

**CRISTINA EUNICE OKUYAMA**

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA  
DO NITRO-ENALAPRIL (NCX899)**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da Farmacêutica - Cristina Eunice Okuyama.*

*Campinas, 21 de novembro de 2006.*

  
*Prof. Dr. Gilberto de Nucci*  
*- Orientador -*

**CAMPINAS, 2006**

**CRISTINA EUNICE OKUYAMA**

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA  
DO NITRO-ENALAPRIL (NCX899)**

*Tese de Doutorado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para a  
obtenção do Título de Doutor em  
Farmacologia, Área de Concentração  
Farmacologia.*

**ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI**

**CAMPINAS, 2006**

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

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

Ok7a Okuyama, Cristina Eunice  
Avaliação farmacocinética e farmacodinâmica do nitro-  
enalapril (NCX899) /Cristina Eunice Okuyama . Campinas, SP  
: [s.n.], 2006.

Orientador : Gilberto De Nucci  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Enzima conversora de angiotensina. 2. Hipertensão.  
3. Óxido nítrico. I. Nucci, Gilberto de . II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.  
Título.

**Título em ingles : “Pharmacokinetic and Pharmacodynamic evaluation of  
Nitro-enalapril (NCX899)”**

**Keywords:** • Angiotensin-converting enzyme  
• Hypertension  
• Nitric oxide

**Titulação: Doutorado em Farmacologia**

**Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto De Nucci  
Prof. Dr. José Luiz Donato  
Profa. Dra. Marta Helena Krieger  
Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior  
Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará**

**Data da defesa: 21-11-2006**



UNICAMP

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

### Orientador:

**Prof. Dr. Gilberto De Nucci**

### Membros:

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

**Profa. Dra. Marta Helena Krieger**

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

**Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará**

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

**Data: 21/11/2006**

A **Deus**, que me confirmou que só a fé nos faz acreditar que é possível conquistar nossos objetivos. Sem os Seus ensinamentos, eu não teria aprendido com meus erros e realizado este trabalho.

Aos meus pais, **Eunice e Jorge**, pelo incentivo dado em toda a minha vida. Sem vocês eu não seria o que sou e não estaria onde estou. Vocês sempre foram minha força, minha base. Vocês me deram estrutura e nunca me deixaram faltar nada. Sei que vocês fizeram o possível e o impossível para me dar uma boa educação e construir a pessoa que sou hoje. Agradeço a Deus por vocês serem minhas maiores preciosidades.

Aos meus irmãos, **Júnior e Paulo**, que cederam suas oportunidades para que eu tivesse a minha. Tenho certeza que lhes dou muito orgulho neste momento, por alcançar mais este objetivo. Vocês sempre estarão comigo independentemente da distância. Que Deus continue iluminando o caminho de vocês.

Ao meu grande amor, **Fabício**, por todos os dias em que você me ensinou, me ajudou, me ouviu e me amparou. Sem você eu não teria tido forças para lutar e buscar a conquista de mais um objetivo em minha vida. "Hoje e sempre precisarei de você, com qualquer humor, com qualquer sorriso... pois só sua presença, me faz feliz". Mesmo nos momentos mais difíceis você não desistiu. Que Deus continue ao seu lado para você sempre ser esta pessoa iluminada.

A você meu amor eterno.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao **Prof. Dr. Gilberto De Nucci**, pela orientação, e principalmente pela oportunidade de crescimento científico que me permitiu a realização deste trabalho e a conclusão deste Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Edson Antunes**, pela amizade, pela paciência e pelo incentivo constante. Sua participação ativa contribuiu de maneira fundamental na realização deste trabalho e na conclusão deste Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Stephen Hyslop** pela amizade e pela disponibilidade da sua generosidade em momentos fundamentais deste trabalho.

Aos demais docentes e colaboradores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, **Dr. Renato Faro, Prof. Dr. José Luiz Donato, Prof. Dr. Cleber E. Teixeira, Profa. Dra. Sisi Marcondes, Profa. Dra. Angelina Zanesco, Profa. Dra. Elen C. T. Landucci, Profa. Dra. Albetiza Lobo, Prof. Dr. Heitor Moreno Jr, Prof. Marcos Fontana (*in memoriam*)**, pelo convívio, pelo auxílio e pela oportunidade para o desenvolvimento de projetos paralelos, que enriqueceram meus conhecimentos técnicos e científicos, e principalmente pelo desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha **família**, que sempre me incentivou a conquistar os meus objetivos. Em especial ao Sr. Antônio e a Sra. Marfisa, que me apoiaram em diversos momentos e que também contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos **Enilton e Ivani**, pela amizade generosa, pelo exemplo de profissionais e por toda ajuda desempenhada. Obrigada pela compreensão de vocês durante os meus estudos.

Às minhas queridas amigas, **Ju, Li, Ra e Aninha**, que Deus colocou em meu caminho. Sou grata pela torcida e por todos os momentos vividos nestes anos de amizade.

À **Juliana S. Baracat Zeferino** pela sua sólida força de madrinha, que atuou muitas vezes como mãe, como uma rocha e me motivou a trilhar meu caminho. Pela sua amizade e principalmente por ter fortalecido meu lado religioso. Sou muito grata a você por me permitir entrar na sua vida e na vida da sua família. Tenho certeza que seremos eternas amigas.

À **Aline M. Maziero**, pela sua compreensão em todos estes anos que juntas passamos. Você é uma batalhadora! Você foi e continuará sendo meu ouvido e eu o seu. Estes serão anos de muitas lembranças. Lembranças da conquista de uma bela amizade. Amigas, hoje e sempre!

À **Raquel Lorenzetti**, que sempre teve a paciência como uma qualidade admirável. Uma pessoa que transmite paz e que sabe usar as palavras na hora certa. Você é uma pessoa brilhante! Sempre terei comigo sua amizade.

À **Ana C. Montes-Gil**, pela sua amizade, pela sua força em lutar pelos objetivos, e pelo exemplo de profissional. Você é muito forte! Continue sempre batalhando pelo que quer.

A todos os meus **amigos da UNICAMP**: Alice, Andréia, Baú, Camila, Carla, Carol, Christina, Clésio, Daniel, Fabíola, Fernanda Priviero, Fernanda e Marcelo Datti, Haroldo, Humberto, Juliana Moreira, Juliano, Laura, Letícia Bignotto, Letícia Lintomen, Leyge, Luis Gustavo, Luis Otávio, Lourdes, Márcia, Mário, Paula, Rafael Annovazzi, Rafael Morgantti, Renata Pennachin, Renata, Sergio Lilla, Tatiane, Sara.

A todos os **funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP** por todo o respeito, carinho e dedicação com que sempre me receberam e por todos os momentos de ajuda indispensável: Wanderlei, Elaine, Fran, Toninho, S. Miguel, Marcão, José Hilton e Adilson. Em especial ao Guina, que me acompanhou em grande parte dos experimentos.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

*"Digno de admiração é aquele que tendo tropeçado ao dar o primeiro passo,  
levanta-se e segue em frente."*

(Carlos Fox)

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE MATERIAIS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XXII</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 - Hipertensão Arterial .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2 - Fisiopatologia da Hipertensão Arterial.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3 - Sistema Renina-Angiotensina.....</b>	<b>29</b>
1.3.1 - Inibidores da ECA .....	31
1.3.1.1 - <i>Maleato de enalapril.....</i>	<i>31</i>
<b>1.4 - Óxido Nítrico .....</b>	<b>32</b>
1.4.1 - Óxido nítrico e hipertensão arterial.....	34
<b>1.5 - Novos Fármacos.....</b>	<b>36</b>
1.5.1 - Novos fármacos anti-hipertensivos .....	37
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
Objetivo Geral .....	38
Objetivos Específicos .....	38
<b>2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1 – Animais.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 - Avaliação Farmacocinética .....</b>	<b>41</b>
2.2.1 - Protocolo experimental.....	41
2.2.2 - Procedimento experimental.....	42
2.2.2.1 - <i>Extração das amostras .....</i>	<i>42</i>
2.2.2.2 - <i>Análise das drogas.....</i>	<i>42</i>
2.2.3 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa .....	43
2.2.3.1 - <i>Condições cromatográficas e espectrometria de massa.....</i>	<i>45</i>
2.2.4 - Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos .....	45

