator de contração derivado do endotélio (EDCF), identificado como um produto da via da ciclooxygenase 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.

O relaxamento dependente do endotélio está reduzido em hiperlipidemias e na aterosclerose.

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese desta são, ainda, controversos. A hipótese mais amplamente aceita é a de que a aterosclerose é uma resposta imune-inflamatória da íntima arterial à agressão, ocasionada pôr fatores extrínsecos, principalmente a hipercolesterolemia (DAVIES & WOOLF, 1993).

Na fase da formação da placa aterosclerótica, há um maior recrutamento de monócitos nas áreas propensas à lesão; porém, em humanos e em animais normocolesterolêmicos, os monócitos têm muito pouco receptores para LDL e, ocasionalmente, aderem-se ao endotélio arterial e penetram na íntima. Os monócitos, na íntima arterial, sofrem ativação e diferenciação celular, transformando-se em macrófagos residentes, processo que está associado às mudanças das suas funções (YIA-HERTUALA *et al.*; 1989; WITZEN, 1993). O excesso da LDL na circulação acarreta maior número de partículas da LDL na região da íntima, geração de células espumosas e disfunção do endotélio arterial, na opinião de STEINBERG *et al.*; 1992.

Ocorre disfunção endotelial na aterosclerose e na sua complicação ocorre infarto do miocárdio. No infarto do miocárdio ocorre obstrução da artéria coronária, promovendo limitação fixa para o fluxo coronário durante o aumento de demanda de O₂, provocando angina. Após um episódio de infarto agudo do miocárdio, a função vasodilatadora da coronária fica comprometida e permanece nisso após trombose.

O relaxamento dependente do endotélio tem sido estudado no homem extensivamente em artéria coronária epicárdica, “in vitro” e “in vivo”.

Em 1986, disfunção endotelial foi encontrada em artéria coronária de humanos com avançada aterosclerose (LUDMER *et al.*; 1996) e, em (UREN *et al.*; 1994) demonstraram que a função vasodilatadora era reduzida em coronária de infartados e no miocárdio normal seguindo infarto do miocárdio. Disfunção endotelial tem sido

demonstrada em pacientes com várias síndromes coronarianas aguda. Embora a disfunção tem sido encontrada além das artérias coronárias comprometidas, reduzindo o fluxo sanguíneo também em artérias normais, verificado em angiografia (REIBER *et al.*; 1985).

A disfunção endotelial é a manifestação inicial no processo aterogênico, sendo decorrente de vários eventos, capacidade de oxidar a LDL e de responder as lipoproteínas oxidadas, produção dos fatores de crescimento, moléculas quimiotáticas e reativas, capacidade de expressar atividade pró-coagulantes e modulação da permeabilidade vascular. Estudos com animais demonstram que a hipercolesterolemia e a aterosclerose induzidas produzidas por dietas produzem anormalidades mais funcionais que anatômicas do endotélio (HARRISON *et al.*; 1994), alterando a função endotelial também na microcirculação (ANDERSON *et al.*; 1995).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome cardiovascular freqüente, afetando grande parte da população em geral, encontrando-se entre as mais letais das síndromes, rivalizando com tumores malignos (TAYLOR *et al.*; 1995).

Admite-se que, na insuficiência cardíaca, as alterações hemodinâmicas e hormonais determinariam a remodelação funcional e estrutural do coração e vascular. Do ponto-de-vista vascular, predomina a vasoconstrição e o aumento da rigidez da parede vascular. O aumento da rigidez vascular adquire importância fisiopatológica, pois acarreta redução da capacitância venosa e o aumento da pré-carga e pós-carga, agravando a redução do trabalho cardíaco. Além do fluxo sanguíneo, a pressão arterial também é determinada pela integração de mecanismos reflexos, humorais e locais (CONHEN *et al.*; 1995).

A insuficiência cardíaca é caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica, que pode, ser em parte, devido ao comprometimento da atividade dos fatores relaxantes derivados do endotélio (KAISER *et al.*; 1989). Esse comprometimento ocorreria em conseqüências das alterações hemodinâmicas e neuro-hormonais presentes nos quadros de insuficiência cardíaca. Tais alterações incluem atividade simpática, atividade colinérgicas, fatores humorais tais como noradrenalina, angiotensina, vasopressina, fatores locais (relaxantes do endotélio, endotelinas, angiotensina II, prostaglandinas e cininas), fatores mecânicos (atividade muscular e termorregulação cutânea) e mecanismos

auto-reguladores (incluindo reflexos mitogênicos e respostas induzidos pelo metabolismo (HIRSCH *et al.*; 1987). O infarto do miocárdio resulta da deficiência total de irrigação sangüínea em áreas do coração. A isquemia provoca dor intensa e imediata causando a morte dos tecidos, num processo que, depois de algumas horas, é irreversível. O tecido necrótico é substituído por tecido cicatricial, quando o infarto não determina a morte do indivíduo.

A placa se rompe por hiperatividade simpática, que aumenta a pressão arterial, a frequência cardíaca e o fluxo intracoronário.

A exposição do endotélio lesado aos elementos figurados do sangue desencadeará a ativação e agregação plaquetária e a ativação de cascata de coagulação com formação do trombo, inicialmente plaquetário (branco) e em seguida completo de plaquetas e fibrina (trombo vermelho). O equilíbrio entre esses fatores protrombóticos e fibrinolíticos endógenos e a extensão da ruptura da placa determinarão a formação de um trombo oclusivo que causa o infarto (FUSTER & LEWIS, 1994).

O aumento do risco de morte por doenças cardiovasculares é maior no inverno do que no verão. Mudanças na temperatura, dias mais longo e dieta têm sido atribuídas, porém, outra possibilidade é que a infecção é um alto fator de risco.

Outros fatores sistêmicos podem também gerar disfunção endotelial, tais como: infecções (TILLET *et al.*; 1993; VOLTANEM *et al.*; 1993), toxinas bacterianas liberadas após cirurgia do abdomen (MAMODE *et al.*; 1995); fumo (RIBEIRO JORGE *et al.*; 1995).

1.6. REVERSÃO DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Procedimentos, direcionados a cada um dos fatores de risco para a disfunção endotelial, mostraram-se eficazes em revertê-la. Assim, em coelhos hipercolesterolêmicos (RIBEIRO JORGE *et al.*; 1994) utilizaram estatinas e verificaram sua eficácia em reduzir a disfunção endotelial, em curto tempo de tratamento. Os mesmos autores também utilizaram anti-oxidantes RIBEIRO JORGE *et al.*; 1998 com resultados semelhantes.

Os inibidores de ECA têm sido aventados para modificar a reversão endotelial e, assim, CACHOFEIRO *et al.*; 1993 e BUIKEMA *et al.*; 1993 obtiveram resultados favoráveis à reversão com inibidor de enzima de conversão da angiotensina no tratamento de hipertensão arterial, assim como para o tratamento de insuficiência cardíaca com ibopamine. Um dos IECA, quinapril, estudado por Mancini *et al.*; 1996, através do ensaio clínico “Trial on Reversing Endothelial Dysfunction (TREND)” revelou atuar em nível endotelial, independentemente de vasodilatação e efeito hemodinâmico. O estudo ocorreu “in vivo”, através da verificação da função endotelial nas coronárias, após 6 meses de tratamento.

O trabalho de Mancini demonstrou que a inibição da angiotensina II atenua a contração da musculatura lisa e a geração de ânions superóxido. Isso ocorre através da estimulação do sistema de oxidases NADH/NADPH na musculatura lisa, levando a menor inativação do óxido nítrico.

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina foram investigados, visando, primeiramente, o tratamento da hipertensão arterial. A partir da década de 80, essas drogas apresentaram ações que melhoraram os efeitos deletéricos da insuficiência cardíaca, como demonstraram estudos clínicos de grande porte (SOLVD, SAVE, AIRE). Tais estudos, envolvendo grande número de pacientes com disfunção ventricular, pós-infarto do miocárdio, concluíram haver redução significativa da mortalidade em consequência do tratamento com IECA.

Recentemente têm sido utilizadas no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio, drogas capazes de inibir seletivamente a produção de angiotensina. O mecanismo ocorre pelo bloqueio específico do receptor AT1 ao qual se liga a angiotensina II. Esse bloqueio seletivo permite a atuação apenas no mecanismo renina-angiotensina-aldosterona, o qual não é possível quando ocorre a inibição pela enzima de conversão.

Os efeitos hipensores do IECA dependem, não só de sua intervenção direta sobre a geração de angiotensina-II (GAVRAS *et al.*; 1974; Mc AREAVY *et al.*; 1990), mas também da não-degradação de cininas vasodilatadoras e peptídeos inativos (ERDÜS *et al.*; 1990). Contudo, tais efeitos parecem ser mais complexos e relacionam-se a mecanismos dos quais eventualmente participa o endotélio.

Outras drogas têm se mostrado eficazes em reverter a disfunção endotelial, tais como: Vitamina-E (RIBEIRO JORGE *et al.*; 1998) e anti-oxidantes (RIBEIRO JORGE *et al.*; 1997).

Com a possível atuação dos IECA e IEAT1, sobre o endotélio vislumbra-se uma nova aplicação dessa classe de drogas, ampliando o horizonte para sua indicação terapêutica.

1.7. O INFARTO EXPERIMENTAL DO MIOCÁRDIO

O infarto experimental do miocárdio constitui uma metodologia que possibilita estudos em todos os aspectos do evento, incluindo: mecanismos fisiopatológicos, manifestações clínicas e patológicas, assim como a terapêutica, promovendo um conhecimento prévio a utilização de procedimentos posteriores em humanos.

Em 1937, Grassi iniciou estudos em infarto experimental, utilizando cães como modelo, eles possuem circulação coronária similar à dos humanos e também é conveniente para cirurgia torácica. O experimento foi feito através de ligadura da coronária descendente anterior com o objetivo de saber em quantos dias ocorreria o infarto e o tempo de sobrevivência dos animais. Em 1946, Heimbürger utilizou ratos como modelo experimental, induzindo o infarto do miocárdio pelo mesmo método de Grassi. O objetivo do estudo foi semelhante, ou seja, verificar se a ligadura da coronária descendente anterior determinava o infarto. Todavia, foi Olson e Johns, em 1954, que pormenorizadamente abordaram o assunto estudando em ratos, hamsters e porcos-da-índia. O rato, entretanto, foi o animal que se encontrou mais adequado, por apresentar certas peculiaridades, como: não possuir artéria circunflexa verdadeira, as artérias são terminais e raramente se anastomosam, o que facilita a indução da isquemia miocárdica. Além disso, são animais de pequeno porte, fáceis de serem obtidos e manuseados, são muito resistentes à agressão cirúrgica e desenvolvem o infarto rapidamente. Ao longo do tempo, a técnica foi recebendo modificações, com o objetivo de diminuir a mortalidade dos animais. No entanto, o sucesso da operação é baixa, sendo que, apenas 49% dos animais, desenvolvem o infarto, embora a

ligadura aconteça sempre no mesmo local. Também o tamanho do infarto varia apesar da técnica adequada. Em 1997, inovações propostas por Ye *et al.*, compreendendo anestésico diferente, intubação orotraqueal, ventilação mecânica, ligadura da coronária utilizando microscópio, drenagem torácica e cuidados intensivos no pós operatório, conseguiram reduzir em muito a mortalidade imediata, assim como variações na dimensão do infarto.

O modelo experimental em rato tem-se prestado ao estudo com drogas que visam diminuir as conseqüência do infarto, como: hipotensão arterial, arritmias (LYNCH *et al.*; 1999), insuficiência cardíaca, a grande mortalidade imediata (UNDERWOOD *et al.*; 1997) e o remodelamento ventricular (SPINAR *et al.*; 2000).

Dentre os estudos experimentais utilizando drogas, com o fim de minimizar as conseqüências graves do infarto do miocárdio, salientaram-se os de PFEFFER *et al.*; 1985, 1988, que abordaram a influência dos IECA na redução da mortalidade, remodelação ventricular e extensão do infarto. Os resultados positivos que os IECA proporcionaram motivou a comunidade científica para ensaios clínicos com os IECA pós-infarto do miocárdio. Assim, a partir de 1987, o projeto SAVE iniciou uma serie de estudos a longo prazo, que colocaram o IECA definitivamente dentro da estratégia terapêutica do infarto do miocárdio.

A partir de 1993, o infarto experimental do miocárdio, sendo o rato como modelo experimental, passou a fazer parte da linha de pesquisa do Laboratório de Estudos em Endotélio, Lípides e Aterosclerose do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental/FCM/UNICAMP. Os primeiros trabalhos visaram a padronização de técnica (ALMEIDA e col.; 1993 e ALMEIDA e col.; 1994), assim como a repercussão de diferentes representantes dos IECA na mortalidade e dimensão do infarto. Por não serem muitos os estudos envolvendo o infarto do miocárdio e disfunção endotelial, e ainda existirem controvérsias em vários aspectos deste assunto, resolveu-se avaliar esse tema no Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose.

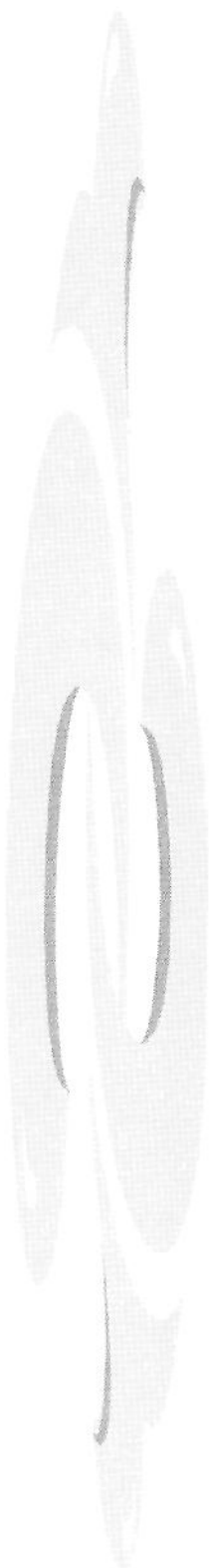
OBJETIVOS

Geral

Avaliar a função endotelial na vigência do infarto experimental do miocárdio em sua fase recente, em ratos.

Específicos

- Estudar o efeito dos inibidores de enzima de conversão da angiotensina na função endotelial da aorta de ratos infartados ;
- estudar o efeito dos inibidores específicos dos receptores AT1 da angiotensina na função endotelial da aorta de ratos com infarto do miocárdio;
- verificar o efeito dos inibidores da enzima conversora de angiotensina e inibidores específicos dos receptores AT1 na mortalidade dos animais com infarto experimental do miocárdio;



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Para o presente estudo, utilizou-se ratos machos, da linhagem wistar, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com idade de 16-20 semanas, pesando entre 350-400g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (em número de 5 animais por gaiola), no biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, com 12 horas de período diurno (das 7 horas às 19 horas) e com 12 horas de período noturno (19 horas às 7 horas) mantidos artificialmente. Os animais serviam-se “ad libitum” de água e ração própria adquirida da Purina (fabricante da ração).

Estudou-se 80 ratos, divididos em 8 grupos:

Grupo controle (RNN): 10 ratos normais

Grupo sham (RSS): 10 ratos em que se transpassou o fio sob a coronária, mas sem dar nó.

Grupo infarto médio (RIM): 10 ratos infartados

Grupo infarto grande (RIG): 10 ratos

Grupo infarto médio e tratado com lisinopril (IECAM): 10 ratos

Grupo infarto grande e tratado com lisinopril (IECAG): 10 ratos

Grupo infarto médio e tratado com losartan (IEATM): 10 ratos

Grupo infarto grande e tratado com losartan (IEATG): 10 ratos

2.2. MEDICAMENTOS UTILIZADOS

O inibidor da enzima de conversão utilizado foi o lisinopril, um análogo do enalapril, com ação prolongada por 24 horas após administração de uma única dose. O lisinopril sofre absorção lenta e incompleta (30 minutos após administração oral), as

concentrações máximas no plasma são obtidas dentro de 6 a 8 horas, sendo metabolizado pelo fígado. O lisinopril é depurado na forma intacta pelo rim, sendo sua meia-vida no plasma de cerca de 12 horas (ARMAYOR *et al.*; 1988; LANCASTER *et al.*; 1988; GASRAGLAV *et al.*; 1988).

O inibidor específico dos receptores AT1 da angiotensina utilizado foi o losartan que é um fenil tetrazólio de peso molecular baixo não peptídeo e ativo por via oral, sendo uma pró-droga. Apresenta atividade prolongada, podendo ser administrado a cada 24 horas. (BAUER *et al.*; 1995 e JOHNSTON *et al.*; 1995).

2.3. DOSE E ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Sendo a ação mais conhecida dos inibidores da enzima de conversão e inibidores dos receptores AT1 a capacidade em diminuir a pressão arterial, baseado neste fato utilizou-se a pressão arterial como um bom parâmetro de que os medicamentos estejam atuando. Em sendo assim, encontrou-se na literatura que as doses de 20 mg/kg/dia de lisinopril e 30 mg/kg/dia de losartan eram eficazes em baixar a pressão arterial em ratos, como verificado por (ZORNOFF *et al.*; 1997 e GOHLK *et al.*; 1996)

Em um grupo de animais utilizou-se estas doses por 2 dias antes da indução do infarto e verificou-se que elas foram capazes de reduzir a pressão arterial em $15,68\% \pm 3,53$ e $14,14\% \pm 3,77$, respectivamente para o lisinopril e losartan. Esse tempo foi o preconizado para o estudo. Em outros animais utilizamos doses a partir de 5 mg/kg/dia para o lisinopril e 5 mg para o losartan, sendo que percentagem de redução da pressão arterial foi proporcional às dosagens utilizadas (gráficos 1 e 2).