<b>2.3 - Determinação da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)</b> .....	<b>47</b>
2.3.1 - Protocolo experimental.....	47
2.3.2 - Análise da atividade da ECA em soro por fluorimetria .....	48
<b>2.4 - Avaliação Hemodinâmica</b> .....	<b>48</b>
2.4.1 - Procedimento experimental.....	49
2.4.2 - Protocolo experimental.....	50
2.4.3 - Obtenção dos parâmetros hemodinâmicos.....	50
<b>2.5 - Agregação Plaquetária</b> .....	<b>52</b>
2.5.1 - Agregação plaquetária com plasma rico em plaquetas (PRP).....	52
2.5.1.1 - Procedimento experimental .....	52
2.5.1.2 - Protocolo experimental .....	52
2.5.2 - Agregação plaquetária com plaquetas lavadas (PL).....	53
2.5.2.1 - Procedimento experimental .....	53
2.5.2.2 - Protocolo experimental .....	54
<b>2.6 - Análise Estatística</b> .....	<b>55</b>
<b>3 - RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1 - Avaliação da Espectrometria de Massa Quatro Micro</b> .....	<b>57</b>
3.1.1 - Espectro de massa.....	57
3.1.2 - Cromatogramas.....	59
3.1.3 - Curvas de calibração.....	61
3.1.4 - Demonstração do limite inferior de quantificação (LIQ).....	63
<b>Média</b> .....	<b>63</b>
<b>3.2 - Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos</b> .....	<b>63</b>
3.2.1 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito nitro-enalapril... 63	
3.2.2 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalapril..... 65	
3.2.3 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalaprilato ..... 66	
<b>3.3 - Avaliação da Atividade da ECA</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4 - Relação Farmacocinética e Farmacodinâmica</b> .....	<b>69</b>
<b>3.5 - Parâmetros Hemodinâmicos</b> .....	<b>70</b>
<b>3.6 - Agregação Plaquetária</b> .....	<b>74</b>

3.6.1 - Amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) .....	74
3.6.2 - Amostras de Plaquetas Lavadas (PL).....	75
<b>4 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>5 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS

---

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\mu$	micro
<b>ACD-C</b>	acid-dextrose-citrate-C
<b>ADP</b>	adenosina difosfato
<b>AINES</b>	anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>ang I</b>	angiotensina I
<b>ang II</b>	angiotensina II
<b>ASC</b>	área de superfície corporal
<b>ASC<sub>(0-24h)</sub></b>	área sob a curva
<b>bpm</b>	batimentos por minuto
<b>C</b>	concentração
<b>C<sub>0</sub></b>	concentração plasmática inicial
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>Cl</b>	clearance ou depuração corpórea
<b>C<sub>máx</sub></b>	concentração plasmática máxima
<b>CV</b>	coeficiente de variação
<b>DC</b>	débito cardíaco
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>ECA</b>	enzima conversora de angiotensina
<b>ECA2</b>	enzima conversora de angiotensina 2
<b>EDRF</b>	fator de relaxamento derivado do endotélio
<b>EPM</b>	erro padrão da média
<b>FC</b>	freqüência cardíaca
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	ferro reduzido
<b>GCs</b>	guanilato ciclase solúvel
<b>GMPc</b>	monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina

<b>GTN</b>	gliceril trinitrato
<b>H<sub>2</sub>O</b>	água
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HCT-3012</b>	nitro-derivado do naproxen
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência
<b>i.v.</b>	via intravenosa
<b>IC</b>	índice cardíaco
<b>IECA</b>	inibidores da enzima conversora de angiotensina
<b>IRVS</b>	índice de resistência vascular sistêmica
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>Ke</b>	constante de eliminação
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato ácido de potássio
<b>LIQ</b>	limite inferior de quantificação
<b>L-NAME</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster
<b>L-NIO</b>	N-iminoetil-L-ornitina
<b>L-NMMA</b>	N <sup>ω</sup> -monometil L-arginina
<b>L-NNA</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
<b>M</b>	molar
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>MRM</b>	monitoramento de reações múltiplas
<b>MS</b>	espectrômetro de massa
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sódio
<b>NCX-4016</b>	nitro-derivado do ácido acetilsalicílico
<b>NCX899</b>	nitro-derivado do enalapril
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintase
<b>PAD</b>	pressão do átrio direito
<b>PAM</b>	pressão arterial média
<b>PK/PD</b>	Farmacocinética/farmacodinâmica
<b>PL</b>	plaquetas lavadas

<b>PPP</b>	plasma pobre em plaquetas
<b>PRP</b>	plasma rico em plaquetas
<b>RVS</b>	resistência vascular sistêmica
<b>SNP</b>	nitroprussiato de sódio
<b>SRA</b>	sistema renina-angiotensina
<b>T<sub>1/2</sub></b>	tempo de meia-vida
<b>Tromb</b>	trombina
<b>Vd</b>	volume de distribuição
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	cloreto de zinco

## LISTA DE MATERIAIS

---

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
<b>Acetonitrila</b>	J. T. Baker (EUA)
<b>Ácido cítrico</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Ácido trifluoroacético</b>	Mallinckrodt (EUA)
<b>ADP</b>	Sigma (EUA)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Cateter de Swan-Ganz 7F</b>	Edwards (EUA)
<b>Citrato de fentanila</b>	Janssen-cilag (Brasil)
<b>Citrato de sódio</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Citrato tri-sódico</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Citrato tri-sódico</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Colunas Oasis<sup>®</sup> HLB 1cc</b>	Waters (EUA)
<b>Diazepam</b>	Sanofi (Brasil)
<b>Enalapril</b>	Impex Química S.A. (Barcelona, Espanha)
<b>Enalaprilato</b>	Sigma (EUA)
<b>Enalaprilato-fenil-D<sub>5</sub></b>	CDN Isotopes (Quebec, Canadá)
<b>Enalapril-fenil-D<sub>5</sub></b>	CDN Isotopes (Quebec, Canadá)
<b>Glicose</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>HCl</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>KCl</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>L-NAME</b>	Sigma (EUA)
<b>Metanol</b>	J. T. Baker (EUA)
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>NaCl</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>NaCl</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>NCX899</b>	NicOx Research Institute (Milão, Itália)
<b>Pentobarbital sódico</b>	Cristália Pr. Quím. Farm. (Itapira, Brasil)

<b>Sacarose</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>SNP</b>	Sigma (EUA)
<b>Tris-HCl</b>	Sigma (EUA)
<b>Trombina</b>	Sigma (EUA)
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1:</b> Classificação da pressão arterial.....	266
<b>Tabela 2:</b> Valores da massa de cada analito e de seu íon filho. ....	599
<b>Tabela 3:</b> Valores de limite inferior de quantificação (LIQ) dos analitos.....	633
<b>Tabela 4:</b> Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito nitro-enalapril analisadas em plasma de cão . ....	644
<b>Tabela 5:</b> Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalapril analisadas nos grupos Enalapril e NCX899 em plasma de cão.. ....	666
<b>Tabela 6:</b> Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalaprilato analisadas nos grupos Enalapril e NCX899 em plasma de cão.. ....	677

## **LISTA DE FIGURAS**

---

- Figura 1:** Formação dos peptídeos de angiotensinas. ....299
- Figura 2:** Síntese enzimática do NO a partir da L-arginina pela ação da NOS. ...333
- Figura 3:** Estrutura química dos analitos e padrões internos. (A) nitro-enalapril; (B) enalapril; (C) enalaprilato; (D) enalapril-fenil-D5 e (E) enalaprilato-fenil-D5 ....43
- Figura 4:** Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de nitro-enalapril, enalapril, enalaprilato, enalapril-fenil-D5 e enalaprilato-fenil-D5. ....588
- Figura 5:** Cromatograma HPLC-MS/MS dos analitos obtido em MRM representando a avaliação das amostras extraídas do plasma branco normal. 60
- Figura 6:** Cromatograma HPLC-MS/MS dos analitos obtido em MRM representando a avaliação das amostras de plasma do limite inferior de quantificação (LIQ).. ....61
- Figura 7:** Curvas de calibração dos analitos. ....62
- Figura 8:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito nitro-enalapril em plasma de cão.....644
- Figura 9:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito enalapril nos grupos Enalapril e NCX899 em plasma de cão.....655
- Figura 10:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito enalaprilato dos grupos Enalapril e NCX899 em plasma de cão.....677
- Figura 11:** Efeito do NCX899 e Enalapril na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)... .....688

<b>Figura 12:</b> Relação farmacocinética / farmacodinâmica do Enalapril e NCX899. .....	699
<b>Figura 13:</b> Pressão arterial média dos animais pré-infundidos com NCX899, Enalapril ou Veículo.....	70
<b>Figura 14:</b> Frequência cardíaca dos animais pré-infundidos com NCX899, Enalapril ou Veículo.....	71
<b>Figura 15:</b> Índice cardíaco dos animais pré-infundidos com NCX899, Enalapril ou Veículo.....	72
<b>Figura 16:</b> Índice de resistência vascular sistêmica dos animais pré-infundidos com NCX899, Enalapril ou Veículo. ....	733
<b>Figura 17:</b> Efeito da incubação do SNP, NCX899 ou na agregação induzida por ADP em amostras de plasma rico em plaquetas.....	744
<b>Figura 18:</b> Efeito da incubação do SNP, NCX899 e Enalapril na agregação induzida por de trombina em amostras de plaquetas lavadas.....	755

***RESUMO***

Compostos farmacológicos que liberam óxido nítrico (NO) têm sido utilizados para avaliar o amplo papel do NO na fisiopatologia e terapêutica de diversas doenças. Estudos demonstram que a deficiência de NO está envolvida com a gênese e evolução de diversos estágios de doenças como, por exemplo, a hipertensão. Deste modo, a adição de uma molécula de NO em drogas previamente estudadas vem sendo praticada por diversos pesquisadores na última década. Estes pesquisadores buscam associar as propriedades farmacológicas de cada droga com as atividades proporcionadas pelo NO exógeno. No presente trabalho, comparamos a farmacocinética e a farmacodinâmica do enalapril com as de um nitro-derivado do enalapril (NCX899), em Beagles machos não anestesiados. Os efeitos do enalapril e NCX899 na hipertensão arterial, bradicardia e vasoconstrição periférica induzida pela inibição aguda da síntese de NO em cães anestesiados também foram investigados.