A metodologia para indução da pressão arterial foi a plestimografia de cauda (BYRON & WILSON, 1938), a qual preconiza o aquecimento do rato dentro de uma câmara fechada dividida em 3 compartimentos: um deles com luz, outra para o animal e outro com termômetro para controlar a temperatura da caixa, que não pode ultrapassar a 50°C. A câmara é mantida aquecida por 20 minutos e após, o animal é colocado e deixado por 10 minutos dentro do compartimento. Esse tempo é suficiente para ocorrer a

vasodilatação da artéria caudal e assim possibilitar melhor ausculta do movimento do sangue. A pressão arterial é, então, medida com manguito e transdutor de pressão com amplificador. (Fig. 1)

Os medicamentos foram cedidos gentilmente pelo laboratório Zêneca Farmacêutica do Brasil (Cotia SP) e pela Biossintética LTDA (Taboão da Serra).



Figura 1: Foto representando o Registrador Narcotrace 500, caixa de aquecimento, transdutor de pressão, utilizados na medida de pressão da cauda.

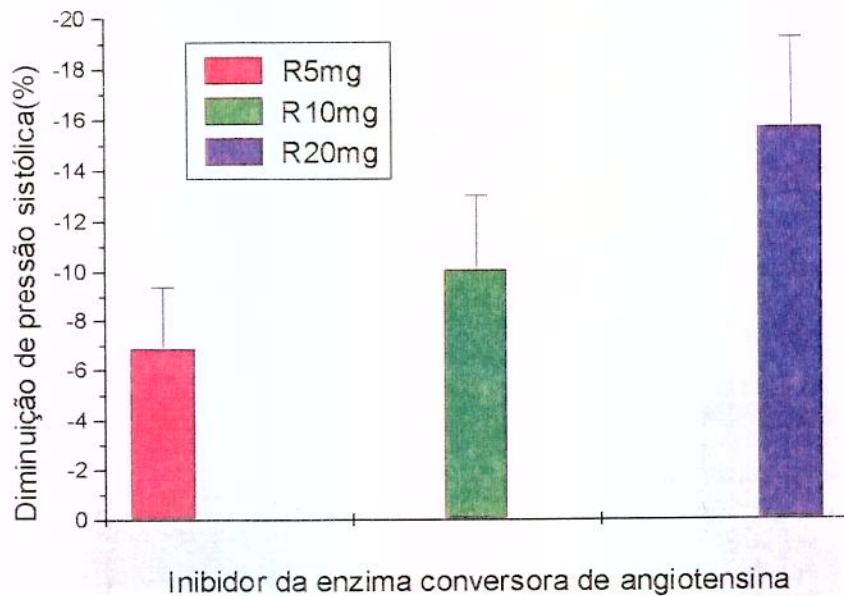


Gráfico 1: Diminuição de pressão sistólica em % dos animais tratados com IECA nas doses de 5mg, 10mg e 20 mg, respectivamente.

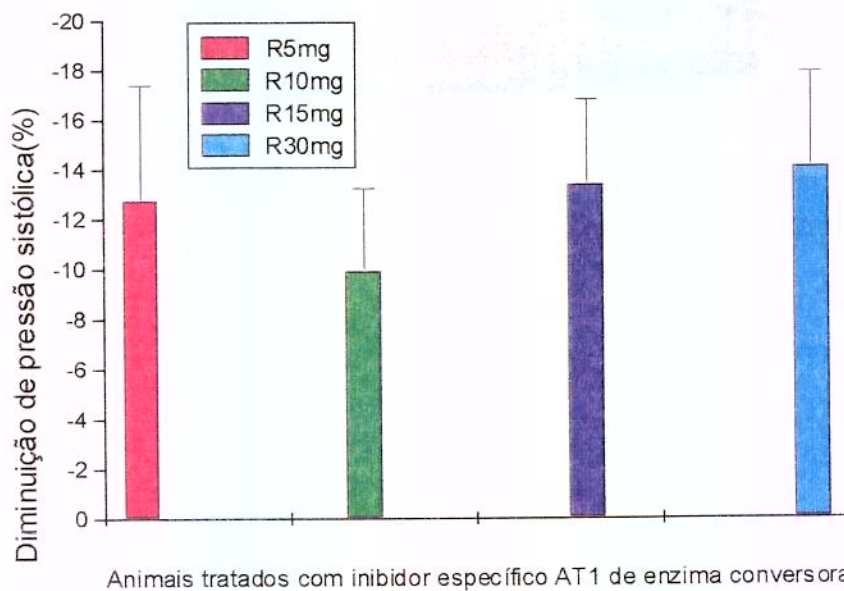


Gráfico 2: Diminuição de pressão sistólica em % dos animais tratados AT1 nas doses de 10, 20 e 30 mg, respectivamente.

2.4. INDUÇÃO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

O infarto do miocárdio foi induzido pela ligadura da coronária descendente anterior, segundo a técnica preconizada por JOHNS e OLSON, 1954. Os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico (CHEMCO Indústria e Comércio LTDA, Campinas), imobilizados e efetuada incisão no 4º. espaço intercostal esquerdo, afastado uma costela da outra com auxílio de um pequeno afastador. (fig 2, 3, 4). O tórax era levemente comprimido com o polegar e o indicador, para que o coração fosse retirado da cavidade torácica (fig.5 e 6). A ligadura da coronária descendente anterior era realizada com fio 4.0 de surgilene (fig. 7 e 8), entre o cone da artéria pulmonar e o apêndice atrial esquerdo. Após, o coração era rapidamente colocado dentro da cavidade torácica e o tórax suturado com fio algodão 3.0 (fig. 9). Nos animais que serviram como controle sham, uma ligadura fictícia era realizada, no qual o fio era passado na mesma região, mas não era amarrado. O restante do procedimento era idêntico aos animais de estudo. Após a cirurgia, os ratos eram colocados em suas gaiolas, com alimentação e água “ad libitum”, ficando em observação por 24 horas dentro do laboratório. Depois de 24 horas, os animais eram transferidos para o biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

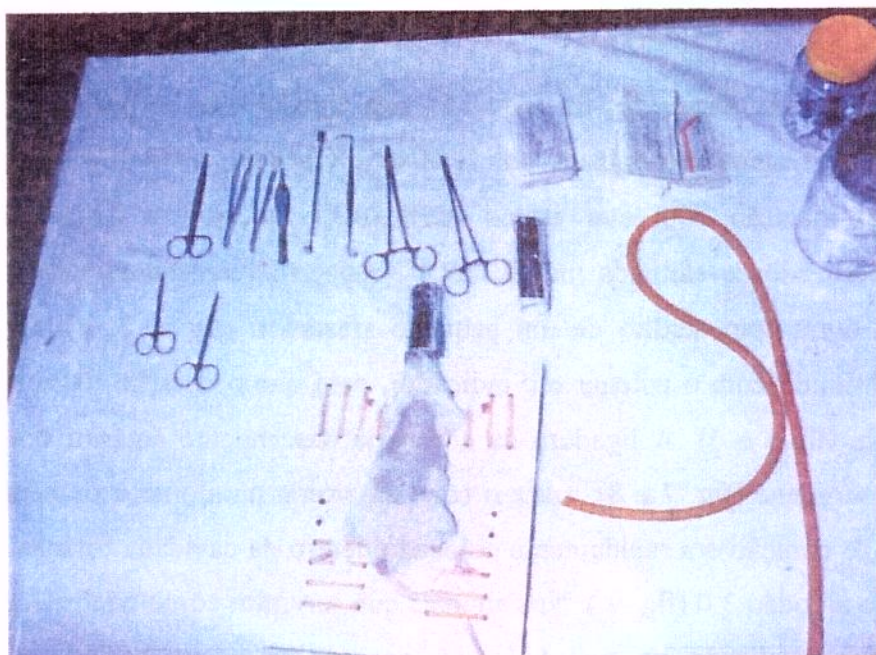


Figura 2: Exemplifica a montagem da mesa cirúrgica para indução do infarto do miocárdio em ratos.

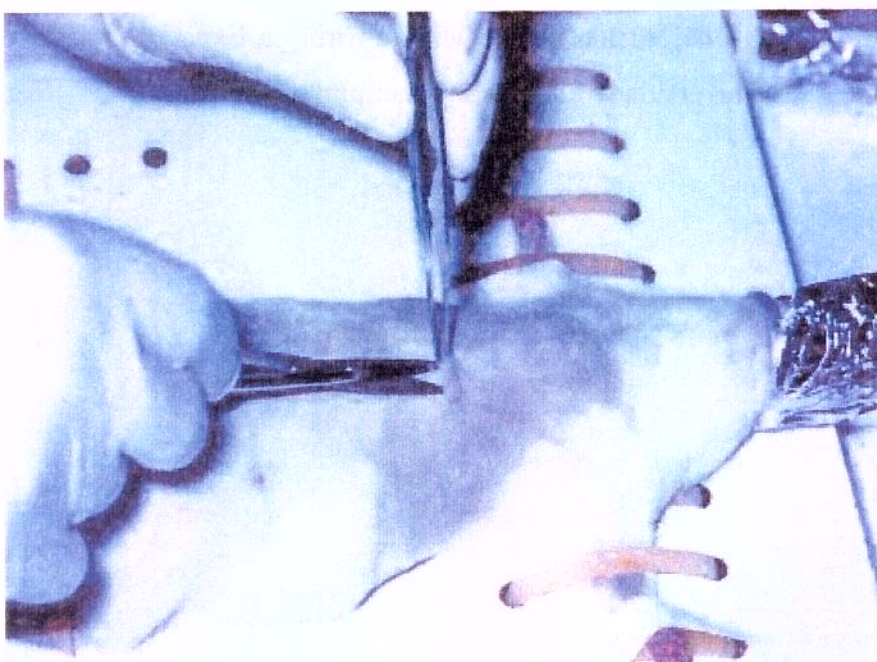


Figura 3: Demonstração do preparo do animal, anestesia e local de incisão no 4º espaço intercostal esquerdo da abertura do tórax do animal.

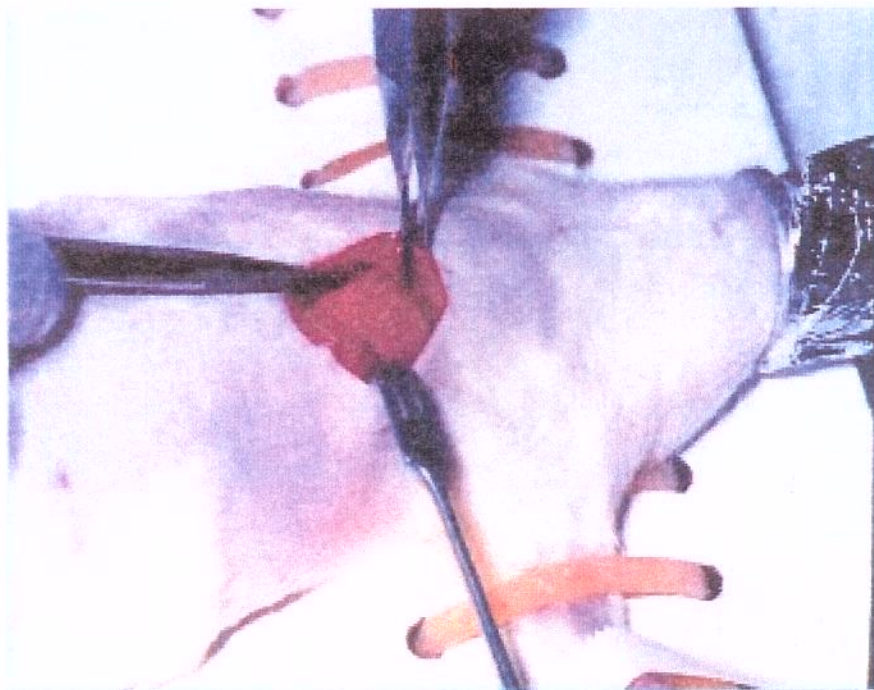


Figura 4: Demonstração da incisão no 4º espaço expondo gradeado costal por afastamento da musculatura do tórax.

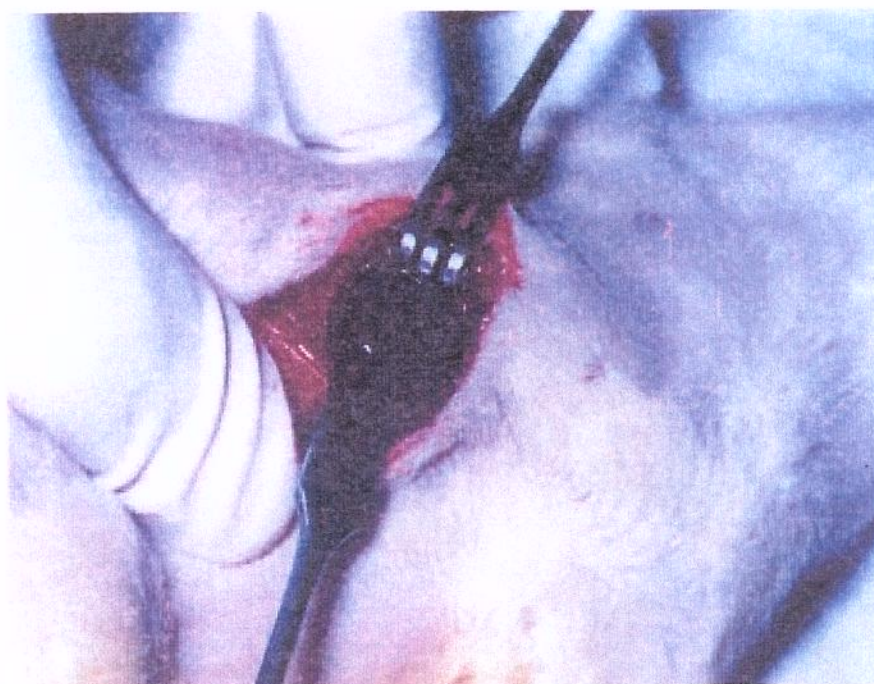


Figura 5: Demonstração com exposição do coração visualizado pela ponta do ventrículo esquerdo.

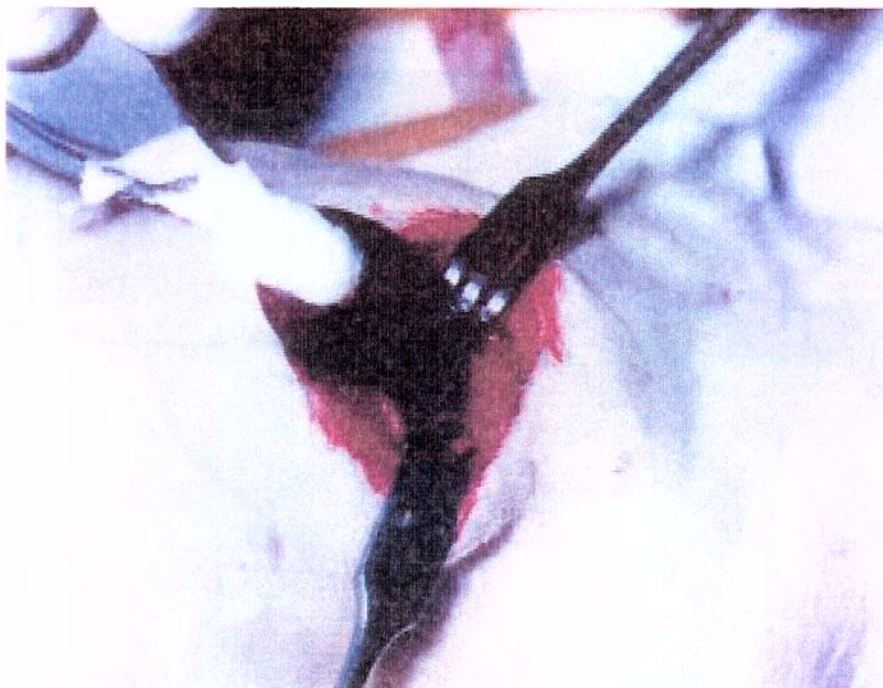


Figura 6: Demonstração do local por onde se passa o fio entre o cone da artéria pulmonar e o apêndice atrial esquerdo.

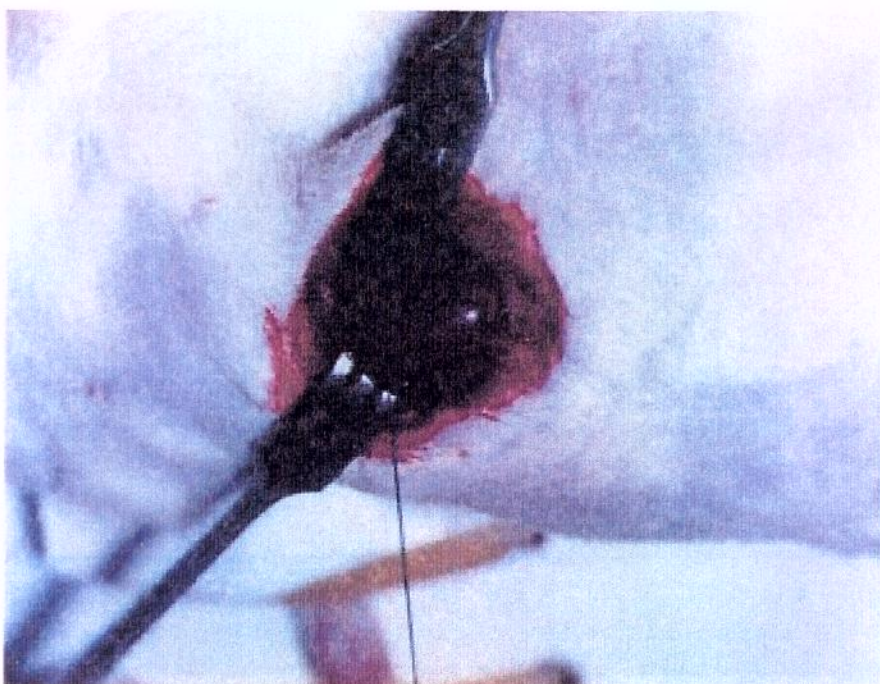


Figura 7: Demonstração, após a ligadura, o coração sendo recolocado na cavidade torácica.