Na avaliação farmacocinética, os cães receberam NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) ou Enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) pela via intravenosa. Em seguida, as concentrações plasmáticas dos analitos e metabólitos foram quantificadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS). No grupo NCX899, a área sob a curva ( $\text{ASC}_{0-24\text{h}}$ ) foi  $29,18 \pm 4,72$ ,  $229,37 \pm 51,32$  e  $5159,23 \pm 514,88$   $\mu\text{gh/l}$  para os analitos nitro-enalapril, enalapril e enalaprilato, respectivamente. No grupo Enalapril, a  $\text{ASC}_{0-24\text{h}}$  foi de  $704,53 \pm 158,86$  e  $4149,27 \pm 847,30$   $\mu\text{gh/l}$  para os analitos enalapril e enalaprilato, respectivamente. As análises estatísticas entre os grupos demonstraram uma diferença significativa para o analito enalapril, mas não para o analito enalaprilato, o metabólito ativo. Entretanto, o NCX899 e o Enalapril foram efetivos de maneira semelhante na inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina sérica.

Em cães anestesiados, a administração intravenosa do inibidor da síntese de NO, o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 0,1-10 mg/kg), elevou significativamente a pressão arterial e causou bradicardia. O composto NCX899 atenuou significativamente a hipertensão arterial, bradicardia e vasoconstrição periférica, enquanto o Enalapril não apresentou efeito significativo.

Além disso, nossos estudos também demonstraram que o NCX899 pode atuar não só como anti-hipertensivo, mas também auxiliar na inibição da agregação plaquetária.

Assim, concluímos que o nitro-derivado do enalapril (NCX899) apresenta uma relação farmacocinética/farmacodinâmica similar ao composto enalapril. No entanto, ao contrário do Enalapril, o NCX899 apresenta um efeito protetor nas alterações cardiovasculares induzidas pela inibição aguda de NO.

Palavras-chave: enzima conversora de angiotensina (ECA), hipertensão, óxido nítrico

***ABSTRACT***

Pharmacological compounds that release nitric oxide (NO) have been useful tools for evaluating the broad role of NO in physiopathology and therapeutics of several diseases. Studies show that lack of NO can cause several diseases such as hypertension. Thus, the addition of a NO molecule in drugs previously studied has been reported by some researchers in the last decade. They look for the combination of the pharmacologic properties of each drug, plus exogenous NO properties. This work has compared the pharmacokinetics and pharmacodynamics of enalapril and a NO-releasing enalapril molecule (NCX899) in conscious male Beagles. The effects of both enalapril and NCX899 in the arterial hypertension, bradycardia and peripheral vasoconstriction induced by acute NO inhibition in anesthetized dogs have also been investigated.

In the pharmacokinetic evaluation, dogs received either NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) or Enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) intravenously. Later, the plasma concentrations of the analytes and metabolites were quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). In the NCX899 group, the area under time-course curve ( $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ) was  $29.18 \pm 4.72$ ,  $229.37 \pm 51.32$  and  $5159.23 \pm 514.88$   $\mu\text{gh/l}$  for the nitro-enalapril, enalapril and enalaprilat analytes, respectively. In the Enalapril group, the  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  was  $704.53 \pm 158.86$  and  $4149.27 \pm 847.30$   $\mu\text{gh/l}$  for the enalapril and enalaprilat analytes, respectively. The statistical analysis between both groups showed a significant difference for the enalapril analyte, but not for enalaprilat, the active metabolite. Moreover, NCX899 and Enalapril were equally effective on inhibiting the activity of serum angiotensin-converting enzyme.

In anesthetized dogs, intravenous administration of the NO synthase (NOS) inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 0.1-10 mg/kg) significantly elevated arterial blood pressure with concomitant bradycardia. The compound NCX899 significantly attenuated arterial hypertension, bradycardia and peripheral vasoconstriction, whereas Enalapril had no significant effect.

In addition, our work showed that NCX899 also has properties of inhibiting the activity of platelets aggregation.

In conclusion, our results showed that the NO-releasing derivative of enalapril NCX899 presents a pharmacokinetic / pharmacodynamic relationship

similar to the enalapril compound. Moreover, different from Enalapril, NCX899 presented protective effect in the cardiovascular alterations induced by acute NOS inhibition.

Key words: angiotensin-converting enzyme (ACE), hypertension, nitric oxide

## **1 - INTRODUÇÃO**

## 1.1 - Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) é caracterizada pelos níveis da pressão arterial acima dos valores de referência. Segundo o VII relatório do *Joint National Committee On Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (2003), a classificação da pressão arterial para adultos acima de 18 anos pode ser definida conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação da pressão arterial.

<b>Pressão Arterial Classificação</b>	<b>Pressão Sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão Diastólica (mmHg)</b>
Normal	< 120	< 80
Pré-hipertensão	120 - 139	80 - 89
Estágio 1	140 - 159	90 - 99
Estágio 2	≥ 160	≥ 100

A HA é um dos fatores de risco mais importantes no estabelecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Este distúrbio cardiovascular afeta aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, e cerca de 7,1 milhões de pessoas morrem por ano pelas complicações causadas por esta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). No Brasil, dados obtidos pela Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH, 2005), revelam que 20% da população brasileira são hipertensas, ou seja, um em cada cinco habitantes é portador dessa patologia.

A prevalência da HA aumenta progressivamente com a idade, em ambos os sexos. A estimativa é que metade das pessoas que têm entre 60 e 69 anos e cerca 3/4 da população acima de 70 anos são afetadas pela doença (SBH, 2005).

Apesar da ampla expansão no desenvolvimento de medicamentos anti-hipertensivos, a HA ainda continua sendo a doença cardiovascular mais comum a levar a morbidade e a mortalidade.

Embora não exista cura para a HA, é possível um controle eficaz, baseado na reformulação de hábitos de vida ou na utilização de medicamentos, permitindo ao paciente uma melhor qualidade de vida.

O tratamento medicamentoso da HA visa a prevenção primária de doenças cardiovasculares e renais, e não o controle de sintomas. Os fármacos rotineiramente utilizados para controle anti-hipertensivo podem ser classificados em diuréticos, antagonistas adrenérgicos, bloqueadores dos canais de cálcio, vasodilatadores e antagonistas do sistema renina-angiotensina. Atualmente, entre os agentes anti-hipertensivos, nitratos, doadores de NO, e drogas que interferem com o sistema renina-angiotensina-aldosterona demonstram oferecer uma grande ferramenta no controle da pressão arterial (VAN BORTEL et al., 2001; RUILOPE e SCHIFFRIN, 2001; TADDEI et al., 2002).

## **1.2 - Fisiopatologia da Hipertensão Arterial**

O desenvolvimento de HA depende da interação entre predisposição genética e fatores ambientais, embora ainda não seja completamente conhecido como estas interações ocorrem. Sabe-se, no entanto, que a hipertensão é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso autônomo simpático, da atividade renal, do sistema renina-angiotensina, além de outros mecanismos humorais e disfunção endotelial (BURKE et al., 1996; SALEH e JURJUS, 2001; LECLERCQ et al., 2002). Assim, a hipertensão resulta de várias alterações funcionais e estruturais do sistema cardiovascular, que tanto amplificam o estímulo hipertensivo como causam dano cardiovascular.