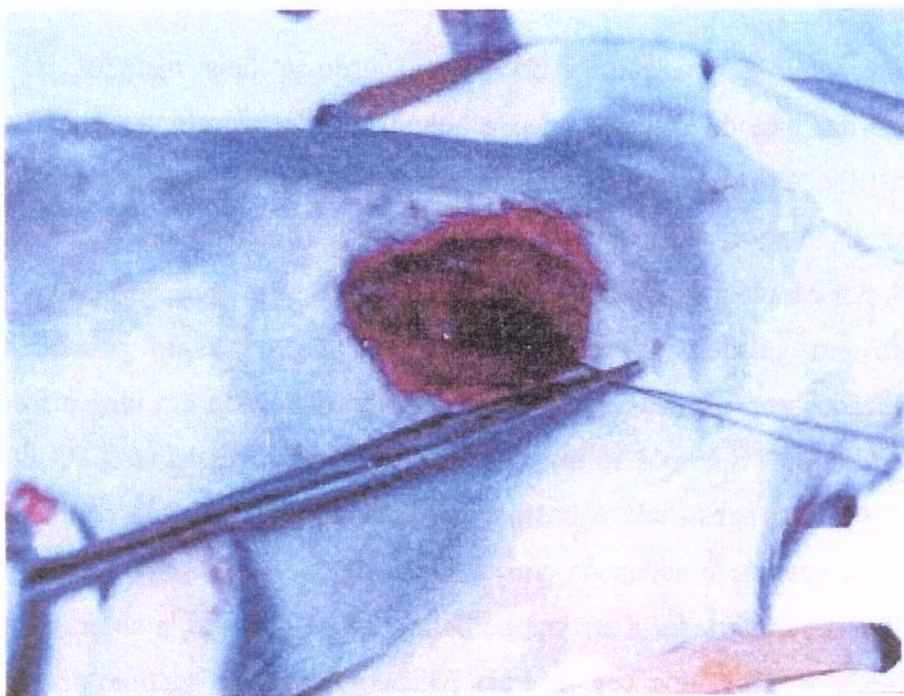


Figura 8: Demonstração do coração dentro da cavidade torácica.



Figura 9: Visão da sutura terminal na parede do tórax

2.5. EXTENSÃO DO INFARTO

Para medir-se a extensão do infarto, usou-se dois métodos. O primeiro constituiu-se de um método macroscópico a coloração com cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) (FISHBEIN, 1981), aplicado em 4 cortes do coração perpendiculares ao septo interventricular, da base a ponta do órgão. Para conseguir cortes simétricos, injetava-se gelatina a 50% por cânula inserida no ventrículo esquerdo, através da aorta. O coração era então resfriado em geladeira, para solidificação do gel e, assim possibilitar cortes uniformes, realizados com lâmina de bisturi. O TTC era colocado em uma placa de petri, aquecido em estufa a 37°C e após 15 minutos, os cortes eram imersos no TTC. O princípio da coloração com esta substância é baseado no fato de que miócitos com presença de atividade de desidrogenase e adequada concentração de cofator NADH reduz o indicador da coloração. Na área infartada, a enzima perde a atividade. Assim, a coloração vermelha desaparece, dando lugar a uma cor amarelo pálida. O segundo método utilizado foi a microscopia. Após a verificação ao TTC, os fragmentos foram fixados em formol a 10%, envolvidos em blocos de parafina, retirados fragmentos em micrótomo (Spencer-820 American Corp.) e corados com hematoxilina-eosina. As lâminas histológicas foram preparadas no Laboratório de Patologia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental. A partir dos cortes histológicos montados entre lâmina e lamínula eram delimitadas as áreas do ventrículo esquerdo e do infarto. Para o cálculo da área infartada e total do VE usou-se o método matemático em que a fórmula para o cálculo da área do círculo e de um segmento deste foi utilizado, calculando-se após, a porcentagem que a área infartada correspondia em relação ao total do ventrículo. Para facilidade de aplicação do método, as lâminas foram xerocadas e os cálculos realizados sobre o papel (figura 10). Considerou-se infarto médio, quando a área infartada correspondia de 20 a 40% da área total do VE e infarto grande, quando esta área ultrapassava os 40%.

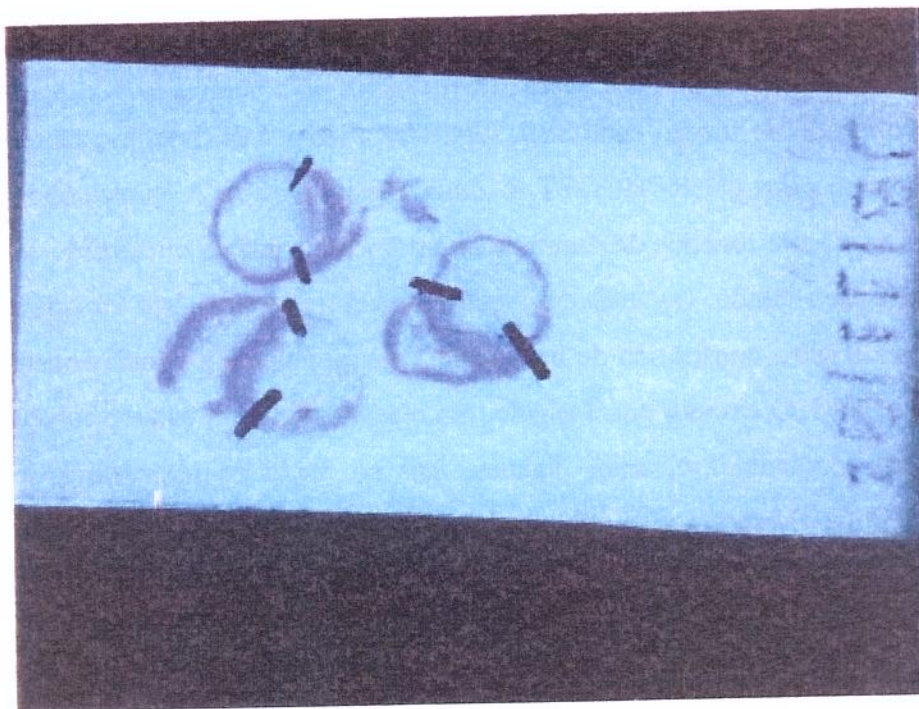


Figura 10: Xérox da lâmina demonstrando os locais do ventrículo esquerdo e do infarto sobre os quais foi aplicado a formula matemática para cálculo da área.

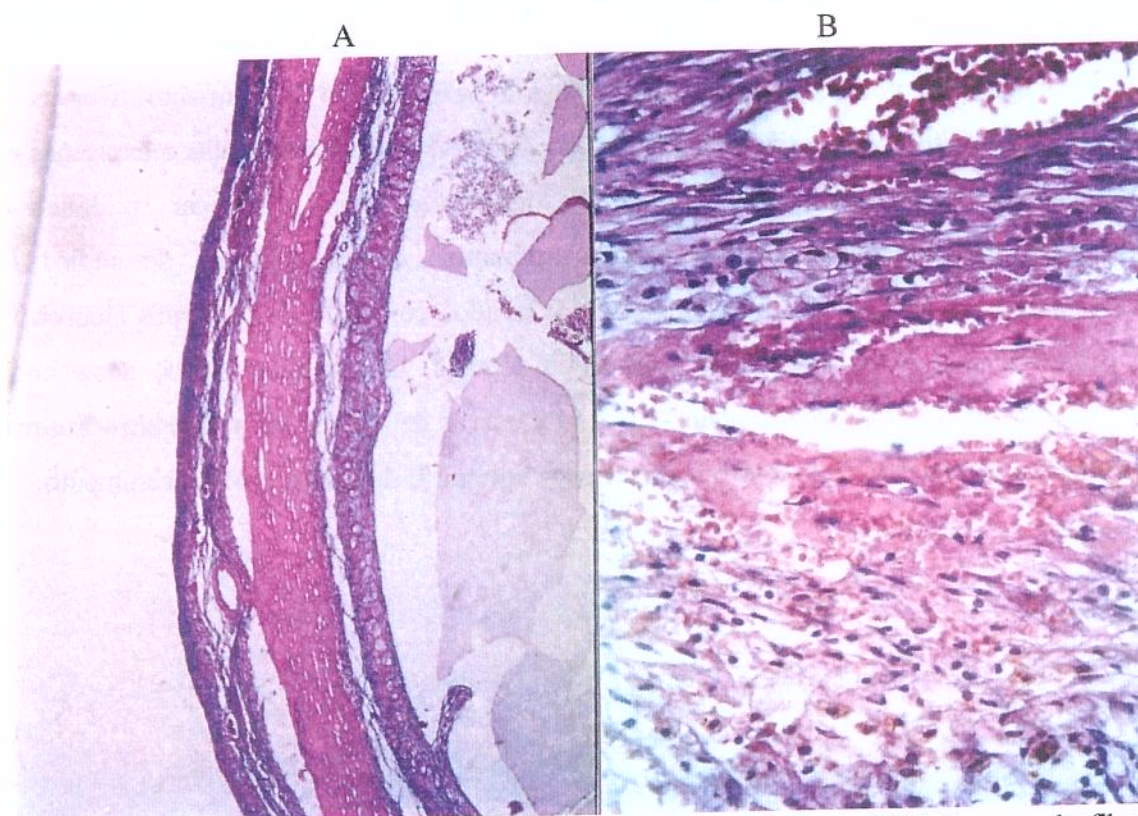


Figura 10 A: Fotomicrografia demonstrando o infarto do miocárdio A (X5) Necrose de fibras miocárdicas e infiltrado inflamatório. B(X40) Pormenor de A, onde se observa infiltrado inflamatório agudo, necrose, fibrose e tecido de granulação

2.6. ESTUDO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

No estudo da função endotelial, seguiu-se a técnica de obtenção de curvas dose resposta com acetilcolina (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). A técnica compreende o estudo de anéis de aorta torácica de 4 mm de comprimento, limpos e cuidando-se para que o endotélio não fosse lesado. Os anéis eram suspensos entre alças de aço inoxidável, dentro de um sistema de vidro constituído de uma dupla câmara por onde circula constantemente água mantida a 37°C. O circuito era fechado, em reservatório com volume constante de 10 ml. As alças de aço inoxidável eram ligadas, uma ao fundo do reservatório e outra ao transdutor de força (Narcotrace F-60), sendo aplicada força de 1g ao anel de aorta. A contração e o relaxamento foram registrados (Registrador Narcotrace 40) (fig. 11 e 12). Os anéis foram banhados em solução de Krebs Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 113; NaHCO₃ 25; MgSO₄.7 H₂O 0,44; CaCl₂ 1,9; EDTA 0,03; KCl 4,4; KH₂PO₄ 1,18; Glicose e foram aerados, continuamente, com carbogênio na composição de 95% O₂ e 5% CO₂. Após uma hora, com troca a cada 20 minutos da solução de Krebs Henseleit, foi feita a contração do anel de aorta, utilizando-se 10^{-7.0} M de noradrenalina, deixando-se agir por 10 minutos. Após, é aplicada acetilcolina e verificado o relaxamento. Curvas de concentração-efeito com acetilcolina (10^{-8.0} M a 10^{-6.0} M) foram realizadas e expressas em porcentagem. Para verificar a integridade da musculatura lisa e confirmar o déficit de relaxamento depende do endotélio lesado, utilizou-se o nitroprussiato de sódio. Tal procedimento foi realizado após os anéis serem lavados com solução de Krebs Henseleit e até atingir-se um novo equilíbrio, com troca a cada 15 minutos. Após, nova curva concentração-efeito com noradrenalina 10^{-7.0} M e curvas de relaxamento com nitroprussiato de sódio (10^{-8.0} M a 10^{-6.0} M) foram realizadas. A figura 13, demonstra tal procedimento.

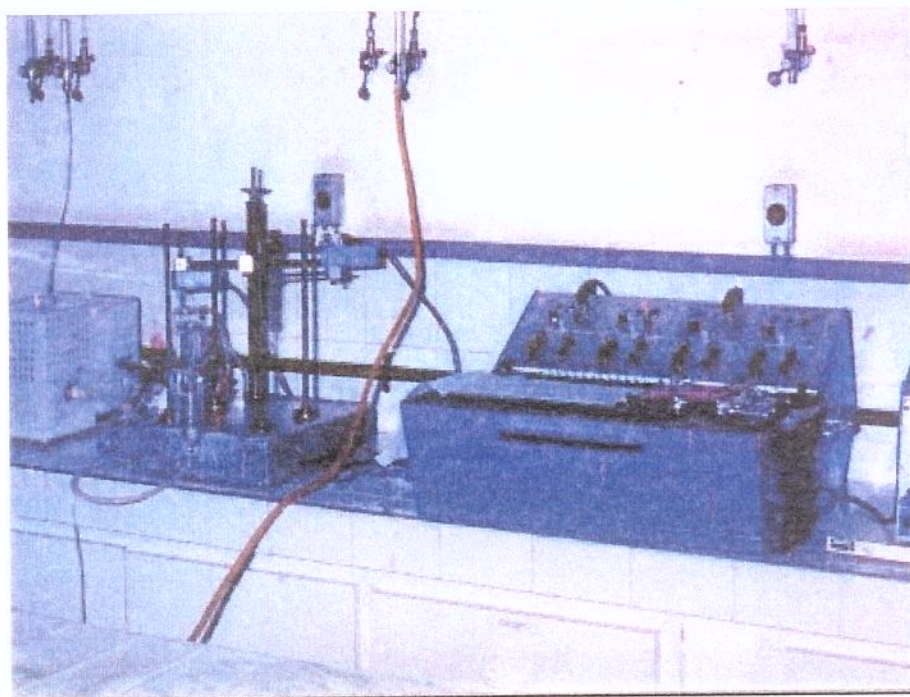


Figura11: Foto representando o miógrafo de Buchner e do Registrador Narcotrace, no qual foi realizado estudo do relaxamento dependente do endotélio.

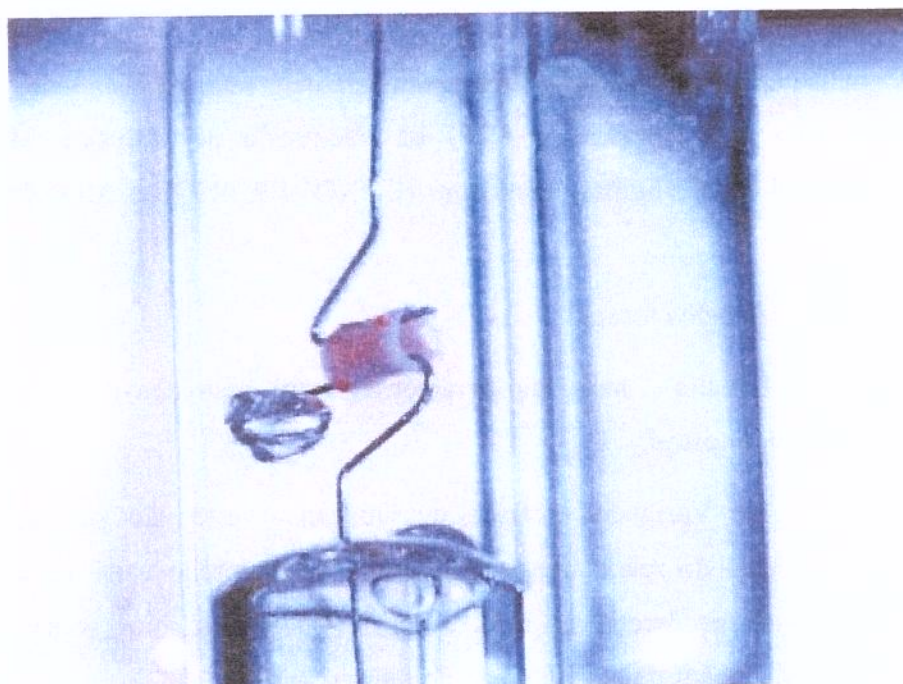


Figura12: Aorta de rato com 4mm de comprimento. banhado com Krebs e aerado.

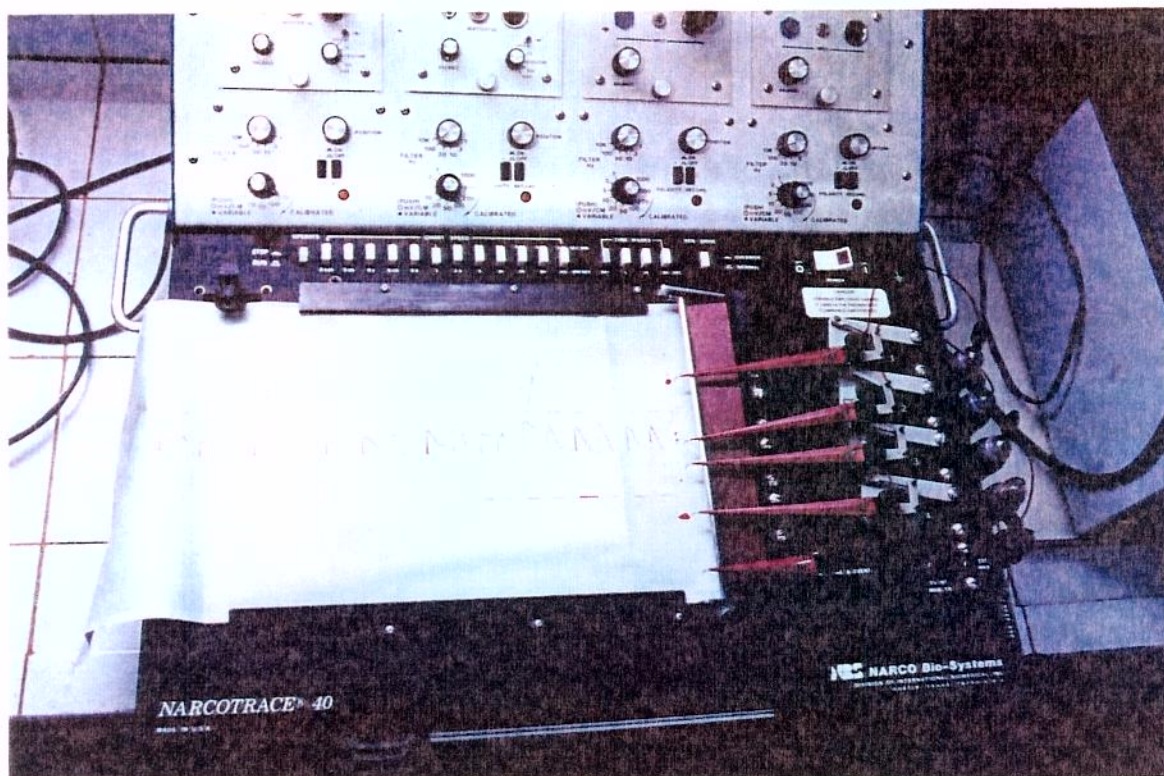


Figura 13: Registro das curvas de concentração efeito com ACh e NPS

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi orientada e realizada pelo setor de Estatística do Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa (FAEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, conforme (CONOVER, 1971 e MONTGOMERY 1991)

Os testes utilizados foram:

- 1) Kruskal-Wallis – teste não-paramétrico para peso dos ratos em vista do tamanho amostral;
- 2) Análise de Variância e Teste de Duncan - teste não paramétrico para comparação do relaxamento dependente do endotélio entre os oito grupos com medidas repetitivas para experimento fatorial, por serem utilizadas diferentes doses de acetilcolina no mesmo animal.
- 3) Qui-Quadrado – teste não paramétrico para verificação da mortalidade entre os animais.

3. RESULTADOS

3.1. PESO INICIAL DOS ANIMAIS

Em relação ao peso dos animais, apenas o grupo IECAM apresentou peso maior em relação aos demais. A diferença foi estatisticamente significativa e encontra-se apresentada nos gráficos 3 e 4.

3.2. MORTALIDADE DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES GRUPOS

Os resultados em relação à mortalidade dos ratos estão apresentados nos gráficos 5 e 6. A mortalidade imediata, isto é, nas primeiras 24 horas, dos animais infartados e não tratados foi de 17,71%. Nos animais infartados e tratados com IECA foi de 23,64% e naqueles tratados com IEAT1 foi de 12,33%. Não houve diferença estatística significativa entre os 3 grupos, conforme demonstrou o teste do Qui-quadrado ($p > 0,05$). A mortalidade tardia, considerada após 24 horas, foi de 7,59% nos infartados não tratados, nos infartados e tratados com IECA foi de 9,52% e naqueles tratados com IEAT1 foi de 10,94%. Não se detectou diferença estatística significativa, quando estes foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado ($p > 0,05$).

3.3. RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

As curvas de concentração efeito de Ach obtidas de anéis de aorta após pré-contracção com noradrenalina $10^{-7.0}$ M apresentaram as seguintes tensões iniciais nos vários grupos e pode ser vistos na tabela 1, não havendo diferenças significativas nos oito grupos estudados.

RATOS	% RELAXAMENTO	TENSÃO
RNN	78,24% $\pm$ 3,57	1,38 $\pm$ 0,14
RSS	40,40% $\pm$ 4,33	1,44 $\pm$ 0,25
RIM	29,29% $\pm$ 6,33	1,57 $\pm$ 0,30
RIG	14,04% $\pm$ 5,20	1,54 $\pm$ 0,36
IECAM	32,69% $\pm$ 4,73	1,28 $\pm$ 0,36
IECAG	48,94% $\pm$ 9,29	1,39 $\pm$ 0,38
ATIM	30,59% $\pm$ 4,65	1,30 $\pm$ 0,36
ATIG	26,98% $\pm$ 7,80	1,46 $\pm$ 0,36

Os resultados do relaxamento dependente do endotélio expressos em % também estão representados na tabela 1. Os resultados também estão expressos na forma de gráficos, para melhor facilitar a visualização das médias dos relaxamentos (gráficos 7, 8, 9 e 10), de formas separadas.

No gráfico 7, observou-se que houve um menor relaxamento dependente do endotélio nos ratos sham ($40,04\% \pm 4,33\%$) em relação aos ratos normais, ($78,24\% \pm 3,57$), sendo estatisticamente significantes.

No gráfico 8, observou-se um menor relaxamento dependente do endotélio nos ratos com infarto médio ($29,29 \pm 6,33$) em relação aos ratos normais ($78,24\% \pm 3,57$), sendo estatisticamente significativa.

No gráfico 9, observou-se um menor relaxamento dependente do endotélio os ratos com infarto grande ($14,04\% \pm 5,20$) em relação aos ratos normais ($78,24\% \pm 3,57$), sendo estatisticamente significativa.

No gráfico 10, todos os grupos estão representados, possibilitando uma visão global dos resultados.

Os resultados dos animais apresentando infarto médio (RIM) e tratados com lisinopril (IECAM) estão expressos no gráfico 11. O relaxamento de $32,69\% \pm 4,73$, foi semelhante ao grupo não tratado (RIM), não havendo diferenças estatísticas entre os grupos.

Os resultados dos animais apresentando infarto grande (RIG) e infartados e tratados com lisinopril (IECAG) estão expressos no gráfico 12. O relaxamento de $48,94 \pm 9,29$ foi maior do que no grupo com infarto grande (RIG), sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Comparando o relaxamento dependente do endotélio entre os animais com infarto médio (RIM) e aqueles com infarto médio e tratados com losartan (ATM1), expressos no gráfico 13, nota-se não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Comparando os relaxamentos máximos entre os animais com infarto grande e aqueles tratados com losartan (ATG1) notou-se diferença estatística significativa entre os grupos. Os resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 14.

Comparando os resultados dos ratos com infarto médio (RIM) sem tratamento e aqueles tratados com lisinopril (IECAG) e com losartan (ATM1), verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa (gráfico 15).

Comparando os resultados dos ratos com infarto grande (RIG) não tratados e aqueles tratados com lisinopril (IECAG) e com losartan (ATG1), verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados e não tratados e entre os tratados com IECAG($48,94 \pm 9,29$ e AT1G $26,98 \pm 7,80$)

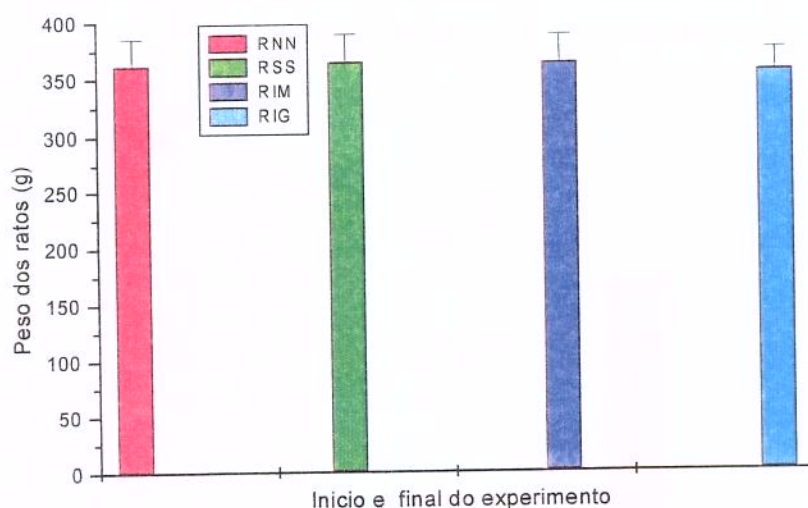


Gráfico 3: Peso dos ratos nos animais do grupo RNN, RSS, RIM e RIG. Sendo $p > 0,05$.

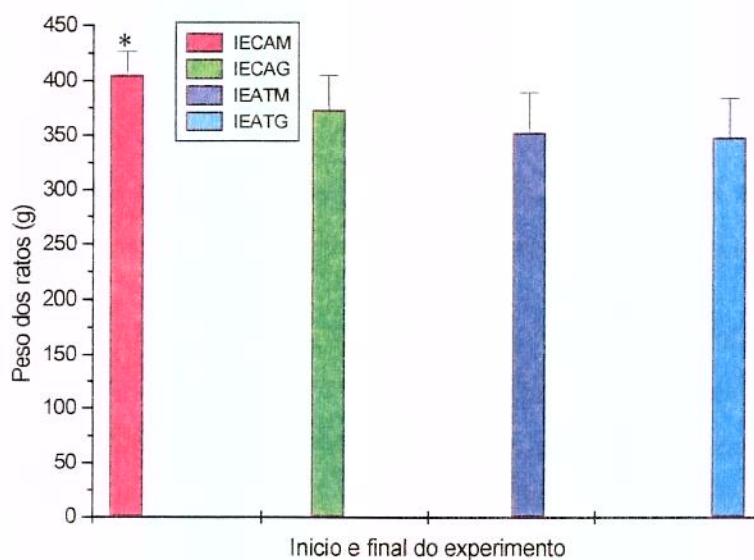


Gráfico 4: Peso dos ratos nos animais do grupo IECAM, IECAG, IEATM e IEAG. Sendo IECAM maior em relação aos outros grupos. Sendo * $p < 0,05$.

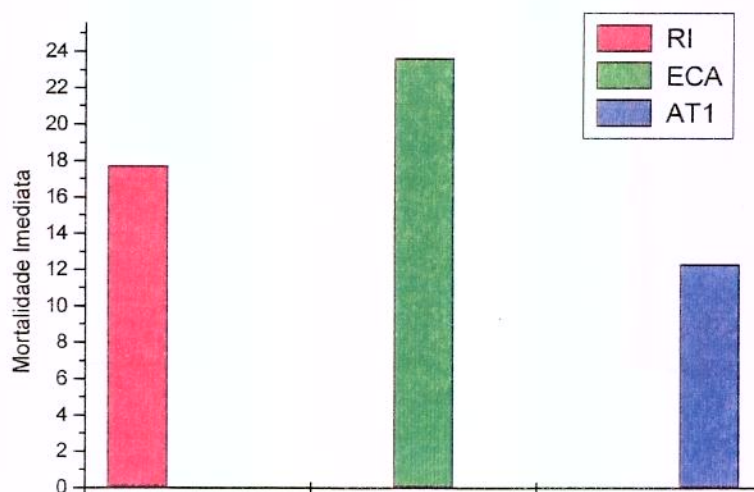


Gráfico 5: Mortalidade imediata nos grupos infartados sem tratamento (RI) e infartados e tratados com inibidores de ECA (IECA), infartados e tratados com inibidores dos receptores AT1 (IAT1). Sendo $p > 0,05$.

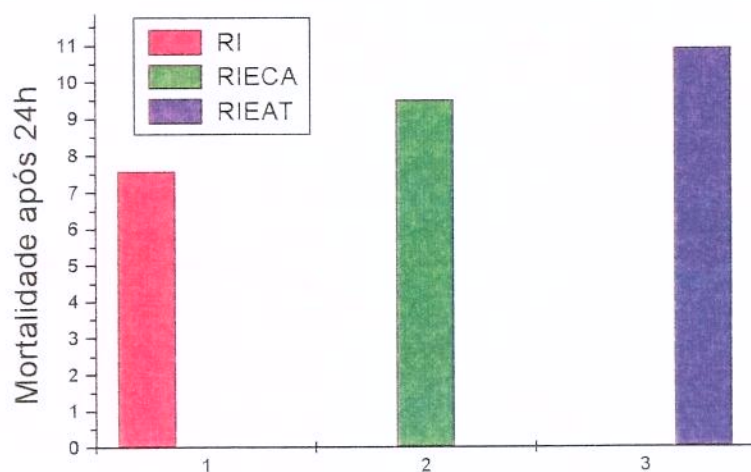


Gráfico 6: Mortalidade após 24 horas. Nos grupos infartados sem tratamento (RI) e naqueles infartados e tratados com inibidores de enzima conversora de angiotensina (RIECA), infartados e tratados com inibidores dos receptores AT1(RIEAT1). Sendo $p > 0,05$.

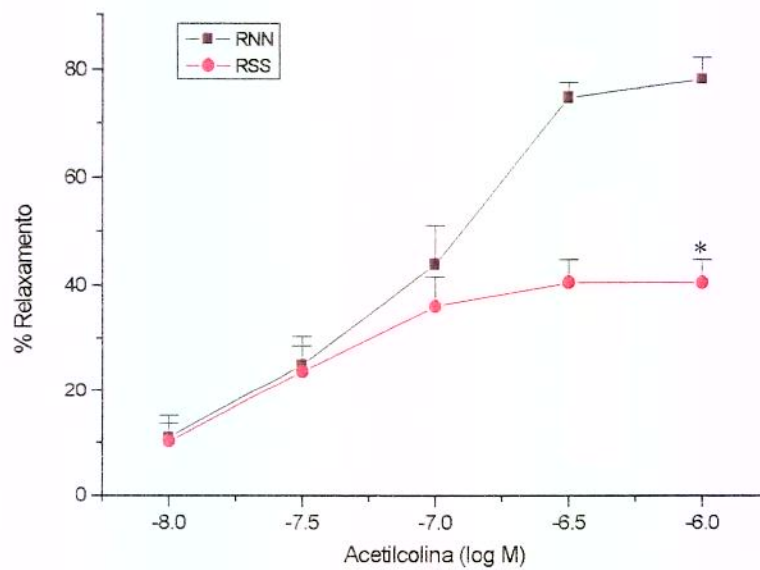


Gráfico 7: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN e RSS. Sendo
* $p < 0,05$.

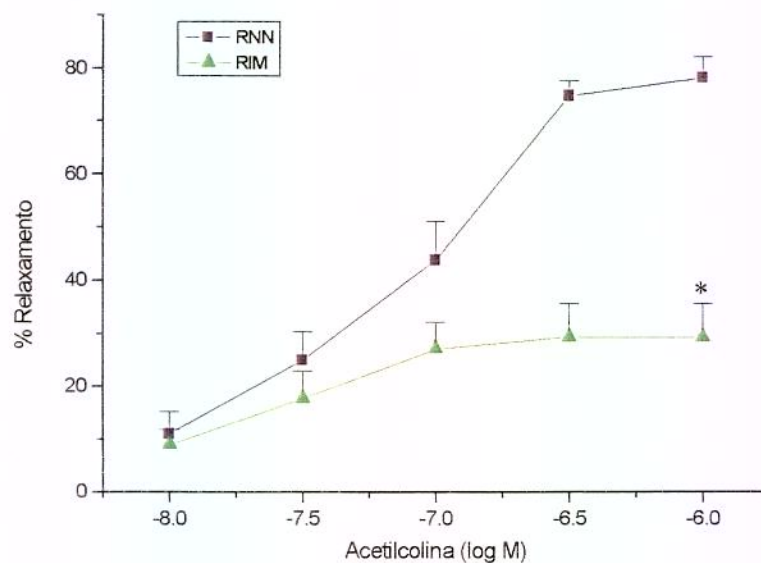


Gráfico 8: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN e RIM. Sendo
* $p < 0,05$.

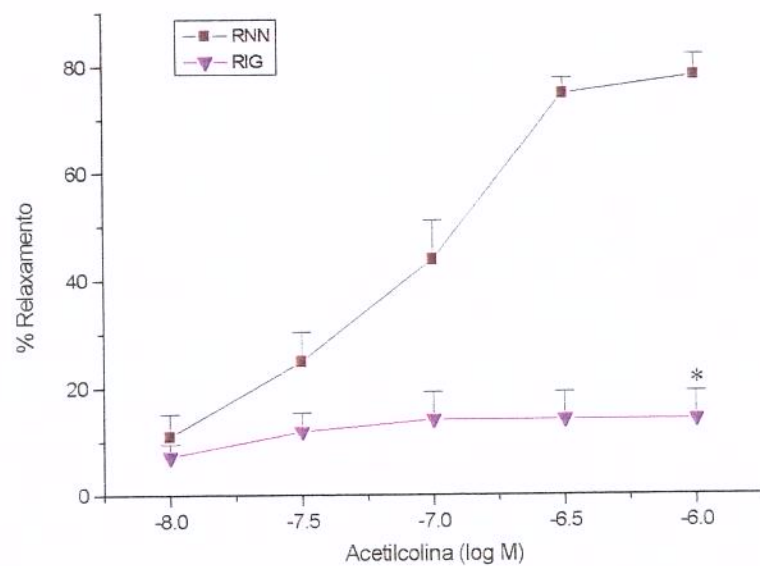


Gráfico 9: Relaxamento máximo nos grupos RNN e RIG. Sendo * $p < 0,05$.

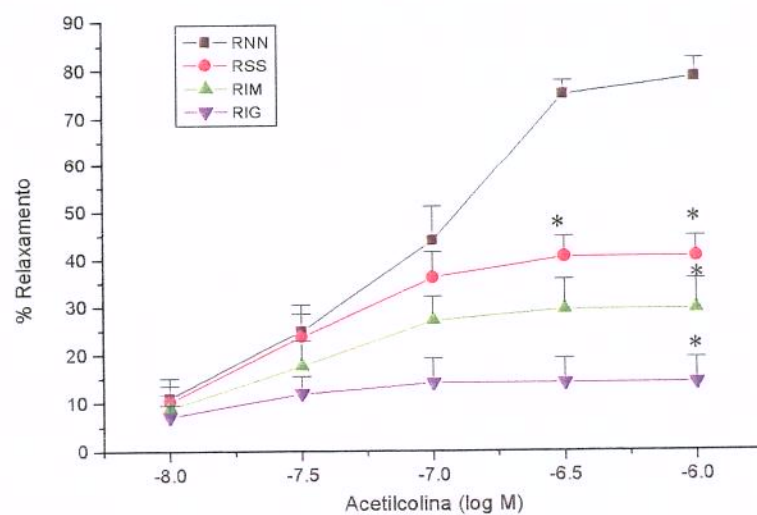


Gráfico 10: Relaxamento máximo nos grupos RNN, RSS, RIM e RIG. Sendo * $p < 0,05$.