A rigidez arterial é uma das alterações que aumentam a pressão arterial, sendo rapidamente seguida pela ativação do sistema nervoso autonômico. Associado com este processo está o aumento da liberação de catecolaminas e alterações nas atividades dos baroreceptores (ESLER, 2002). Esta resposta é caracterizada pela elevação da pressão arterial, ocasionando perda da função

endotelial responsável pela determinação da resistência periférica total (PLANTE, 2002).

A manutenção, bem como a variação da pressão arterial, foram melhor compreendidas após estudos realizados na camada de células endoteliais que revestem todo sistema vascular (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). O endotélio vascular possui um papel fundamental na regulação basal e dinâmica da circulação. Desta forma, esta monocamada celular pode estar envolvida na patogenia da hipertensão. O endotélio vascular não se comporta apenas como uma barreira passiva que impede a livre saída das células sanguíneas e proteínas para os tecidos, mas também sintetiza e libera uma série de substâncias que controlam as células musculares lisas subjacentes, tais como as prostaglandinas, o tromboxano, as endotelinas e o óxido nítrico (MONCADA et al., 1987; YANAGISAWA et al., 1998; STANKEVICIUS et al., 2003; COCKCROFT, 2005).

O óxido nítrico (NO) é um mediador sintetizado e continuamente liberado pelas células endoteliais, com importante papel na fisiologia da musculatura lisa vascular. Esta substância controla o tônus dos vasos sanguíneos periféricos. A inibição sistêmica da síntese de NO ou o seqüestro de NO causam um estresse oxidativo, levando a um aumento da pressão arterial (SPIEKER et al., 2006).

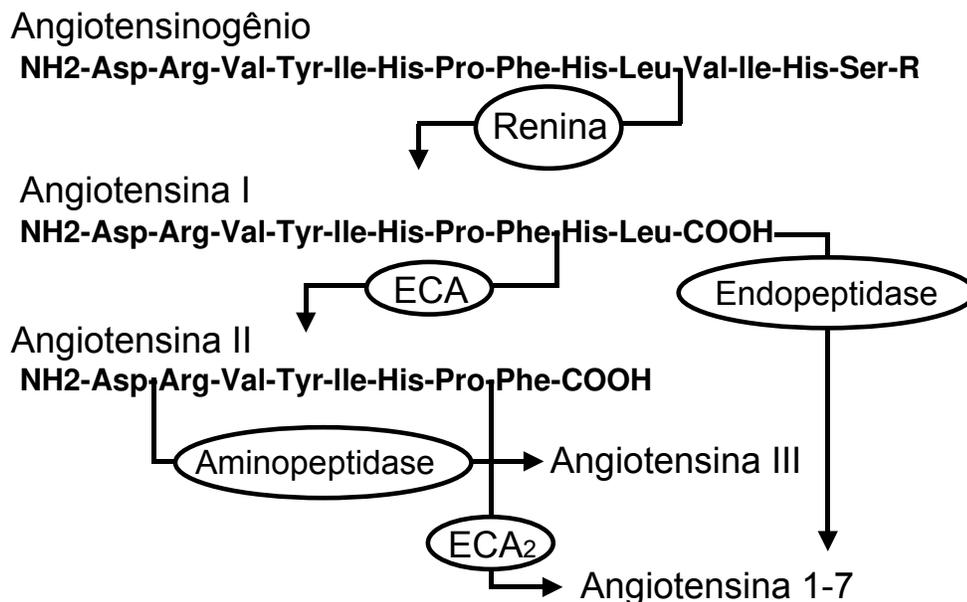
Os rins também desempenham importante papel no controle da pressão arterial. Mecanismos renais estão envolvidos na patogênese da hipertensão, tanto através de uma natriurese alterada, levando à retenção de sódio e água, quanto através da liberação alterada de fatores que aumentam a pressão arterial, como a renina (MULLINS et al., 2006).

A renina é uma enzima que se encontra no sistema renina-angiotensina, e está envolvida na cascata do controle fisiológico da pressão arterial e no controle de sódio e água. O sistema renina-angiotensina apresenta importantes implicações no desenvolvimento da hipertensão renal, e deve estar envolvido na patogênese da hipertensão arterial essencial. O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona no coração, vasos e rins, é mediado pela produção ou ativação de diversas substâncias vasoativas, como a angiotensina II, que induz vasoconstrição e hipertrofia celular (MULLINS et al., 2006).

### 1.3 - Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha importante função no desenvolvimento de hipertensão arterial, aterosclerose, e de outras doenças cardiovasculares (LEU et al., 2004).

Fatores que reduzem a pressão arterial, como a diminuição no volume sanguíneo ou da resistência periférica total, permitem a ativação da liberação de renina (PAUL et al., 2006). A renina é liberada das células justaglomerulares renais e catalisa a formação de angiotensina I (Ang I) a partir da proteína angiotensinogênio. A Ang I é rapidamente convertida em angiotensina II (Ang II) através da enzima conversora de angiotensina (ECA), encontrada principalmente nos vasos pulmonares (Figura 1; FISCHER et al., 2002; PAUL et al., 2006).



**Figura 1:** Formação dos peptídeos de angiotensinas.

A Ang II é um octapeptídeo com papel central na homeostasia cardiovascular. Atua sobre diversos tecidos como a glândula supra-renal, o rim, cérebro, coração, células musculares lisas e sistema nervoso simpático. Classicamente, a Ang II é conhecida como um hormônio sistêmico regulador da pressão arterial, da liberação de aldosterona e da reabsorção de água e sódio pelos túbulos renais. A Ang II exerce seus efeitos biológicos através da ligação a dois subtipos principais de receptores de membrana: AT-1 e AT-2 (CAREY, 2005). A Ang II pode sofrer a ação das aminopeptidases, formando a angiotensina III, e ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>), produzindo a angiotensina 1-7 (Ang 1-7; Figura 1; FERRARIO et al., 2005; FLEMING, 2006).

Semelhante à ECA, a ECA<sub>2</sub> está presente em uma variedade de células e tecidos, como no rim e coração (FLEMING et al., 2005). A Ang 1-7 é um ativo componente do SRA formado a partir da Ang II pela ação da ECA<sub>2</sub>. Estudos relatam que este heptapeptídeo não só se opõe à atividade vasoconstritora da Ang II, como também é um agente anti-arritmico, e protege o miocárdio das lesões cardíacas após reperfusão. Além disso, a Ang 1-7 pode inibir o estresse oxidativo e agir como um agente anti-inflamatório (FERRARIO et al., 2005; SIMOES e SILVA et al., 2006).

A descoberta de uma nova Ang II gerada via quimase de mastócitos tem sugerido novas funções biológicas para a Ang II (MIYAZAKI e TAKAI, 2006). A quimase é uma proteína sérica sintetizada nos grânulos de mastócitos, e liberada principalmente após a migração dessas células para tecidos lesados (CAUGHEY et al., 1990; URATA et al., 1990). Estudos em humanos e em animais demonstram que a atividade da quimase é aumentada em caso de aneurisma na aorta, e seu inibidor previne o desenvolvimento de aneurisma em cães. A quimase também é ativada em caso de doenças cardíacas. Em hamster, o inibidor da quimase reduz a mortalidade após infarto agudo do miocárdio e fibrose cardíaca (MIYAZAKI et al., 2006; KANEMITSU et al., 2006). Outros estudos demonstram que inibidores da quimase são efetivos na prevenção local das desordens cardiovasculares, sem afetar a pressão arterial sistêmica (KIRIMURA et al., 2005).

O SRA tornou-se um alvo freqüente e preferencial para intervenção farmacológica, tanto para o tratamento da hipertensão arterial, como da insuficiência cardíaca (TIMMERMANS et al., 1991; SLEIGHT, 2001). Entre as diversas drogas que intervêm neste sistema, pode-se destacar os inibidores da ECA (TREVETHAN CRAVIOTO, 2001).

### **1.3.1 - Inibidores da ECA**

Os inibidores da ECA (iECA) podem ser classificados em três grupos: (1) grupo formado pelo radical sulfidril, composto basicamente pelo captopril; (2) grupo formado pelo radical carboxil, composto pela maioria das substâncias: como o enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, ramipril, entre outros; (3) grupo formado pelo radical fosforil, composto pelo fosinopril (HARDMAN e LIMBIRD, 2006).

A origem dos iECA vem dos estudos de FERREIRA em 1965 com o veneno obtido da cobra *Bothrops jararaca*. Nesse veneno foi identificado um nonapeptídeo capaz de inibir a ECA. A partir do reconhecimento do potencial terapêutico da inibição da ECA e da estrutura molecular dessa enzima, foi desenvolvido um modelo zinco-metaloprotéico do seu sítio ativo. Uma série de iECA foram criados, e vêm sendo utilizados na prática médica (SMITH e VANE, 2003).

Os iECA pertencem a uma classe de fármacos anti-hipertensivos que atuam sobre o SRA, inibindo a enzima ECA e impedindo a conversão da Ang I em Ang II. Assim, como não há formação de Ang II, também não há vasoconstrição e nem a retenção de água e sódio. Desta forma, os iECA controlam o aumento da pressão arterial (RIBEIRO e MUSCARÁ, 2001).

#### *1.3.1.1 - Maleato de enalapril*

O maleato de enalapril foi o primeiro inibidor da ECA não-sulfidrílico oralmente ativo. É uma pró-droga que, após a ação de esterases circulantes e hepáticas, requer uma hidrólise para formar seu metabólito di-ácido ativo, o

enalaprilato, o qual não é absorvido a partir do trato gastrointestinal (PATCHETT, 1984).

No homem, os parâmetros farmacocinéticos do enalaprilato são: a meia-vida de eliminação inicial ( $T_{1/2\alpha}$ ) de aproximadamente 5 horas, a meia-vida terminal ( $T_{1/2\beta}$ ) de cerca de 30 a 35 horas, e volume de distribuição de aproximadamente 1,7 l/Kg. O enalaprilato é eliminado através da secreção tubular e filtração glomerular. Assim, doses reduzidas são indicadas para pacientes com complicações de origem renal. Estudos demonstram que a  $EC_{50}$  (concentração sérica que causa 50% da inibição da ECA circulante) do enalaprilato em voluntários sadios, situa-se entre 5 e 20  $\mu\text{g/l}$ , com máximos níveis de inibição entre 3 e 5 horas após a administração de uma única dose de 20 mg de maleato de enalapril (RIBEIRO e MUSCARÁ, 2001).

O enalapril vem sendo utilizado no tratamento da hipertensão essencial, da insuficiência cardíaca crônica estável, do infarto do miocárdio, da nefropatia diabética e na redução dos níveis arteriais pressóricos (TABACOVA e KIMMEL, 2001; SONG e WHITE, 2002; BARNETT, 2006).

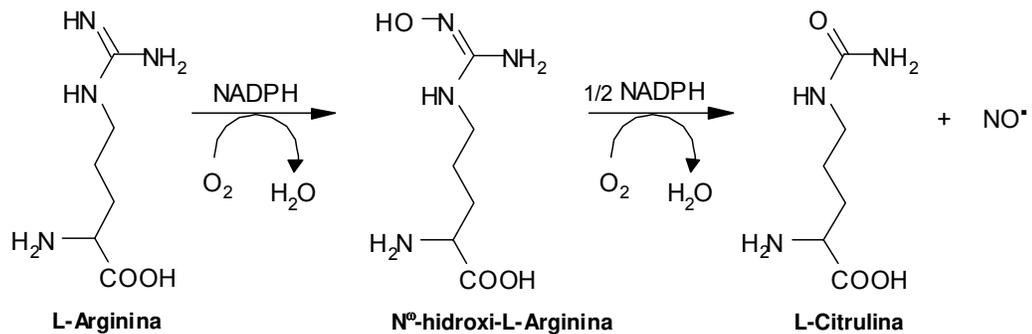
Recentes estudos demonstram que os iECA, como o enalapril, também atuam como agonistas de receptores de bradicinina (B1) estimulando a produção de óxido nítrico, o qual contribui com o efeito anti-hipertensivo dos iECA (IGNJATOVIC et al., 2002; IGNJATOVIC et al., 2004; DE GENNARO COLONNA et al., 2005; SKIDGEL et al., 2006).

#### **1.4 - Óxido Nítrico**

Outro importante componente no grande estudo da hipertensão arterial está a disfunção endotelial. Um dos principais mediadores envolvidos com a homeostasia vascular foi identificado em 1980 por FURCHGOT e ZAWADSKI, e denominado de óxido nítrico (NO).

O NO é sintetizado pelas enzimas NO sintase (NOS), que catalisam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina. O NO e a L-

citrulina são formados em duas etapas (Figura 2), sendo a primeira delas a formação do intermediário N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina (MARLETTA, 1988; MARLETTA, 1993; IGNARRO e MURAD, 1995; KERWIN et al., 1995). Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes, e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutivas (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II; BURCKDORFER, 2005).



**Figura 2:** Síntese enzimática do NO a partir da L-arginina pela ação da NOS.

Uma vez produzido, o NO difunde-se facilmente da célula geradora para a célula alvo, onde interage rapidamente com moléculas específicas. Sua atuação é principalmente local, devido ao fato de possuir uma meia-vida de curta duração no espaço extra-celular antes de ser convertido em nitrito e nitrato pelo oxigênio e a água. De modo geral, o NO reage com o ferro na sua forma reduzida (Fe<sup>+2</sup>), que é encontrado em determinadas proteínas, como, por exemplo, a guanilato ciclase solúvel (GCs, GERZER et al., 1982; IGNARRO et al., 1982; OHLSTEIN et al., 1982). A ligação do NO ao grupamento heme da GCs causa grande aumento da sua atividade catalítica, acelerando a velocidade de formação de monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O GMPc, um nucleotídeo cíclico, modula a atividade de proteínas quinases específicas, regulando diversos processos intracelulares que resultam no

relaxamento do músculo liso vascular (RAPOPORT e MURAD, 1983; BRUCKDORFER, 2005).

#### **1.4.1 - Óxido nítrico e hipertensão arterial**

O NO é conhecido como um potente vasodilatador (IGNARRO et al., 1981; HUANG et al., 1995), além de inibir a adesão (RADOMSKI et al., 1987) e agregação (RADOMSKI et al., 1990) plaquetária. O NO também otimiza a regulação do fluxo sanguíneo na microcirculação (MONCADA e HIGGS, 2006a). No coração, o NO derivado do endotélio modula o relaxamento do miocárdio e a função diastólica, reduzindo o consumo de oxigênio (JONAS e KACZMAREK, 1996; SHAH, 2000; LECLERCQ et al., 2002). Diversos estudos têm demonstrado que a disfunção endotelial na hipertensão essencial está associada com resposta do efeito mediado pelo NO (NASEEM, 2005; SPIEKER et al., 2006). Por este motivo, sua relação com a hipertensão essencial tem sido alvo de intensas investigações.

Nas investigações dos mecanismos envolvendo o NO, foram realizados estudos com compostos estruturalmente análogos à L-arginina, que produz efeito competitivo para inibir a NOS. Inicialmente, foi observado que a N<sup>o</sup>-monometil L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO, e que este efeito era caracterizado pelo fato de ser dependente da dose e de ser específico para a forma levógera (PALMER et al., 1988; REES et al., 1989).

Em 1989, Vallance e colaboradores realizaram a infusão intra-arterial do inibidor da NOS, a L-NMMA, demonstrando que o NO endógeno contribuiu para o restabelecimento do tônus arteriolar e mediou a vasodilatação induzida pela acetilcolina em humanos. A redução do fluxo sanguíneo também foi observada em resposta ao mesmo inibidor da síntese de NO (L-NMMA) em pacientes hipertensos, quando comparada a indivíduos normotensos (CALVER et al., 1992). Este trabalho sugere que o estado de vasodilatação ativa, mediada pela contínua liberação de NO, estaria reduzido na hipertensão arterial essencial.

Outros trabalhos também demonstraram que a produção contínua de NO é essencial para a manutenção do tônus basal de diversos leitos vasculares (HUSSAIN, 1998; HIGASHI e CHAYAMA, 2002), estabelecendo uma homeostase vascular através da atividade constante de vasodilatação da célula muscular lisa (MONCADA e HIGGS, 1993).

Posteriormente, outros compostos inibidores da NOS foram sintetizados para aumentar as ferramentas farmacológicas utilizadas nos estudos com o óxido nítrico, e dentre eles destacam-se: N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, WANG e PANG, 1990), a sua forma metilada N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, MOORE et al., 1990), e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO, MÜLSCH e BUSSE, 1990).

A inibição da síntese de NO pode levar a alterações hemodinâmicas, como hipertensão arterial acompanhada de lesões isquêmicas cardíacas (MORENO et al., 1996) e renais (RIBEIRO et al., 1992; BAYLIS et al., 1992). *In vivo*, como demonstrado por ZAPPELLINI e colaboradores (1996), a inibição aguda da síntese de NO utilizando N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) induz hipertensão arterial em cães anestesiados. A hipertensão arterial decorrente do aumento da resistência vascular sistêmica também é observada em outras espécies animais, tais como: ratos (GARDINER et al., 1990), coelhos (KLABUNDE et al., 1991), gatos (BOWER e LAW, 1993) e humanos (STAMLER et al., 1994). Por outro lado, a inibição da síntese de NO resulta na queda do débito cardíaco (GARDINER et al., 1990).