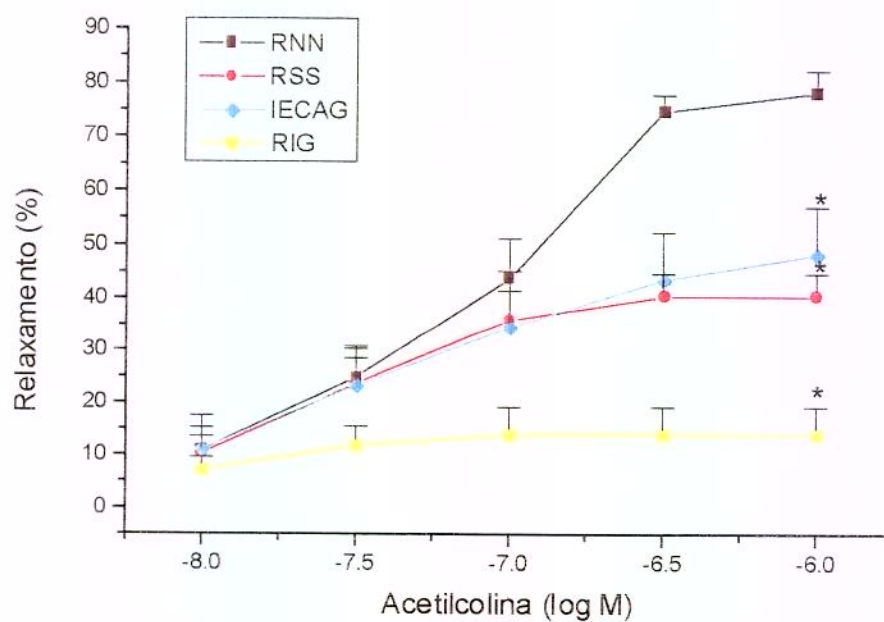


Gráfico 11: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, IECAG e RIG. * $p < 0,05$

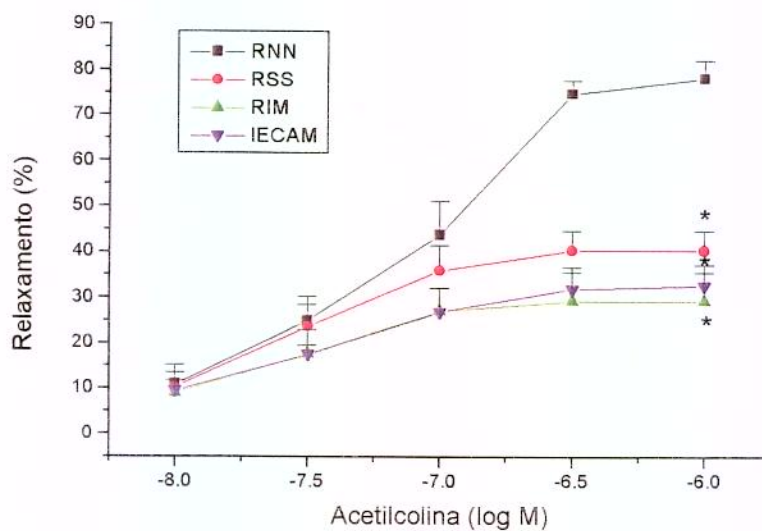


Gráfico 12: Relaxamento máximo nos grupos RNN, RSS, RIM e IECAM. *($p < 0,05$)

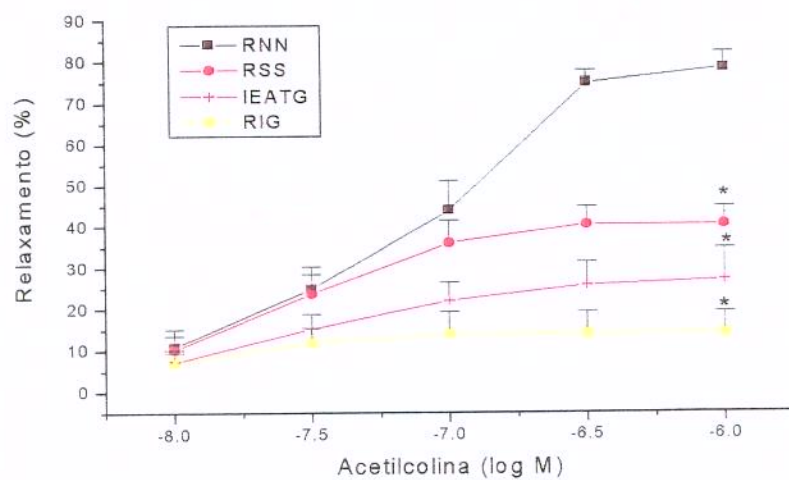


Gráfico 13: Relaxamento máximo dependente do endotélio nos grupos RNN, RSS, RIG e IEATG. * ($p < 0,05$)

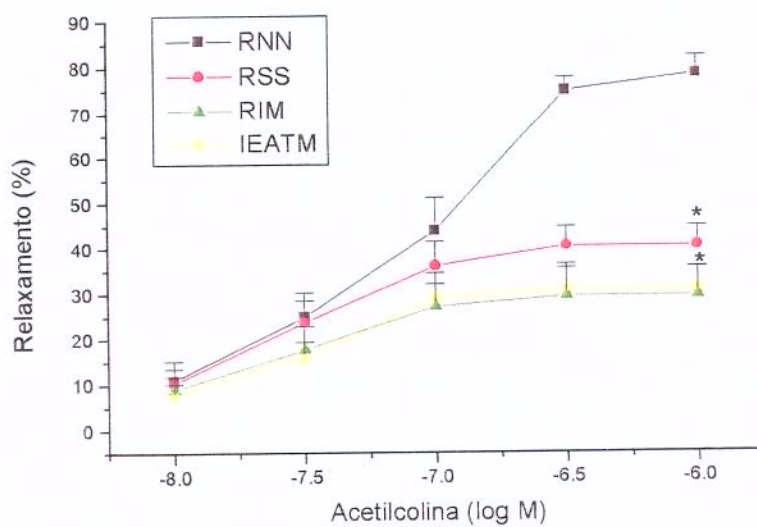


Gráfico 14: Relaxamento máximo nos grupos RNN, RSS, RIM e IEATM * $p < 0,05$.

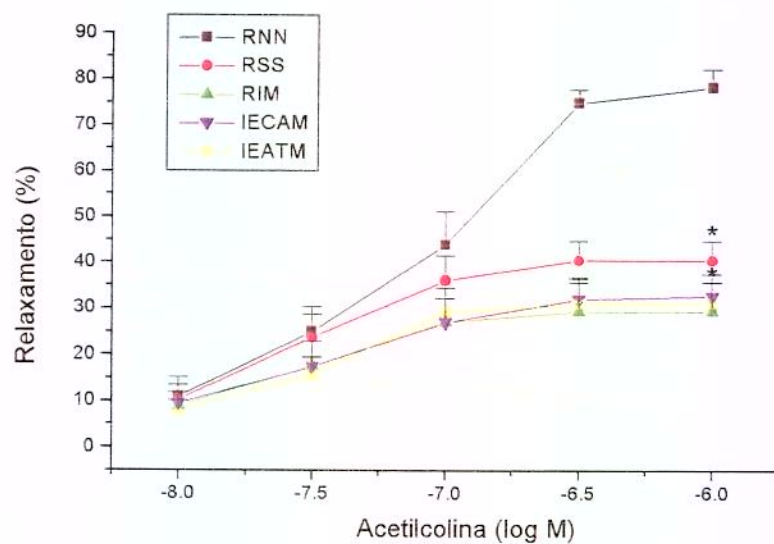


Gráfico 15: Relaxamento máximo dependente do endotélio: RNN, RSS, RIM, IECAM e IEATM sendo * $p < 0,05$.

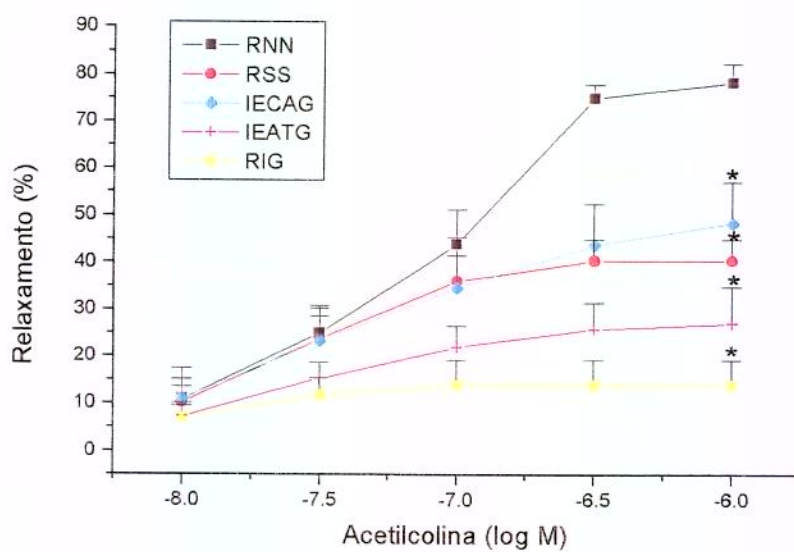


Gráfico 16: Relaxamento máximo dependente do endotélio: RNN, RSS, IECAG, IEATG e RIG, sendo * $p < 0,05$.



4. DISCUSSÃO

O infarto do miocárdio é um dos diagnósticos mais comuns em pacientes hospitalizados nos países industrializados. Nos EUA, cerca de 1 milhão e 500 mil infartos do miocárdio ocorrem a cada ano, sendo que a taxa de mortalidade é de aproximadamente 30% com mais da metade das mortes acontecendo antes que o paciente chegasse ao hospital; também as mortes ocorrem, aproximadamente, uma hora após o início dos sintomas, e tais mortes geralmente são em consequência de arritmias cardíacas. Embora a taxa de mortalidade no infarto agudo do miocárdio tenha declinado cerca de 30% durante as duas últimas décadas, 1 entre 25 pacientes que sobrevivem à hospitalização inicial falece no primeiro ano após o evento. A sobrevida é acentuadamente reduzida, principalmente, nos pacientes idosos (> de 65 anos de idade), cuja taxa de mortalidade chega a 20% no primeiro mês e 35% um ano após o infarto.

A mortalidade no infarto tem diminuído desde 1960 (DEVREEDE *et al.*; 1991; NAYLOR *et al.*; 1994) devido, principalmente, à criação das unidades coronarianas, nas quais é possível a monitorização das arritmias, do choque cardiogênico, assim como de outros parâmetros. A terapêutica trombolítica endovenosa, o desenvolvimento de angioplastia e o avanço na terapêutica com beta bloqueadores, antitrombóticos, nitratos, inibidores da enzima conversora de angiotensina e, mais, recentemente, bloqueadores específicos dos receptores AT1, têm contribuído para melhorar a sobrevida dos pacientes infartados.

No Brasil, as estatísticas a respeito da taxa de mortalidade no infarto do miocárdio se referem somente aos hospitais públicos, conforme levantamento feito em São Paulo (MARCOPITTO *et al.*; 2000) e na Bahia (PASSOS *et al.*; 2000).

Em 1979, no estado de São Paulo 54,9% das mortes por infarto agudo do miocárdio ocorreram dentro do ambiente hospitalar, esses dados, são coerentes com os países mais desenvolvidos. Também, os autores observaram redução da taxa da mortalidade no infarto agudo em população intra-hospitalar, chegando a 13,7%, em 1996. O mesmo ocorreu em Salvador, nos períodos de 1989 a 1992, cujas estatísticas de hospitais públicos apresentaram 10% de mortalidade. Já no período de 1993-1996, esta mortalidade é referida de 20,3%.

Observa-se, pelas estatísticas citadas, que apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, a mortalidade, na fase recente e tardia do infarto do miocárdio, continua alta. Assim, estudos referentes ao assunto continuam sendo necessários para compreensão de mecanismos envolvidos na gênese do infarto.

Neste trabalho, procurou-se analisar variáveis ocorridas na vigência do infarto agudo do miocárdio e estratégias terapêuticas que poderiam modificar sua evolução natural e melhorar as consequências do evento.

Uma das primeiras variáveis estudadas foi o peso dos animais. Em estudos experimentais, o peso constitui uma variável que pode influenciar o resultado das pesquisas. Tal variável pode, por outro lado, sofrer a influência de situações, como: dieta, infecções, outros estados mórbidos, stress, estados edematosos, variações de apetite, medicamentos etc. Em consequência disso é um bom parâmetro para controle do estado saudável dos animais. No presente estudo, o peso foi valorizado, uma vez que o infarto realizado pode cursar com disfunção ventricular e aumentar o peso dos animais, em consequência da retenção de líquido. Por outro lado, a administração de medicamentos tem por base o quilograma e obriga-se a valorização desse item, assim como a importância que tais medicamentos poderiam ter no estado nutricional dos animais.

Observa-se pelos resultados, que o grupo de animais com infarto do tamanho médio e tratado com lisinopril (IECAM) apresentou peso maior que os animais dos demais grupos, com diferença estatisticamente significativa. A primeira pergunta a ser formulada seria se o medicamento poderia ser o responsável pela diferença de peso entre os animais dos diferentes grupos. Em trabalhos experimentais (MULDER *et al.*; 1996; CAMPBELL *et al.*; 1995 and HU *et al.*; 1998) utilizando inibidores da enzima conversora de angiotensina, assim como aqueles clínicos (LATINI *et al.*; 1995; KUGA *et al.*; 1997 and DICKSTEIN *et al.*; 1999) não se encontra referência à ação que o grupo de drogas teria sobre modificações do peso corporal. Por outro lado, o efeito adverso relatado na farmacologia desse grupo de drogas se diz respeito à disgeusia, isto é, alterações nas papilas gustativas. Também o fato de o grupo com infarto grande e tratado com lisinopril (IECAG) não ter apresentado diferença significativa com os demais grupos, praticamente isenta o medicamento da influência sobre esse dado.

Reavaliando o peso dos animais antes do início do trabalho, observou-se que o grupo IECAM já apresentava peso maior que os demais. Apesar de todo o cuidado de selecionar os animais com as mesmas condições de idade, sexo e peso, não conseguiu-se fazer completamente, sendo plausível, que isto possa explicar o resultado encontrado neste sentido.

Em relação à mortalidade, não encontrou-se na literatura, estudos correlacionando somente o peso do animal em relação a esse item e o infarto do miocárdio. Todavia, quando a perda de peso reflete evidência de outras condições de má saúde, acredita-se que possa traduzir em maior mortalidade.

No presente trabalho não houve diferença estatisticamente significativa em relação à mortalidade no grupo com peso maior comparado aos demais e, portanto, verificou-se que este fator não influenciou este item analisado.

Outra pergunta a ser formulada em seguida seria que influência esta variação de peso poderia ter nos demais resultados, principalmente na função endotelial, um dos objetivos específicos do estudo.

Em ratos, o peso corporal e a idade estão correlacionados, sendo que, quanto mais idosos, mais obesos se tornam os animais. Neste caso ocorre disfunção endotelial, uma vez que a idade avançada por si altera o relaxamento dependente do endotélio, diminuindo-o. VANHOUTTE *et al*, 1995, em uma revisão, demonstrou esse fato, observando que, embora o metabolismo das células endoteliais seja mais ativo, sua função está reduzida a partir dos 30 anos, baseado em trabalhos feitos com coronária de porco. Retirando-se o endotélio através de injúria com balão (SHIMOKAWA *et al.*; 1989 e 1991) os autores verificaram que o crescimento das células endoteliais foi dobrado porém, o endotélio regenerado não era capaz de inibir a agregação plaquetária e trombina, induzindo a contração.

Observando-se os gráficos 3 e 4, verifica-se que o efeito peso não teve influência na disfunção endotelial, uma vez que não se observou significância estatística na comparação dos dados.

O rato como modelo experimental para o estudo do infarto do miocárdio e suas conseqüências, tem sido muito utilizado, desde a padronização da técnica por JOHNS, em 1954. Revendo a mortalidade em vários trabalhos, inclusive o de JOHNS; MULDER *et al.*; 1996; BRADES *et al.*; 1998, observou-se que era alta a mortalidade. O nível médio da mortalidade fica em torno dos 40% nos animais, patamar semelhante à mortalidade encontrada em humanos acometidos por infarto do miocárdio (UNDERWOOD *et al.*; 1997). Como no homem, observou-se que a mortalidade alta aparece na fase mais recente do evento, isto é, nas primeiras vinte e quatro horas. Confirmou-se esses fatos no Laboratório de Endotélio, Lípides e Aterosclerose, quando monitorou-se, com eletrocardiograma, um grupo de ratos infartados. Constatou-se que o grupo com maior número de óbitos apresentava uma frequência maior de arritmia cardíaca, principalmente taquicardia ventricular (dados não publicados), o que justifica a alta mortalidade.