Atualmente, drogas que modulam a via do NO são grandes ferramentas no controle da pressão arterial e de doenças cardiovasculares. Como exemplos, pode-se citar os nitratos orgânicos que liberam após ação enzimática o NO diretamente na parede vascular (BODE-BOGER e KOJDA, 2005); a L-arginina, substrato da NOS que promove a formação de NO e L-citrulina (MONCADA e HIGGS, 2006b); os ativadores diretos de GCs, como o YC-1, que potencializa a estimulação induzida pelo NO (KO et al., 1994); e o beta-bloqueador, nebivolol, que além de atuar farmacologicamente nos beta-receptores 1, promove a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (SULE e FRISHMAN, 2006).

## 1.5 - Novos Fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos, derivados de um protótipo ou pertencentes a uma determinada classe, aponta para a obtenção de moléculas com melhor perfil farmacocinético, ou melhor relação estrutura-atividade (BELLISSANT et al., 1996).

Atualmente, pesquisadores investem em diferentes métodos para buscar um fármaco ideal no tratamento de doenças, ou para minimizar os efeitos colaterais de drogas já existentes. Para isto, novos compostos e estudos para modificação de drogas através da união de dois compostos, ou a implantação de moléculas em fármacos de referência, vêm sendo realizados.

Os compostos farmacológicos que promovem a liberação de NO têm sido cada vez mais estudados, devido ao amplo papel do NO na fisiologia e terapêutica de diversas doenças. Assim, a adição de uma molécula de NO em drogas previamente estudadas, vem sendo relatada por diversos pesquisadores na última década, que buscam associar as propriedades farmacológicas de cada droga com as atividades proporcionadas pelo NO exógeno (WALLACE et al., 1994; BURGAUD et al., 2002; NAPOLI e IGNARRO, 2003; MARTELLI et al., 2006).

WALLACE e colaboradores (1994) demonstraram que a adição da molécula de nitroxibutil em flurbiprofeno e ketoprofeno reduziu os danos nas injúrias gástricas ocasionadas pelos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), sem interferir nas propriedades de inibir o processo inflamatório e agregação plaquetária.

O nitro-derivado do ácido acetilsalicílico (NCX-4016) foi mais eficiente que a aspirina na inibição da ativação plaquetária, e também apresentou efeito cardioprotetor em ratos (LECHI et al., 1996; MUSCARÁ et al., 2001; WALLACE et al., 2002).

AL-SWAYEH e colaboradores (2000) demonstraram que o nitroparacetamol aumenta a atividade antinociceptiva em ratos e camundongos.

E o nitro-derivado do naproxen, HCT-3012, reduziu a pressão arterial em ratos hipertensos (MUSCARÁ et al., 2000).

Outros estudos também vêm demonstrando as atividades do NO em associação com outra classe de medicamentos, como os anti-hipertensivos, buscando melhorar as propriedades farmacológicas de fármacos de referência (MARTELLI et al., 2006).

### **1.5.1 - Novos fármacos anti-hipertensivos**

De forma comum a todos os fármacos, aqueles empregados no tratamento da hipertensão arterial possuem vantagens terapêuticas inerentes, bem como desvantagens. A busca por novos fármacos anti-hipertensivos que apresentam uma melhor especificidade, aliada a uma diminuição dos efeitos colaterais, é alvo de constantes pesquisas. Contudo, é plausível considerar que, quando um fármaco efetivo é utilizado, medidas adequadas devem ser empregadas para aumentar suas vantagens terapêuticas e minimizar as desvantagens.

Atualmente, os agentes anti-hipertensivos tais como nitratos, doadores de NO, e drogas que interferem no sistema renina-angiotensina-aldosterona, apresentam grande importância no controle da pressão arterial (VAN BORTEL et al., 2001; RUILOPE e SCHIFFRIN, 2001; TADDEI et al., 2002).

Estudos demonstram a existência de outros diferentes agentes doadores de NO, os S-nitrosotiois. Esses trabalhos relatam a investigação da união de um anti-hipertensivo, o captopril (inibidor da ECA), com uma estrutura de S-nitrosotiois, formando o S-nitrosocaptopril. Pesquisadores demonstram que este composto consegue inibir a ECA (PARK, 1992), promove a redução da pressão arterial (SHAFFER et al., 1991), e pode atuar no tratamento de hipertensão pulmonar (TSUI et al., 2003).

Finalmente, em 2004, IWANAGA e colaboradores demonstraram uma nova associação entre um inibidor da ECA, o enalapril, e uma molécula de NO, formando o nitro-derivado do enalapril (NCX899). Este novo composto previne a disfunção e remodelamento cardíaco em *hamsters* com insuficiência cardíaca.

Deste modo, nosso grupo, em parceria com o laboratório NicOx (NicOx Research Institute - Milão - Itália), teve como objetivo analisar outras

características farmacocinéticas e farmacodinâmicas desse novo composto, o nitro-derivado do enalapril (NCX899), visando desta forma ampliar o arsenal terapêutico no tratamento anti-hipertensivo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar as propriedades farmacológicas do NCX899 (nitro-enalapril), que é uma combinação entre inibidor da ECA (enalapril) e uma molécula de NO, e compará-las com as propriedades farmacológicas do maleato de enalapril.

### **Objetivos Específicos**

#### a) Avaliação farmacocinética do NCX899

- Analisar as características farmacocinéticas do maleato de enalapril e do NCX899 por meio do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa.

#### b) Avaliação farmacodinâmica do NCX899

- Verificar o efeito do maleato de enalapril e do NCX899 na atividade da enzima conversora de angiotensina.

- Comparar os efeitos hemodinâmicos do maleato de enalapril e do NCX899 no modelo de hipertensão arterial induzida pela inibição aguda de NO, em cães anestesiados.
- Analisar a atividade *in vitro* do maleato de enalapril e do NCX899 na agregação plaquetária em amostras de sangue humano.

## ***2 - MATERIAIS E MÉTODOS***

## 2.1 – Animais

Foram utilizados cães machos da raça Beagle provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controladas e alimentados com ração padrão. O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (nº 318-1, 08/11/2001).

## 2.2 - Avaliação Farmacocinética

O método analítico aplicado na avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico. Não há um consenso quanto ao melhor método, porém a combinação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada à espectrometria de massa (MS - *Mass Spectrometry*) mostra-se de grande valor na análise de fármacos e seus metabólitos, substâncias endógenas polares e macromoleculares.

### 2.2.1 - Protocolo experimental

Para análise das características farmacocinéticas, os animais foram separados em dois grupos: grupo Enalapril (animais que receberam maleato de enalapril) e grupo NCX899 (animais que receberam nitro-enalapril).

Após a administração pela via endovenosa de enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) ou NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ), foram coletadas amostras de sangue venoso (2 ml) em tubos heparinizados, nos seguintes tempos: 0:00, 0:05, 0:15, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 6:00, 8:00 e 24:00 h. Ao final de cada coleta, o sangue foi centrifugado em 1000 g durante 10 min para obtenção do plasma. O plasma obtido foi congelado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem.

## 2.2.2 - Procedimento experimental

### 2.2.2.1 - Extração das amostras

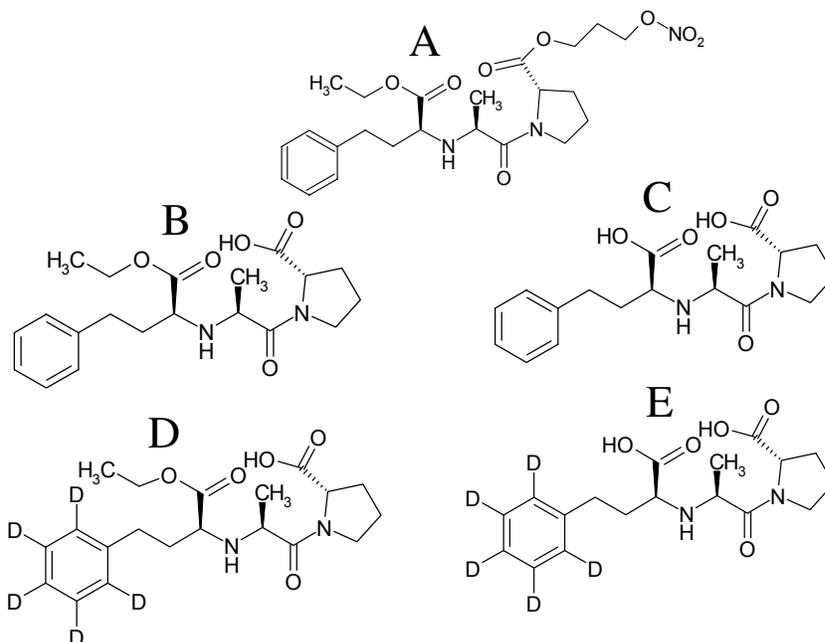
Para cada 500 µl de plasma, foram adicionados os padrões internos (50 µl da mistura de uma solução de enalapril-fenil-D<sub>5</sub> e enalaprilato-fenil-D<sub>5</sub> 0,20 µg/ml), sendo as amostras agitadas por aproximadamente 10 segundos. Também foram adicionados 400 µl de uma solução de HCl 0,1% em H<sub>2</sub>O, e as amostras foram agitadas por mais 10 segundos. Em seguida, as amostras foram transferidas para colunas Oasis<sup>®</sup> HLB 1cc previamente ativadas com metanol e equilibradas com H<sub>2</sub>O. Após a lavagem das colunas por cinco vezes com HCl 0,1% em H<sub>2</sub>O, a amostra foi eluída da coluna com 500 µl de metanol 100%. O eluato foi recolhido e secado sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso com 200 µl de água deionizada pura e agitada por 15 segundos. A solução foi transferida para uma placa de 96 poços e colocada no auto-injetor acoplado a um cromatógrafo líquido de alta pressão, com uma coluna analítica de fase reversa do tipo C<sub>8</sub>. A detecção das massas foi realizada monitorando-se os íons resultantes no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