Os resultados dos gráfico 5 e 6 expressam as mortalidades encontradas nos grupos de animais infartados sem tratamento e nos grupos que receberam IECA e AT1. Surpreende a mortalidade no grupo infartado sem tratamento, 17%, bem menor que aquela relatada na maioria dos estudos vistos na literatura (JOHNS & OLSON, 1954 ; MULDER *et al.*; 1996; BRADES, *et al.*; 1998). Acredita-se que isso tenha ocorrido em vista dos cuidados tomados na observação dos animais, após a ligadura da coronária. Suporte de oxigenação, assim como de reanimação cardíaca, mantidos nas primeiras horas, nos quais os animais permaneciam sobre cuidados e observados no interior do laboratório, foram os responsáveis por essa redução de mortalidade. Esta conduta tem sido tomada porque nas fases iniciais desta linha de pesquisa a mortalidade dos animais era muito alta. Seguindo às condutas que reduziram a mortalidade em humanos, vítimas de infarto do miocárdio, as custas de criação das unidades coronarianas, também conseguiu-se trazer a mortalidade nos ratos para os níveis encontrados neste estudo. NASA *et al.*; 1996, também apresentam mortalidade semelhante à encontrada no presente estudo. Estes autores produziram infarto do miocárdio em ratos wistar pesando entre 200-220g e verificaram que a mortalidade nas primeiras 24 horas foi de 14% e ao final de 12 semanas em torno de 43%.

A mortalidade observada nos animais do grupo que recebeu IECA, 23,64%, foi > nos grupos não tratados e tratados c/ inibidores específicos dos receptores AT1, embora os mesmos cuidados tenham sido tomados; porém, não houve significância estatística.

A influência que os inibidores da ECA tem na evolução do infarto do miocárdio já se encontra bem estabelecido em estudos de grande número de pacientes (SOLVED, SAVE, AIRE). Na fase de cicatrização, tais medicamentos reduzem a mortalidade por eventos cardiovasculares, assim como a reincidência do infarto do miocárdio, além de diminuir a frequência de insuficiência cardíaca. Em relação à fase recente do infarto, principalmente nas primeiras 24hs, todavia, ainda se discute o benefício deste grupo de drogas.

Os 3 estudos de grande porte (CONSENSUS, GISSI IV, ISIS III) enfocando este item em humanos, apresentam conclusões divergentes. Embora favoreçam o uso dos IECA no período de 0 a 24 hs após o infarto, o fazem com restrições.

No estudo CONSENSUS, o enalapril falhou em reduzir a mortalidade. Já nos estudos GISSI IV e ISIS III, utilizando lisinopril e captopril, encontrou-se redução da mortalidade nos grupos tratados em relação ao placebo. Tal diferença foi pequena, mas estatisticamente significativa, o que permitiu algumas conclusões favoráveis ao uso destes medicamentos em determinadas situações, como: insuficiência cardíaca, pacientes hemodinamicamente estáveis e com infarto anterior.

BERTRAN PITT (1994), em revisão pormenorizada destes trabalhos, encontrou diferenças metodológicas entre o estudo CONSENSUS e os demais, que justificaram a controvérsia estabelecida. A principal controvérsia consistia na via de administração do IECA, que no CONSENSUS era endovenosa, ao contrário dos demais que era oral e portanto, plenamente compatível c/ o resultado desfavorável encontrado no 1º estudo.

Aparentemente, o assunto IECA/mortalidade no infarto do miocárdio encontra-se esclarecido com pontos favoráveis ao seu uso na fase do infarto já cicatrizado e na fase de convalescença isto é, após às 24hs. Todavia, no período mais recente (0-24h) este assunto apresenta restrições e devido a isto, uma outra situação motivou a colocar a mortalidade como um dos objetivos deste estudo. Achamos que um grupo de pacientes, já em uso de um IECA que viriam a apresentar infarto do miocárdio, deveria ser analisado.

Relembrando, brevemente, as ações do sistema renina-angiotensina, observou-se que as mais conhecidas se referem a capacidade da angiotensina II em determinar vasoconstrição periférica e determinar a reabsorção de sódio e água, está última via estimulação da secreção de aldosterona. Tais ações ocorrem a curto prazo e têm a função de manutenção de fluxo sanguíneo e, portanto, regulando a pressão arterial. Tais situações são de extrema importância na vigência do infarto do miocárdio, principalmente de grande extensão, uma vez que o outro mecanismo de manutenção de fluxo sanguíneo, representado pelo efeito de bomba do coração, encontrar-se prejudicado. É óbvio que a análise deste grupo de pacientes só poderia ser efetuado retrospectivamente, uma vez que os indivíduos apresentassem infarto do miocárdio. Entretanto, experimentalmente em animais, pode-se mimetizar esta situação. O presente estudo muito bem demonstrou que os animais, na vigência do evento isquêmico encontram-se hipotensos (gráficos 1 e 2). Isso indica que perderam um dos mecanismos de adaptação à condição adversa, talvez o mais importante para a manutenção do fluxo sanguíneo, representado pelo efeito de bomba do coração, encontrar-se prejudicado.

Embora não se possa inferir que o mesmo aconteça, exatamente igual, nos pacientes em uso destes medicamentos e que venha a ter um infarto do miocárdio, notou-se evidências experimentais que podem justificar alguns resultados diferentes encontrados em estudos em humanos.

Em trabalho anterior ALMEIDA *et al.*; 1994, abordaram este assunto, utilizando captopril e cilazapril em ratos, previamente ao infarto e observando que, quando as doses administradas eram altas, ocorria uma maior mortalidade em relação ao placebo. Em doses menores, esta diferença era insignificante e, portanto, uma preocupação seria com os pacientes em uso de altas doses dos IECAS e AT1, pacientes já em estados outros desfavoráveis, completando os cuidados a serem tomados na indicação destes medicamentos na fase mais precoce do infarto do miocárdio.

Os dados apresentados nos gráficos 1 e 2 submetidos a tratamento estatístico não apresentaram diferenças significativas entre os grupos que receberam IECA e AT1 e o grupo infartado sem tratamento em relação a mortalidade. Isso tranquiliza quanto ao uso destas drogas nas situações em questão. Todavia, resta lembrar que, por se tratar de

situações biológicas, a estatística deve ser encarada com ressalvas e, sendo assim, seria plausível na prática clínica ter em mente as possibilidades e, avaliar individualmente caso a caso, em vez de, simplesmente, seguir protocolos.

Os animais do grupo AT1, cuja mortalidade foi de 12% menor em relação aos grupos IECA e infartados, porém, sem significância estatística, são coerentes com os dados de Pitt *et al.*; 1997; que demonstraram que, em pacientes idosos, os AT1 diminuem a frequência de taquicardia, por atuarem mais eficientemente a nível das catecolaminas em relação aos IECA. Tratar os animais 48 horas antes do infarto não influenciou a mortalidade dos diferentes grupos.

O endotélio vascular deixou de ser considerado apenas uma barreira entre o sangue e a parede arterial a partir dos trabalhos de Furchgott, em 1980, quando este demonstrou que a acetilcolina podia vasodilatar a artéria, apenas quando o endotélio encontrava-se íntegro. Com esta descoberta, muitos outros trabalhos passaram a relacionar o endotélio lesado com doenças cardiovasculares e, sabe-se hoje que este é prejudicado por uma série de fatores, tais como: fumo, diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemias, insuficiência cardíaca.

A maioria destes fatores são também fatores de risco para a aterosclerose coronariana e, conseqüentemente para o infarto do miocárdio. Estabelece-se, portanto, um elo de ligação entre a disfunção endotelial e o infarto do miocárdio, através de fatores de risco comuns a ambas as situações. Em modelos animais de infarto do miocárdio, tem-se estudado essa relação e observado que a disfunção endotelial acompanha a instalação da insuficiência cardíaca, muito bem estudado por ONTKEAN *et al.*; 1991. Também este fato tem sido estudado em pacientes com insuficiência cardíaca. (TREASURE *et al.*, 1990.; KUBO *et al.*, 1991.; KATZ *et al.*; 1992; ANGUS *et al.*; 1993; INOUE *et al.*, 1994.; CHING-DUSTING *et al.*; 1996) demonstrando ocorrer a disfunção endotelial em coronárias de indivíduos com infarto.

No entanto, a definição exata se ocorre disfunção endotelial dependente exclusivamente do infarto do miocárdio ou vice-versa ainda não está clara na literatura médica, uma vez que os pacientes sempre apresentam elementos capazes de gerar uma ou outra situação independentemente delas próprias, como referido em parágrafos anteriores.

O presente estudo demonstrou claramente que, no infarto do miocárdio ocorre disfunção endotelial, como pode ser observado nos gráficos 8 e 9 onde relaxamento arterial dependente do endotélio foi nitidamente prejudicado, sendo de 29,29% e 14,04%, respectivamente no infarto médio e de grande extensão. Tais animais eram saudáveis, sendo descartados, portanto, os fatores de risco habitualmente encontrados naqueles indivíduos que sofrem infarto do miocárdio e que por si só afetam negativamente a função endotelial.

Os resultados obtidos foram coerentes com a premissa inicial que levou a elaborar o presente estudo, conhecendo-se os mecanismos fisiopatológicos deflagrados pelo infarto do miocárdio. Reveremos em poucas parágrafos, tais mecanismos relatados por BRUNWALD, 1996.

Observa-se que o infarto do miocárdio de grande extensão, embora focal no miocárdio, transcende este fato, tornando-se cosmopolita e mobilizando uma resposta global do organismo. Dentre estas reações que refletem o stress do aparelho cardiovascular salienta-se a resposta neuro-humoral traduzida pelas catecolaminas provenientes do sistema simpático; a angiotensina II e a aldosterona dependentes do sistema renina-angiotensina: sistêmico e tecidual (DZAU *et al.*; 1993) e as endotelinas (CHAN *et al.*; 1991). Percebe-se que toda esta resposta vasoconstritora se faz necessária para compensar a hemodinâmica comprometida em decorrência da insuficiência aguda da função da bomba do ventrículo acometido pelo infarto e manter o fluxo periférico a todo o organismo.

É conhecido que, tanto as catecolaminas, angiotensina II e endotelinas, são substâncias capazes de atuar no endotélio prejudicando a função vasodilatadora dependente deste, em situações de hiperativação.

UREN *et al.*; 1994, observaram que coronárias normais, não relacionadas à área do infarto do miocárdio, apresentavam disfunção endotelial quando não respondiam à acetilcolina, e atribuíram a estes mecanismos de hiperativação neuro-hormonal esta situação.

Outro evento presente no infarto do miocárdio e, passível de gerar disfunção endotelial, se relaciona ao processo inflamatório desencadeado desde as primeiras horas da ocorrência deste. Esta inflamação envolve reação aguda representada por células polimorfonucleares, neutrófilos seguidos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (ROBBINS, 1998). Tal reação inflamatória tem função reparadora, com a reabsorção de células necróticas e estimuladora de cicatrização fibrosa dependente do tecido conjuntivo produzido por células fibroblásticas. Não se discute atualmente que estas células inflamatórias produzem citocinas (IL-6 e IL-8) as quais podem atuar nas células endoteliais determinando sua disfunção. Assim, como resposta de oxidases semelhantes à NAD e NADH2 das superfícies da célula endotelial.

Estudos relacionando à disfunção endotelial com possibilidades de ruptura de placas ateroscleróticas nas síndromes isquêmicas agudas demonstram que macrofágos são produtores primários do potente vasoconstritor endotelina 1, sendo esta substância capaz de, uma vez na circulação, prejudicar a função endotelial. Além do mais, a endotelina é capaz de estimular a produção tecidual de angiotensina II (KAWAGUCHI *et al.*, 1990) também indutora de disfunção endotelial. A angiotensina II, por sua vez, também, é capaz de estimular a produção de endotelina na parede arterial, havendo, assim a formação de um ciclo vicioso de formação de substâncias com capacidade de originar disfunção endotelial.

Trabalhos experimentais analisando a função endotelial especificamente na fase aguda do infarto do miocárdio, antes do desencadeamento de insuficiência cardíaca, não são muitos. O de TEERLINK *et al.*; 1993, visou mapear o momento em que ocorreria a disfunção em ratos infartados. Os resultados diferiram em parte deste trabalho uma vez que a disfunção foi detectada a partir de oito semanas após o infarto, apenas na vigência de insuficiência cardíaca e a esta foi atribuído os mecanismos determinantes da disfunção endotelial. Diferenças metodológicas ocorridas entre o estudo de TEERLINK *et al.*; 1993 e o presente trabalho, tais como a tensão inicial a que se submete-se o fragmento aórtico estudado, a idade dos animais, hipotensão do infarto, podem talvez justificar resultados discrepantes.

Embora não tenha sido efetuado avaliação da hemodinâmica nos animais, com finalidade de se comprovar a presença de insuficiência cardíaca, não tem-se dúvidas que, nos infartos grandes, esta ocorre agudamente. Nos animais que morrem nas primeiras horas, não raramente, esta ocorre na vigência de edema agudo de pulmões, traduzido por secreção rósea nasal. Em sendo assim, considerou-se uma semana como tempo suficiente para hiperativação dos mecanismos mantenedores da pressão arterial. Por outro lado, o exame histopatológico demonstra que já existe amplo infiltrado inflamatório, como visto nas figura(10A) e, portanto, há possibilidade de citocinas circulantes atuarem, como já foi discutido em parágrafos anteriores.

No trabalho de MANHUKINA *et al.*; 1996, os resultados são semelhantes ao presente trabalho, ou seja, os autores demonstraram que em ratos infartados após 3 horas do infarto ocorre hiperativação do endotélio e que retorna a normalidade após 24 horas. Após esse período, o relaxamento dependente do endotélio tende a diminuir.

No gráfico 7, observa-se que os animais sham apresentam uma dilatação arterial dependente do endotélio menor que aqueles nos quais não se fez nenhum procedimento, estando este relaxamento em 40,04%, ocorrendo significância estatística entre os dois grupos. Todavia, observou-se que estes relaxamentos ocorridos nos animais sham (40,04%) foi maior em relação aos com infarto médio e grande (grupos RIM e RIG), respectivamente, 29,29% e 14%, diferenças estas estatisticamente significantes.

Acreditamos que o trauma à parede torácica e ao miocárdio, ao se transpassar a agulha e o fio, foram capazes de gerar processo inflamatório reparador cicatricial suficiente para determinar a disfunção endotelial, como visto em outras situações inflamatórias (TSUJIKAWA *et al.*; 2000; VOLK *et al.*; 2000), Tal disfunção endotelial nos animais sham ocorreu em percentagem menor àquelas observadas no infarto experimental do miocárdio de média e grande extensão, caracterizando o grupo sham como adequado para controle destas situações.

Em relação aos resultados dos animais infartados e tratados com IECA e AT1, apresentados nos gráficos de 11 a 14, as seguintes considerações devem ser feitas.

Nos gráficos 11 e 12, observa-se que os grupos com infarto médio e com IECA, controles normais e sham, demonstraram não ter ocorrido grande benefício na disfunção endotelial em consequência do tratamento. No entanto, analisando as curvas de relaxamento dos animais tratados com IECA e aqueles com infartos sem tratamento observa-se resultados promissores, que merecem discussão. No gráfico 12, que representa o grupo de animais com infarto de grande extensão ocorreu relaxamento maior no grupo que recebeu tratamento com lisinopril em relação a aquele sem tratamento e, também, ao grupo sham, ocorrendo significância estatística. Isso demonstra que o tratamento, nesta fase do infarto, trouxe benefício aos animais, uma vez que reduziu a disfunção endotelial.

Em parágrafos anteriores, apresentou-se justificativas para a ocorrência de disfunção endotelial no infarto do miocárdio, tributando-se, em parte, esta disfunção a uma hiperativação neuro-hormonal ocorrida no infarto agudo do miocárdio. A verificação experimental da melhora da disfunção endotelial dependente do bloqueio da enzima de conversão de angiotensina contribui com esta impressão. Uma vez bloqueado o mecanismo principal de formação de angiotensina II, traduzido pela enzima de conversão, os efeitos deletérios deste hormônio deixam de ocorrer sobre o endotélio, revertendo a disfunção endotelial. Estes efeitos danosos ocorreriam, por um lado, através da própria ação direta da angiotensina na célula endotelial, por estímulo para a formação de endotelinas gerado pela angiotensina II, assim como pela da inibição de geração de ânions superóxidos através da estimulação de NAD/NADPH oxidases.

Por outro lado, a inibição da enzima de conversão de angiotensina pelo bloqueador, impede a degradação de bradicinina. Esta cinina, em maior quantidade, contribuiria para reverter a disfunção endotelial, uma vez que é um potente estimulador de produção do óxido nítrico (HU *et al.*; 1998).

TCHÖPE *et al.*; 2000, contribuíram para o entendimento do papel da bradicinina em estudo experimental de infarto do miocárdio em ratos, em modelo semelhante ao utilizado no presente estudo. Observaram que os receptores B1 da bradicinina apresentaram-se com maior expressão na vigência do infarto. Em condições normais, tais receptores são indetectáveis. Tais fatos demonstram que a bradicinina representa um mecanismo adaptativo importante utilizado pelo organismo, na manutenção

do equilíbrio do sistema cardiovascular, provavelmente, em decorrência de melhora da disfunção endotelial. Os IECA, determinando redução na degradação de bradicinina atuariam, permitindo maior quantidade desta ser captada pelos receptores expressos em maior concentração.

No gráfico 11, na comparação com os resultados do tratamento com lisinopril em infartos de média extensão, em relação ao relaxamento ocorrido nos animais com infarto médio não tratados, não houve diferença significativa, demonstrando não ter havido mudança na disfunção endotelial. A extensão do infarto deve ser o fator preponderante para permitir a interpretação deste resultado. Em trabalhos clínicos e experimentais (SAVE, AIRE, SOLVD, ALMEIDA *et al.*; 1993, HU *et al.*, 1998) se salientou que a morbi-mortalidade encontrada no infarto do miocárdio está relacionada, principalmente a sua extensão. Em experiência própria do laboratório onde foi realizado este estudo, observou-se que todas as complicações do infarto experimental em ratos, tais como mortalidade e remodelação, ocorreram nos infartos de grande extensão. Portanto, os resultados obtidos são compatíveis com uma menor ativação neuro-hormonal nos infartos de menor extensão. Existe assim, uma menor participação do sistema renina angiotensina na disfunção endotelial consequente, ocorrida nestes casos. Por isso, uma ação não significativa do uso de inibidor da enzima de conversão de angiotensina, em tais situações, pode ser aceitável.