Os procedimentos apresentados foram aplicados não só na avaliação das amostras, mas também para a extração da curva padrão e nas amostras do controle de qualidade, análises realizadas para validação do método.

### 2.2.2.2 - Análise das drogas

As moléculas de nitro-enalapril (NCX899, N-[(1S)-1-(etoxicarbonil) -3-fenilpropil] -L-alanil-L-prolina maleato de 3-nitrooxipropil éster, NicOx Research Institute (Milão - Itália)), enalapril (Impex Química S.A., Barcelona - Espanha), seu metabólito ativo enalaprilato (Sigma, Sant Louis - EUA), e os padrões internos deuterados (enalapril-fenil-D<sub>5</sub> e enalaprilato-fenil-D<sub>5</sub> (CDN Isotopes, Quebec - Canadá) Figura 3), foram analisadas e quantificadas através do método analítico

de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS/MS).



**Figura 3:** Estrutura química dos analitos e padrões internos. (A) nitro-enalapril; (B) enalapril; (C) enalaprilato; (D) enalapril-fenil-D5 e (E) enalaprilato-fenil-D5.

### 2.2.3 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um método de separação química, normalmente utilizada para a análise de fármacos em fluídos biológicos. Este método é usado para purificação inicial do fluído biológico avaliado, e como introdutor das diferentes substâncias separadas para o dispositivo de análise, que neste caso é o espectrômetro de massa (MS). A análise do HPLC acoplada à espectrometria de massa alia o poder de separação do HPLC à especificidade do espectrômetro de massa como detector (FOUNTAIN, 2002; LEE, 2005).

As amostras biológicas são previamente tratadas antes de serem injetadas no HPLC, por precipitação de proteínas do soro ou plasma, extração líquido-líquido ou líquido-sólido. O método extrativo do analisado pode ter importante impacto sobre a exatidão, precisão e seletividade do processo. Conseqüentemente um padrão interno é adicionado à amostra, no início do processo, para compensar perdas por transferência e variações de volume nas diferentes etapas (FOUNTAIN, 2002; LEE, 2005).

Um dos métodos atualmente utilizados para o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa, é o “eletrospray”, que permite a ionização de compostos não voláteis normalmente analisados por HPLC (FOUNTAIN, 2002).

Os analisadores dos espectrômetros de massa separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga de cada uma, a partir da qual se determinará a abundância e massa de cada espécie iônica. Um dos quatro tipos mais comuns de analisadores é o quadrupolo. Os íons formados no "eletrospray" entram no primeiro quadrupolo do espectrômetro, onde será separada, por potencial elétrico e rádio frequência, apenas a molécula com a relação massa/carga desejada. No quadrupolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com um gás inerte (argônio) e produz fragmentos também carregados. Estes são denominados íons filhos e são característicos para cada substância. Os íons filhos são separados no terceiro quadrupolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação massa/carga são selecionados, pois só eles atravessarão o quadrupolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho, que poderá distinguir íons cuja massa difere em menos de um dálton. E todos os demais íons são refletidos e perdidos nas laterais do aparelho (FOUNTAIN, 2002; LEE, 2005).

Este método analítico é altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas e advindas do cromatógrafo, o primeiro quadrupolo irá separar somente a de massa/carga desejada. Porém, caso haja mais de uma com a mesma relação, a colisão que se dá no segundo quadrupolo irá formar novas

espécies, que serão definitivamente separadas no terceiro, restando somente o íon desejado para o analisador.

#### *2.2.3.1 - Condições cromatográficas e espectrometria de massa*

Foi utilizado um sistema de HPLC modelo LC-10AVP (Shimadzu - Japão), que é composto de uma bomba binária, degasificador, auto-injetor, componente de coluna com termostato e coluna analítica (Jones Chromatography C<sub>8</sub>, 4 µm, 100x2,1mm, i.d.).

A fase móvel consistiu de metanol/água (55/45; v/v), 5 mM de acetato de amônio e 13 mM de ácido trifluoracético. O eluente do HPLC foi monitorado pelo espectrômetro de massa. A coluna foi operada em temperatura ambiente. A temperatura do auto-injetor foi mantida em 13°C e o volume de injeção foi de 10 µl. Um frasco contendo 50% de acetonitrila em água foi previamente preparado e utilizado para lavar o auto-injetor quando necessário.

A espectrometria de massa foi realizada utilizando o Quatro Micro (Micromass, Manchester, Reino Unido) operando em modo de ionização com "eletrospray" positivo (ES+, Micromass, Manchester, Reino Unido).

#### **2.2.4 - Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos**

Os parâmetros farmacocinéticos avaliam a biodisponibilidade de um fármaco analisado, e são obtidos através das curvas de concentração plasmática do fármaco em relação ao tempo.

Após a verificação preliminar dos resultados, ficou estabelecido que o melhor modelo para avaliação farmacocinética da droga em questão foi o modelo de dois compartimentos, representados pelas fases  $\alpha$  e  $\beta$ .

A equação para a determinação dos valores desses compartimentos é:

$$\ln(C) = \ln(A) - \alpha t + \ln(B) - \beta t$$

O valor de  $\beta$ , inclinação da reta, é obtido da porção linear terminal da concentração logarítmica natural versus o tempo da curva, e a interceptação desta porção linear extrapolada para o tempo zero é a concentração representada por B. O coeficiente  $\beta$  também pode ser denominado de constante de eliminação ( $K_e$ ) da fase terminal. Os valores de A (concentração obtida pela extrapolação da reta para o tempo zero) e  $\alpha$  (inclinação da reta) são obtidos pelo método de resíduos da fase de distribuição da droga (WELLING, 1986).

Desta forma, podemos calcular o  $C_0$ , que é a concentração plasmática inicial total obtida pela extrapolação da concentração para o tempo zero. Assim,  $C_0$  pode ser obtido somando-se os valores das concentrações A e B, as quais foram analisadas na equação anterior.

A equação para a aquisição de  $C_0$  é:

$$C_0 = A + B$$

Outro parâmetro que pode ser analisado é o volume de distribuição ( $V_d$ ). O volume de distribuição é o volume aparente de distribuição, e não se refere necessariamente a nenhum compartimento identificável do corpo, e sim ao tamanho de um compartimento necessário para conter a quantidade total de fármaco no corpo, supondo que o fármaco estivesse presente em todo sistema na mesma concentração em que se encontra no plasma. Assim, para estimar o volume de distribuição após administração endovenosa, é necessário fazer a razão entre a dose e a concentração plasmática inicial ( $C_0$ ).

A equação para a obtenção do volume de distribuição ( $V_d$ ) é:

$$V_d = \frac{\text{dose}}{C_0}$$

A concentração plasmática máxima,  $C_{\text{máx}}$ , corresponde ao pico da concentração plasmática após a administração de um fármaco, sendo importante

ressaltar que em caso de administração endovenosa, o fármaco não necessita da absorção para atingir a concentração plasmática máxima.

O tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) é o tempo necessário para que a concentração plasmática ou a concentração do fármaco no organismo se reduza à metade ( $C_0$  passa para  $1/2 C_0$ ).

Assim, o  $T_{1/2}$  de uma droga pode ser obtido através da seguinte relação:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{K_e} \quad \text{ou} \quad T_{1/2} = \frac{0,693 \times V_d}{Cl}$$

O *clearance* (Cl), ou depuração corpórea total, é o fator que reflete a razão de eliminação em relação à concentração da droga.