HU *et al.*; 1998, abordaram a importância da extensão do infarto do miocárdio em relação aos efeitos do tratamento com IECA e inibidores específico dos receptores AT1. Os autores questionaram o motivo pelo qual os IECA apresentaram ação em melhorar a hemodinâmica apenas nos grandes infartos. Com metodologia adequada, confirmam este fato já conhecidos desde os trabalhos iniciais de Pfeffer, *et al.*; 1995, 1988; porém, não propõem explicações para o fato. Deste modo, a interpretação de que maiores infartos requerem maiores respostas adaptativas do aparelho cardiovascular podem justificar os achados.

Em relação aos grupos AT1M e AT1G, cujos animais apresentaram infarto do miocárdio de média e grande extensão e foram tratados com losartan, os resultados apresentados nos gráficos 13 e 14, demonstraram não ter ocorrido diferença significativa

em relação ao infarto de média extensão. Já para o grupo com infarto grande houve significância estatística, assim como ocorreu nos animais tratados com lisinopril.

Deste modo, interpreta-se o fato como um benefício deste grupo de drogas, na redução da disfunção endotelial ocorrida nos animais com infarto do miocárdio em sua fase recente. Embora tenha havido significância estatística, os inibidores dos receptores AT1 elevou o relaxamento arterial de 14,14% no grupo não tratado para 26,98% no grupo tratado (gráfico 14). Essa elevação foi maior naqueles em que se fez uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina a qual elevou de 14,14% para 48,9%. Verificou-se que os IECA foram superiores em reverter a disfunção endotelial em consequência do infarto do miocárdio em relação aos inibidores dos receptores AT1, neste período de tratamento, embora tenha havido significância estatística para ambos, em relação ao controle, como pode ser visto no gráfico 16. Os resultados obtidos podem ser justificados, enfocando-se algumas diferenças entre os 2 grupos de drogas IECA e inibidores dos receptores AT1, assim como peculiaridades envolvendo especificamente aquelas drogas utilizadas: lisinopril e losartan.

Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina exercem seu efeito sobre o sistema renina-angiotensina, atuando em um setor da cadeia de reações bioquímicas onde ocorre interrelações de eventos. Isto determina o bloqueio na transformação de angiotensina I em seu elemento ativo: angiotensina II, cumprindo os principais objetivos dos IECAS e, determinando a interrupção dos efeitos indesejáveis da angiotensina II, quando em situações de hiperativação do sistema. No entanto, os IECAs, determinam também mudanças nos outros setores dependentes da enzima de conversão. A principal e mais conhecida destas ações é a degradação de bradicinina determinada pela cininase II: a enzima de conversão de angiotensina. A bradicinina não inativada tem sido responsabilizada como adjuvante nos efeitos observados no aparelho cardiovascular determinado pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

Quando se bloqueia especificamente o receptor da angiotensina, os benefícios sobre o aparelho cardiovascular se limitam àqueles determinados por este único evento, não devendo assim, equiparar-se aos mecanismos mais amplos de ações dos IECAs. Desse modo, indicações diferentes tem nortead o uso de ambas as drogas.

Analisando os medicamentos representantes dos grupos e usados neste estudo, notou-se diferenças farmacológicas que, talvez auxiliem na interpretação dos resultados. Ambos os medicamentos são utilizados em dose única diária, por apresentarem mecanismos de liberação lenta e permitir níveis terapêuticos regulares por até 24 horas. No entanto, BAUER *et al.*; 1995 salientam que o losartan apresenta ação efetiva total em tempo mais prolongado de uso do que aquele usado no presente estudo, embora nos primeiros dias do tratamento já se observa alguma ação. Este tempo está estipulado em 4 a 6 semanas, sendo que administramos o medicamento por apenas uma semana. A melhora que o losartan determinou na disfunção endotelial em grau menor que aquela vista nos animais tratados com IECA pode ser a evidência a favor deste fato. Em sendo assim, um grupo de animais tratados por um tempo maior e avaliados quando a droga alcançar seu plateau de ação poderia confirmar esta interpretação. Maior atenção deveria ser dada a estas peculiaridades das drogas no início do trabalho, pois tornam-se difíceis as comparações entre efeitos de drogas com diferenças farmacocinéticas. Atentou-se mais ao efeito final destes medicamentos em relação ao bloqueio da ação da angiotensina II e, neste sentido, resultados positivos foram alcançados. Não considera-se portanto, que o fato possível de, realmente, haver tal diferença farmacocinética, invalide o presente trabalho.

Em decorrência da ação dos IECA em melhorar rapidamente a disfunção endotelial em ratos, na fase recente do infarto do miocárdio, determina que essas drogas devem ser preferidas em relação aos inibidores dos receptores AT1 em tal situação. A melhora da disfunção endotelial determinada por esses medicamentos pode contribuir para justificar os efeitos benéficos deste grupo de drogas, observados em ensaios clínicos de longa duração como SAVE e SOLVD. A rapidez com que eles atuam na disfunção endotelial justifica esses resultados promissores também na fase recente do infarto do miocárdio.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados, obteve-se as seguintes conclusões:

1. Ocorre disfunção endotelial na fase recente do infarto experimental do miocárdio de média e grande extensão em ratos;
2. o inibidor da enzima de conversão da angiotensina, lisinopril, reverte a disfunção endotelial ocorrida na fase recente do infarto experimental do miocárdio de grande extensão, em ratos;
3. o inibidor específico dos receptores AT1, losartan, reverte a disfunção endotelial ocorrida na fase recente do infarto experimental do miocárdio de grande extensão, em ratos;
4. O uso dos IECA e bloqueadores de AT1, não modifica a mortalidade ocorrida no infarto experimental em sua fase recente, em ratos.

6. SUMMARY

The myocardial infarction is a consequence of serious ischemia of the heart. It is usually caused by atherosclerotic plaques which are deposited in the coronaries and generate a thrombus. Although at clinics and therapy we frequently know what occurred during the natural evolution, what happens in the vascular endothelium in acute myocardial infarction remains obscure. The endothelial dysfunction occurs in atherosclerosis, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and cardiac failure, but there is controversy whether an infarct occurs over activation of the endothelium or a decrease in endothelium response.

The experiment was carried out as a contribution to more precise comprehension.

OBJECTIVES:

- 1) To study the endothelial function in acute myocardial infarction in experimental infarct in rats;
- 2) verification of effects produced by angiotensin-converting enzyme inhibitors (IECA) and by blocking the angiotensin II type 1 receptor ;
- 3) observe the influence of IECA and the angiotensin type 1 receptor in the mortality rate of animals.

Eighty Wistar rats weighing 350-400g were randomized in 8 groups: (RCC) control, (RSS) sham, (RIM) medium infarct, (RIG) extensive infarct, (IECAM) medium infarct treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors, (IECAG) extensive infarct treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors, (IAT1M) medium infarct treated with angiotensin II type I receptor and (IAT1G) great infarct treated with angiotensin II type I receptor. The drugs utilized were angiotensin-converting enzyme inhibitors lisinopril (20mg/k/day) and angiotensin II type 1 receptor losartan (30mg/k/day). The dosage was responsible for decreasing the arterial pressure 25%, confirmed by pressure on the tail. The drugs were administered through gavage two days before the experiment and continued for 7 days after myocardial infarction induced by coronary artery ligation. The rats were housed in clear plastic cages with access to normal rat chow and water. After 7 days the rats

were anesthetized with ether. The verification of myocardial infarction was made with TTC at 1%. The histopathologic study was done with an hematoxylin-eosin stain. The infarct was classified as medium when involving 20% to 40% of the left ventricle area and great when exceeding 40% of the LV, calculated by macroscopic verification and by application of a mathematical formula to calculate the semi-circular area. The endothelial function was studied in rings of the thoracic aorta formed by acetylcholine release. Concentration response curves were then generated by adding cumulative doses of acetylcholine ($10^{-8.0}$ a $10^{-5.5}$ mol/liter) Mortality rates in the groups were verified with correlation of infarct size and action of the drugs on the endothelial function.

The animals were observed every day and information on the group and on animals that died because of the infarct was recorded.

The results indicate that there is not a significant difference in infarction treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor AT1.

Mortality rates after 24 hours were 7.59%, 9.52% and 10.94%, respectively. There is correlation between the infarct size and endothelium dependent relaxation. The endothelium relaxation was expressed in % of relaxation, with the following results:

<u>Rats</u>	<u>% Relaxation</u>
RNN	78,24% $\pm$ 3,57
RSS	40,40% $\pm$ 4,33
RIM	29,29% $\pm$ 6,33
RIG	14,04% $\pm$ 5,20
IECAM	32,69% $\pm$ 4,73
IECAG	48,94% $\pm$ 9,29
AT1M	30,59% $\pm$ 4,65
AT1G	26,98% $\pm$ 7,80

Improvement of the endothelial dysfunction occurs only in the great infarct treated with enzyme conversion angiotensin inhibitors. The cumulative curve made with nitroprusside the results were similar, around 100% of smooth muscle.

CONCLUSIONS

- 1) ACE inhibitors and AT1 blocker don't modified mortality in the experimental of acute myocardial infarction in rats;
- 2) endothelial dysfunction occurs in acute myocardial infarction in rats;
- 3) ACE inhibitors improve endothelial dysfunction determined by acute myocardial infarction in rats;
- 4) blocking the angiotensin II type 1 receptor improve endothelial dysfunction with occurs in experimental acute myocardial infarction in rats.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRE - The acute infarction ramipril efficacy (AIRE) study investigation. Effects of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure . **Lancet** 1993;342:821-828.
- ALMEIDA, E.A.; OZAKI, M.R.; RIBEIRO JORGE, P.A. Estudo da dimensão do infarto do miocárdio experimental em ratos por 5 métodos. In: VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu 1993. P.91 (resumo,2.86)
- ALMEIDA, E. A .; OZAKI, M.R.; RIBEIRO JORGE, P.A. Influência dos inibidores da enzima de conversão na mortalidade e extensão do infarto do miocárdio experimental em ratos. 1994 **Rev. Soc. Cardiologia Est. São Paulo** V 4. No 3(supl B) pág. 26 (resumo 101).
- ANGUS, J. A .; FERRIER, C.P.; SUDHER, F.; KAY, D.M.; JENNINGS, G.L. Impaired contraction and relaxation in resistance arteries from patients with congestive heart failure. **Cardiov.Res.** 1993;27:204-210.
- ANDERSON, T.; MEREDITH, JA.; YEUNG, AC.; FRENHE, B.; SELWYN, AP.; GARY, P. The effects of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium dependent coronary vasomoto. **The New. Eng. J. Med.** 332(8):488-493,1995.
- ARMAYOR, G.M. & LOPEZ, L.M. Lisinopril: a new angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Drugs. Intell. Clin Pharmacol.** 1988;22:365-372.
- AVIRAM, M. Modified forms of low density lipoproteins and atherosclerosis. **Atherosclerosis** 1988(1): 1-9,1993.
- BASSENGE, E. & BUSSE, R. Endothelium modulation of coronary tone. **Prog. Cardiovasc. Dis.**,30:349-380, 1988.
- BAUER, J.H.; REAMS, G.P. The angiotensin II type 1 receptor antagonists. **Arch. Int. Med.**1995;155:1361-1368.

- BEHAR,S.; GOLDBOURT, V.; BARBASH,G. Twenty four years mortality rate decrease in patients in Israel with a first episode of acute myocardial infarction. **Am. Heart J.**1995;130:453
- BRANDES, R.P.; WALLER, T.; KODDENBERG, G.; GWEMER,W.; MUGGE, A. Endothelium-dependent vasodilatation in sprague-dawley rats with posinfarction hypertrophy: Lack of endothelial dysfunction in vitro. **Basic. Res. Cardiol.** 1998;93:463-469.
- BRAGAT, K.; MOSS, R.; COLLIER, J.; VALLANCE,P. Endothelial stinning following a brief exposure to endotoxin – a mechanism to link infection and infarction. **Cardiov. Res.**32:822-829,1996.
- BRODY, J.I.; RICKERING,N.J.; CAPUZZI,D.M. Interleukin-1 alpha as a factor in occlusive vascular diseases. **Am. J. Clin. Pathol.**1992;97:8-13.
- BURKAT,F. Rationale from current treatment. **Eur. Heart J.**16(supplF) 2-3,1995
- BUIKEMA, H.; GILST, W.H.; VELDHUISEN, D.J. Endothelium dependent relaxation in two different models of chronic heart failure and the effect of ibopamine. **Cardiov. Res.** 1993;27:2118-2124.
- BYRON,F.B.; WILSON,C.A. The plethymographic method for measuring blood pressure in the rat. **J. Physiol.** 1938;93:301-304.
- CACHOFEIRO,V.; SAKAKUBARA,T.; NASGLETTI,A. Role of kinin and nitric oxide in the hypotensive effects of captopril and ramiprilat. **Hypertension.**1992;19:134-145.
- CAMPBELL,D.J.; KLADIS,A.; VALENTYN.J. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin converting enzyme. **J. Cardio. Pharmacol.** 1995;26:233-240.
- CHESEBRO, J.H.; FUSTER, V.; WEBSTER, M.W.I. Endothelial injury and coronary vasomotion. **J.Am. Coll. Cardiol.**, 14:1191-1192, 1989.

- CHING-DUSTING, J.P.; KEYR, D.M.; LEFKOVITS, J.; WAY, J.; BERGIN, P.; JENNINGS, G.L. Dietary supplementation with L-arginine fails to restaure endothelial dysfunction in forearm resistance arteries of patients with severe heart failure. **JACC**.27:1207-1213.
- COCKS, T., & Angus, J.A. Biossay of the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from isolated endothelial cells in vitro. In: Bevan JÁ.; Godfraind T, Maxwell RA, Stoclet JS, Worcel M, eds. Vascular Neuroeffector Mechanisms. **Amsterdam: Elsevier**..131-136,1985.
- CONHEN,RA.; VANHOUTTE,PM. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**.92:3337-49,1995.
- CONOVER, W.J. Practical non parametric statistics. New York: John Wiley and Sons,1971
- COOKE, J.P.; ANDON, N.A.; GIRERD, X.J.; HIRSH, A.T.; CREAGER, M.A. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. **Circulation**, 83:1057-1062,1991.
- COTRAN, R. Z.; ROBBINS, S.L.; KUMAR, V. 1996 Pathologic Basis o disaease 5th Edition. WB Saunders Company.
- DAINTY,J.A.; McGRATH,J.C.; SPEEDING,M.; TEMPLETON,A.G.B. The influence of the initial stretch and the agonist-induced tone on the effect of basal and stimulated release EDRF. **Br. J. Pharmacol**.1990;100:767-773.
- DAVIES, MJ.; WOOLF, N. Atherosclerosis. What is it and why does it occurs?. The **British Heart Journal**, v.69; no.1 suppl S3-S11,1993
- DEVREEDE,J.J.M.; GORGELS,A.P.M.; VERSTROATEN,G.M.P. Did prognosis after acute myocardial infarction change during the past 30 years? **JACC**.1991;18:698
- DIAMONDS,J.; BLISARDS,K.S. Effects od stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. **Mol Pharmacol**.1976;12:688-692.

- DICKSTEIN,K.J.; KYKSHUR,J. Comparasion of the effects of losartan and captopril on mortality in patients after acute myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**1999;83:457-481.
- DOHI,T.; THUL,MA.; BUHLER,FR. Activation of endothelial l-arginine pathway in resistance arteries. **Hypertension**,15;170-179,1990.
- DREXLER, H., LU, W. Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. **Am. J. Physiol.** **262**: H1640-1645,1992.
- DUBOIS RANDE, J.L.; ZELINSKY, R.; ROUDOT, F. Effets 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.
- DZAU, V.J.; SONAME, H.; HER, L Vascular reninn-angiotensin system and vascular protection. **J. Cardiov. Pharmacol.**1993;22:S1-S9.
- ERDÖS,E.G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. **Hypertension**,1990;16:365-370.
- FISHBEIN, C.M.; MURBAUN, S.; JACOB, R.; LANDO, U.; KANMATSUSE, J.; MERCIER, M.D. Early phase acute myocardial infarction size quantification: validation of trypheniltetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. **Am. Heart J.** 1981;101:593-600.
- FURCHGOTT, RF. & ZAWADSKI, JV.The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 228:373-376, 1980.
- FURCHGOTT, RF. & Zawadski, JV. Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells. **Fed Proc.**39:581A, 1980b.
- 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, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ.Res.** 1983;53:557-573.
- FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activated inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium -derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte, P.M. ed. *Mechanisms of Vasodilatation*. New York: Raven Press, 1988;401-414.
- FUSTER, V & LEWIS A CONNER. Mechanisms leading to myocardial infarction: Insights from studies of vascular biology. **Circulation**. 90(4):2126-2146, 1994.
- GASRAGLAVIA, G.E.; MESSERLI, F.H.; SCHINIDER, R.E. & FROHLICH, E.D. Immediate and short-term cardiovascular effects of a new converting-enzyme inhibitors (lisinopril) in essential hypertension. **Am. J. Cardiol.** 1988;62:912-916.
- GAVRAS, H.; BRUNNER, H.R.; CARAGH, J.F. An angiotensin converting-enzyme inhibitors to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertension patients. **N.Eng. J. Med.** 1974;291:817-821.
- GEERNDLING, K.K.; MURPHY, T.J. ALEANDER, R.W. Molecular biology of the renin angiotensin system. **Circulation**. 1993;87:1816-1828.
- GISSI-3. Effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6 weeks mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. **Lancet** 1995;343:1115-1122.
- GOLDSTEIN, J.; BASSE, K.; BRAIN, M. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol. **Proceeding Nationaly Academy Science USA; Washington**, v.76 no.1 p.3333-3337, 1979.
- GOHLKE, P.; WOLFGANG, L.; SCHÖLKENS, B.A.; WIEMER, G.; UNGER, T. Cardiac and Vascular Effects of Long-term Losartan Treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 1996;28:397-402

- HALLIWELL,B. Reactive oxygen species in very systems. Source of biochemistry and role in human disease. *The American J. Medicine* 1991;91(suppl3C)3-22.
- HALIWELL,B & CHIRICO,S. Lipid peroxidation: its mechanism measurement and significance. **The Am J. Clin. Nut.** 57(suppl) :715S-724s,1993.
- HARRISON,D.G. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Basic. Res. Cardiol.**1994;89 supplII 87-102.
- HERSH,AT.; DZAN,VJ.; CREAGER,MA. Baroreceptor function in congestivbe heart failure: effects on neuro-humoral activation and regional vascular resistance. **Circulation.**75:IV36-IV48,1987.
- HIRSH,A.T.; DZAU,V.J.; CREAGER,M.A. Barroreceptor function in congestive heart failure: effects of neuro-hormonal activation and respond vascular resistance. **Circulation.**1987;45:36-48.
- HU,KAI.; GANDRON,P.; ANDERS,H.J.; WERDMANM,F.; TURSCHENER, O.;NAHRENDORFF,M.; ERTL,G. Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibitors angiotensin AT1 receptor subtype blockage in rats with myocardial infarction: role of bradykinin. **Cardiov. Res.**1998;39:401-412
- IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of EDRF And its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte, P.M, ed. *Mechanisms of Vasodilatation*, New York: Raven Press, 1988:427-435.
- INOUE, T.; SAKAI, Y.; MOROAKA, S.; HAYASHI, T.; TAKANAGI, K.; YAMAGUCHI, L.I.; TAKABTAKE, Y. Vasodilatory capacity of coronary resistance vesels in dilated cardiomyopathy. **Am. Heart Journal** 1994;127:376-381.
- ISIS-4 Collaborative Group. ISIS 4: A randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. **Lancet** 1995;345:669-685.

- JOHNS, J.N.P.; OLSON, B.J. Experimental myocardial infarction. **Annals of Surgery**. 1954; 140(5):675-680.
- JOHNSTON, C. Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. **Lancet** 1995;346:1403-1407.
- KAISER,L.; SPEEKEARD,RC.; OLIVIER MB. Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. **Am. J. Physiol**. 25:H962-967,1989.
- KATZ, S.D. The role of endothelium-derived vasoactive substances in the pathophysiology of exercise intolerance in patients with congestive heart failure. **Prog. Cardiov. Dis**. 1995;38:23-50.
- KAWAGUCHI, H.; SANO, H.; YASUDA, H. endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. **J. Moll Cell Cardiol**. 1990; 22(8):839-842.
- KRISTENSEN,SD.; RAUNTH,B.; FALK,E. Insights into the patophysiology of unstable coronary artery disease. **Am. J. Cardiol**.80:5E-9E,1997.
- KUBO, S.H.; RECTOR, T.S.; BANK,A.J.; WILLIAMS, R.E.; HERFETZ, S.M. Endothelium-dependent vasodilatation is attenuated in patients with heart failure. **Circulation** 1991; 84:1589-1596
- LANCASTER, SG and TODDY, P.A. Lisinopril. A pharmacodymanic and pharmacokinet properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. **Drugs**. 1988;35:649-669.
- LATINI, R.; MAGGIONI, A. P.; FHATHER, M. ACE inhibitors summary of evidence from clinical trials. **Circulation**.1995;92:3132-3137.
- LYNCH, J.J.; STUMP,G.L.; WALLACE,A.A.; PAINTES,C.A.; THOMAS, J.M.; KUSUO, S.E.; GOULD,R.J.; GRASSMAN,W. EXP3174, the AII Antagonist human metabolite of losartan, but no losartan nor the angiotensin- converting enzyme inhibitors captopril, prevents the development of lethal ischemic ventricular arrhythmias in a canine model of recent myocardial infarction. **JACC**1999;34(3):876-884.

- LUC G.; FURCHGOTT, J.C. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. **The Am. J. of Clin. Nutrition** 53:206S-209S, 1991.
- LUDMER, DL.; SELWYN, AP.; SHOOK, TL.; WAYNE RR.; MUDGE, GH.; ALEXANDER, RW.; KANZ, P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N. Eng. J. Med.** 315:1046-51, 1986.
- MAMODE, N.; COBBE, S.; POLLOCK, J.G. Infarct after surgery. **Br. J. Med.** 1995;310:1215-1216.
- MANCINI, G.B.J.; HENRY, J.C.; MACAYA, C.; O'NEIL, B.J.; PUCILLI, A.L.; CARIERI, R.G.; WARGOVICHI, T.J.; MEDRA, H.; LUSCHER, T.F.; KLEBANES, M.J.; HEBER, H.E.; UPRICICHED, A.G.; PEPIN, C.J.; PITT, B. Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND trial (Trial on reversing endothelial dysfunction). **Circulation**. 1996;94:258-265.
- MANHUKINA, E.B.; LAPHEN, A.V.; MEERSON, F.Z. Physical training limits the fall of blood pressure and the endothelium overactivation in acute myocardial infarction. **Physiol. Res.** 1996;45:261-266.
- MARCOPITTO, L.F.; GOLDFEDER, A.J.; SCHERKMAN, S. Infarto agudo do miocárdio no Estado de São Paulo. Mortes ocorridas em hospitais, de 1979 a 1996, e letalidade hospitalar no SIH/SUS, de 1984 a 1998. / **Arq. Bras. Cardiol.** 1996;74(1):39-42.
- McARIAVEY, D.; ROBERTSON, J.I.S. Angiotensin converting enzyme inhibitors and moderate hypertension. **Drugs**. 1990;40:326-349.
- MCLLENACHAN, J.M.; WILLIAMS, J.K.; FISH, R.D.; SELWYN, A.P. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilatation occurs early in the development of atherosclerosis. **Circulation**, 84:1273-1278, 1991.
- MONCADA, S. & HIGGS, E A. Molecular mechanisms and therapeutics strategies related to nitric oxide. **FASEB J.** 9:1319, 1995.

- MONTGOMERY, D. C. (1991). Design and analysis of Messy Data v.1: Designed experiments. New York: Van Nostrand Reinhold Company
- MULDER,P.; ELFERTAK,L.; RICHARD,V.; CAMPÁGMON,P.; DEVAUX,B.; HENRY,J.P.'SCALBERTt,E.; DISCLE,P.; THEILLY,C. Peripheral artery structure and endothelial function in heart failure: effect of ACE inhibitors. **Am. J. Physiol.**1996;3271: H469-H477.
- NABEL, E.G.; SELWYN, A.P.; GANZ,P. Large coronary arterie in humans are responsive to changing blood flow. An endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis.
- NASA,Y.; TOYOSHIMA,H.; OHAKU,K.; HASHIZUME,V.; SENBE,A.; TAKEO,S. Impairment of cGMP and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. **Am. J. Physiol.**1996;271:H2228-2237.
- OHESSEN, S.P.; CLAPHAM, D.E.; DAVIES, P. Haemodynamics shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. **Nature**,331:168-170, 1988.
- ONTKEAN,M.; GAY,R.; GREENBERG, B. diminuished endothelium-derived relaxing factor activity in na experimental model of chronic heart failure. **Circulation**.69:1088-96,1991.
- 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., ASHTON, DS., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature .**, 333:664-666, 1988a.
- PALMER, RMJ.; REES, DD.; ASHOTOM, 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

- PASSOS,L.L.C.; LOPES,A.A.; LESSA,I.; SANDS,A.; SANTOS,R.J. Tendência da mortalidade por infarto agudo do miocárdio (1981 a 1986) na cidade de Salvador,Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** 2000;74(4):329-331.
- PEARSON,PJ.; SCHAFF,HV.; VANHOUTTE,PM. Acute impairment of endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. **Circ. Res.** 67;385-393,1990.
- PFEIFFER, M.A.; PFEIFFER,T.M.; FISHBEIN, M.C., et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ. Res.** 1979;44:503-512.
- PFEIFFER, M.A.; PFEIFFER, J.M.; BRAUNWALD, E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. **Circ. Res.** 1985;57:84-95.
- PFEIFFER, M.A.; BRAUNWALD, E.; MOYLE, L. ET AL. On behalf of the SAVE investigations. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. **N. Eng. J. Med.**1992;327:685-691.
- PFEIFFER, M.A.; PFEIFFER, T.M.; ZAROUS, G.A.; VAIGRON, D.E. Effects of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. **N. Eng. J. Med.** 1988;319:80-86
- PITT, B. Papel dos inibidores da enzima conversora de angiotensina durante a fase inicial in : Desmond , J & Braunwald, E. Tratamento do infarto agudo do miocárdio. Tradução Deniza Omaná . Editora Futura, RJ. 1996, pag. 254-267.
- POBER, J., GIMBROME,M. Expression of Ia-like antigens by human vascular endothelial cells is inducible in vitro: demonstration by monoclonal antibody binding and immunoprecipitation. **Proc.Nat. Acad. Sci.** 1982,79:6641-6645.
- REIBER, J.H.C.; SENNUYS, P.W.; KOOYMAN, C.J. Assessment of short medium and long term variations in arterial dimension from computer-assisted quantitation of coronary cineangiograms. **Circulation** 1985;71:280-288.

- REES, DD.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85:2334-2338, 1988.
- REES, DD.; PALMER, R.M.J.; HODSON, H.F. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. **Br. J. Pharmacol.**, 96:418-424, 1989.
- RIBEIRO JORGE, P. A.; OZAKI, M.R.; METZE, K. Effects of simvastatin and pravastatin on endothelium dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits. **Exp. Tox. Pathol.** 1994;46:465-469.
- RIBEIRO JORGE, P.A .; OZAKI, M.R.; ALMEIDA, E.A. Endothelial dysfunction in coronary vessels and thoracic aorta of rats exposed to cigarette smoke. **Clin. And Exp. Pharmacol. Physiol.** 1995;22:410-413.
- RIBEIRO JORGE, P.A.; OZAKI, M.R.; ALMEIDA, E.A.; NETO, L.C.; METZE,K. Effects of vitamin E on dependent coronary flow in hypercholesterolemic dogs. **Atherosclerosis.**1996;126:43-51.
- RIBEIRO JORGE, P.A.; OZAKI, M.R.; ALMEIDA, E.A. Rapid reversion of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits treated with simvastatin and pravastatin. **Clin and Exp. Pharmacol. Physiol.**1997; 24:948-953.
- RIBEIRO JORGE, P. A .; NEYRA, L. C.; OZAKI, M.R.; ALMEIDA, E.A. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arq. Bras. Cardiol.** 1998;70:97-91.
- RIBEIRO JORGE, P.A .; NEYRA, L.C.; Ozaki, M.R.; ALMEIDA, E.A . Improvement in the endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic Rabbits treated with vitamin E. **Atherosclerosis.** 1998;140:336-339.

- RUBANYI,G.M.; LORENS,R.R.; VANHOUTTE,P.M. Bioassay of endothelium derived relaxing factors:inactivation by catecholamines. **Am J. Phisiol.**1985;249:H95-H100.
- RUBANYI,G.M.; JOHNS,A. WILCOX,D. Evidence that s-nitrosothiol but not nitric oxide, may be identical with endothelium-derived relaxing factor. **J.Cardiov. Pharmaco** 1991;17:S41-S45.
- SHIMOKAWA, H. & VANHOUTTE, P.M. Impaired endothelium dependent relaxation to agregating platelets and relative vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Circ. Res.** 1989;64:900-914.
- SHIMOKAWA, H. & VANHOUTTE, P.M. Angiographic demonstration of hiperconstriction induced by serotonin and agregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. **J. Am. Coll. Cardiol.** 1991;17:1197-1202.
- SOLVD Investigation. Effects of enalapril on mortality and the development of the heart failure in asymptomatic with reduced left ventricular funtions. **N. Eng. J. Med.** 1992;327:686-691.
- SPINAR,J.; VENOTEC,J.; SPINOVALA,L.; PHELOCK,L.; FISCHIVORA,B.; ZAINAN,J. A Comparasion of intervention with losartans and captopril in acute myocardial infarction. **Eur. Heart. Fail.**2000;112(1):91-100.
- STEINHOFF, G.; BEHREND, M., RICHTER, N. Distinct expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules on endothelial cells in human heart and lung transplants. **J Heart Lung Transpl**,6:1145-1155, 1995.
- STEINBERG,D.; PARTHASARTHT,S., COREN,JE. Beyond cholesterol: modification of low density lypoprotein that increase atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, vol320;14:95-97.1989.

- STEINBRECHER, UP.; PARTHASARATHY,S.; LUCKE,D, WIPP,J.; STEINBERG,D.
Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proc. Nat. Acad. Science USA**.81(12):3883-3887,1984.
- STUNLOFF,G.; BEHREND,M.; RACHEL,N. Distint expression of cell and cell matrix adhesion moilecules on endothelial cells in human heart and lung transplant. **J. Heart Lung. Transp.** 1995;6:1145-1155.
- SWEDBERG, K.; HELD, P.; KJEKSHUS, J.; RASMUSSEN, K.; RYDÉN, L.; WEDEL, H., for the CONSENSUS II study Group. Effects of the early administration of enalapril on m,ortality and ventricular in patients with acute myocardail infarction. **N. Eng. J. Med.**1992;327:678-684.
- TAYLOR,SH. The heart failure syndrome: from prevention to treatment. Foreword. **Eur Heart J**.16(supplF)1,1995
- TCHÖPE, C.; WALTHER, S.; KODE, M.; SPULMERON, F.; WANDORF, M.; LUTNER, E.; SCHULTENS, H.P.; WHALTHER, J. Upregulation of bradykinin b1 receptor expression after myocardial infarction. **British Journal. Pharmacol.**2000;129:1537-1538.
- TEERLINK, J.R.; CLOZEL, M.; FISCHILLI,W.; CLOZWEL,J.P. Temporal evolution of endothelial dysfunction in rat model of chronic heart failure. **J.Am.Coll.CArdiol.** 1993; 22:615-620.
- TILLET,HE.; SMITH,TW. & GOOCH,CD. Excess deaths atributable to influenza in England and Walles: age at death and certified cause. **Int. J. Epidemiol.**12:344-352,1983
- TREASURE, C.B.; VITA, J.A.; COX, D.A.; FISH, R.D.; GORDON, J.B.; MUDGE, G.; COLLUCI, W.S.; SUTTON, M.G.; SELWYN, A.P.; ALEXANDER, R.W. Endothelium dependent dilatation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. **Circulation** 1990;81:772-779.

- TSCHUDI MR.; BARTON,M.; BERSENGER,NA.; CONSENTIN,F.; NOLL,G.; MALENSKI,T.; LÜSCHER,TF. Effects of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. **J. Clin. Inv.** 98;899-905, 1996
- TSUJIKAWA, A.; KRYU, J.; YANASHIRO, K.; NORAKA, A.; HONDA, Y.; OGURA, Y. Interactions between blood cells and retinal endothelium in endotoxic sepsis. **Hypertension** 2000;36(2):250-258.
- UNDERWOOD,R.D.; SO,J.; AKHTERr,M. Evolution and treatment strategies in patients at high risk of sudden death post myocardial infarction. **Clin. Cardiol.**1997;20(9):753-758.
- UREN, NG.; CRAKE,T.; LEFRAG,DC. Reduced coronary vasodilatador function in infarcted and normal myocardium after myocardial infarction. **N. Eng. J. Med.** 331:222-227,1994.
- VANHOUTTE, P.M. BOURLANGS, C.M.; MOMBOULI, J.V. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibitors. **Am. J. Cardiol.** 1995;76(15);3E-12E..
- VAN de WORDE,J AND LEUSEN,I. Endothelium-dependent responses and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. **Am J. Physiol.** 250:H711-717,1986.
- VANE, J.R.; ANGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N.Eng.J.Med.**,323:27-36, 1990.
- VANHOUTTE,P.M & LUSCHER,TF. Vascular endothelium and hypertension. **J. Pharmacol**,1987;10 suppl4,S19-24,1987.
- VOLK , T.; KOX, W.J. Endothelium function in sepsis. **Inflamm Res.** 2000 49(5):185-98.
- VOLTANEN,N.; KUIKKA, A & SRYJANEN,J. Thrombo-embolic complications in bacteraemic infections. **Eur. Heart J.** 14(supplK) :20-23,1993.
- VRINTS, G. & HERMAN, A.G. Role of endothelium in the regulation of coronary artery tone. **Acta Cardiol.**, 46:399-418,1991.

- ZEIHER, A .M.; DREXLER, H.; SAURBER, B.; JUST,H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. **J. Cin. Inv.** 1993;92:652-662.
- ZORNOFF, L.A.; PAIVA, S.R.P.; MATSUBARA, B.; MATSUBARA, L.S.; TUCCI, P.J.F.; SPADARO, J. Efeito do lisinopril sobre parametros cardíacos e mortalidade no infarto experimental em ratos. **Arq. Bras. Cardiol.** 1997;68(3):175-179.
- WITZTEN,P. role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **British Heart Journal**,1993; v.69,n)1:12-18.
- YE, J.; YANG, L.; SETHI, R.; COPPS, J.; RANJIAWAN, B.; SUMMERS,R.; DESLAURIES, R. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. **Moll. Cell. Biochem.** 1997;176(1-2):227-233.
- YEA-HERTUALA, S., PALENSKER.,W., ROSENFELD,M.; STEINBERG,D. Evidence for the presence of oxidatively mopdified low density lipoprotein in atherosclerosis lessons of rabbit and man. **Journal Clin. Invest.** 1989;.84(4): 1086-1095,1989.