O Cl pode ser obtido através da seguinte equação:

$$Cl = \frac{\text{dose}}{ASC}$$

A área sob a curva ( $ASC_{0-24h}$ ), útil na mensuração da quantidade total do princípio ativo inalterado que atinge a circulação sistêmica, é proporcional à quantidade de fármaco administrado. A  $ASC_{0-24h}$  é calculada pela integração das médias de área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, desde a administração até a última amostra coletada, aplicando-se a regra trapezoidal.

## **2.3 - Determinação da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)**

### **2.3.1 - Protocolo experimental**

Para a determinação da atividade da ECA, os animais foram separados em dois grupos: grupo Enalapril (animais que receberam maleato de enalapril) e grupo NCX899 (animais que receberam nitro-enalapril).

As amostras de sangue venoso (2 ml) foram coletadas em tubos de ensaio antes e após a administração pela via endovenosa de enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ) ou NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ ). As coletas foram feitas nos seguintes tempos: 0:30, 1:00, 2:00, 3:00, 4:00, 6:00, 8:00 e 24:00 h. Após 10 minutos, o sangue foi centrifugado em 1000 g durante 10 min para obtenção do soro. O soro obtido foi congelado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem.

### **2.3.2 - Análise da atividade da ECA em soro por fluorimetria**

A determinação da atividade da ECA foi realizada através de reação fluorimétrica decorrente da clivagem do substrato Abz-YRK(Dnp)P (ácido o-aminobenzóico - peptidil - [N-(2,4-dinitrofenil) etilenodiamina]P) pela atividade da ECA (ARAUJO et al., 2000). Assim, para a avaliação da reação, foram colocados na cubeta 20  $\mu\text{l}$  de amostra (soro de animais obtido antes e depois da administração de enalapril e/ou NCX899) e 20  $\mu\text{l}$  do substrato em solução tampão 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,0, monitorado em  $37^{\circ}\text{C}$ , contendo 0,05 M de NaCl e 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  (0,35 - 2,0 ml de volume final). As atividades enzimáticas de todas as amostras testadas foram analisadas pela medida de fluorescência em  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm e  $\lambda_{\text{ex}} = 320$  nm utilizando o fluorímetro Hitachi F-2000.

## **2.4 - Avaliação Hemodinâmica**

O controle hemodinâmico inclui parâmetros determinados diretamente, tais como as pressões intravasculares e o débito cardíaco. Outros parâmetros foram calculados indiretamente por meio de fórmulas aplicativas, tais como a resistência vascular sistêmica e o trabalho de ejeção do ventrículo esquerdo.

O cateter intravascular permite a mensuração das pressões através de transdutores eletrônicos de pressão. Esse cateter é preenchido com líquido (solução salina fisiológica heparinizada) e conectado a um eletromanômetro. A onda de pressão intravascular é transmitida ao diafragma do transdutor. O transdutor, em geral, consiste de uma membrana metálica deformável, que transforma o impulso mecânico em elétrico, o qual, por sua vez, é amplificado por um monitor eletrônico, podendo ser registrado em tela ou papel. Tais transdutores e monitores são previamente calibrados e a pressão é dada em milímetros de mercúrio. A precisão do método vai depender não só da adequada calibração do aparelho, como também do emprego do ponto de referência zero apropriado.

Outro cateter empregado em avaliação hemodinâmica é o cateter de Swan-Ganz. Este cateter intravascular pode conter 3 lúmens com termistor incorporado, que permite monitorar a pressão arterial pulmonar, a pressão venosa central ou atrial e verificar o débito cardíaco pelo método de termodiluição (GANZ et al, 1971).

#### **2.4.1 - Procedimento experimental**

Os cães (13 – 18 Kg, n=12) foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol<sup>®</sup>, 30 mg/Kg, i.v.). Após instalação da anestesia, os animais foram entubados com cânula endotraqueal (7,5 ou 8,0, Rüsck, Alemanha) e artificialmente ventilados através de respirador Takaoka, ciclado à pressão. A anestesia foi mantida com uma combinação de citrato de fentanila (Fentanil<sup>®</sup>, 0,01 mg/Kg/h) e diazepam (Dienpax<sup>®</sup>, 0,25 mg/Kg/h).

A artéria femoral esquerda foi canulada a fim de se registrar a pressão arterial sistêmica através do transdutor de pressão (MX-860, Mendex, EUA). A veia femoral esquerda foi canulada para a administração de drogas. Através da veia femoral direita, foi introduzido o cateter de Swan-Ganz 7F (Edwards, EUA), o qual foi locado na artéria pulmonar e conectado a dois outros transdutores de pressão (MX-860, Medex, EUA). Todos os cateteres foram preenchidos com salina heparinizada (10 UI/ml) a fim de evitar a formação de coágulos. Os

parâmetros hemodinâmicos foram visualizados continuamente em uma tela, utilizando-se monitor multiprogramável (SDM 2000, Dixtal, Brasil) acoplado a impressora, que permitiu o registro dos mesmos.

#### **2.4.2 - Protocolo experimental**

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo Enalapril (cães que receberam maleato de enalapril, 20 µg/kg/min), grupo NCX899 (cães que receberam nitro-enalapril, 20 µg/kg/min), e grupo Veículo (cães que receberam solução fisiológica).

Após os animais terem sido anestesiados e a medida do basal coletada, a droga foi infundida a um fluxo de 0,5 ml/min durante 15 minutos. No final deste tempo, foi obtida uma nova medida dos parâmetros, e doses cumulativas de L-NAME (0,1-10 mg/kg) foram infundidas a um fluxo de 0,5 ml/min durante 15 minutos (para cada dose) na presença da infusão da droga em estudo. Subseqüentemente, após a infusão de cada dose do inibidor da NOS (L-NAME), foram realizadas coletas das variáveis hemodinâmicas para verificar a eficácia da droga. As doses de enalapril e L-NAME foram escolhidas através de experiências anteriores com cães anestesiados (ZAPPELLINI et al., 1996; ZAPPELLINI et al., 1997; FARO et al., 1999).

#### **2.4.3 - Obtenção dos parâmetros hemodinâmicos**

Os parâmetros hemodinâmicos medidos diretamente foram: pressão arterial média (PAM), pressão do átrio direito (PAD), frequência cardíaca (FC) e débito cardíaco (DC).

A PAM foi monitorada através dos transdutores eletrônicos de pressão. A PAD foi obtida através do cateter de Swan-Ganz, e a verificação da FC foi realizada através do eletrocardiograma de superfície (de derivação I).

Para a determinação do DC, foi utilizada a técnica de termodiluição. Inicialmente descrita por Ganz e colaboradores (1971), esta técnica consiste na

injeção rápida de 10 ml de soro fisiológico frio (entre 0 e 5°C) através do lúmen proximal do cateter de Swan-Ganz. A determinação do DC é tão mais precisa quanto mais baixa for a temperatura do injetado (soro fisiológico). A fim de calcular o débito cardíaco, o método mede a mudança da temperatura do injetado à medida que esta coluna de líquido se desloca pelo sangue, fornecendo em instantes o débito cardíaco do animal em litros/minuto.

A partir dos valores diretos dos parâmetros hemodinâmicos, foi calculada a resistência vascular sistêmica.

A resistência vascular sistêmica (RVS) é um parâmetro deduzido pela simples relação entre a PAM subtraída da PAD, e depois dividida pelo DC.

A equação para se obter a resistência vascular sistêmica é:

$$RVS = \frac{PAM - PAD \times 80}{DC}$$

Para o cálculo da resistência vascular, 80 é o fator que transforma a unidade de resistência de mm/Hg/l/min para dina.s/cm<sup>5</sup>.

Os resultados de DC e RVS foram expressos sob a forma de índice, no qual os valores foram corrigidos em função da área de superfície corporal (ASC), através da equação de DU BOIS (1916).

$$ASC = 0,0772 \times \text{altura (cm)}^{0,725} \times \text{peso (Kg)}^{0,25}$$

Assim, o índice cardíaco (IC) corresponde ao DC por unidade de superfície corpórea. O índice cardíaco pode ser obtido pela seguinte equação:

$$IC = \frac{DC}{ASC}$$

A RVS também foi expressa em forma de índice: o índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), que é obtido pela seguinte equação:

$$\text{IRVS} = \text{RVS} \times \text{ASC}$$

## **2.5 - Agregação Plaquetária**

### **2.5.1 - Agregação plaquetária com plasma rico em plaquetas (PRP)**

#### *2.5.1.1 - Procedimento experimental*

Sangue humano de voluntários sadios, que não receberam qualquer medicamento durante os 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo citrato tri-sódico 3,8% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido coletando-se o sobrenadante da centrifugação do sangue total a 200 g, a 22°C por 15 min. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000g, em 22°C por 15min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O sangue do mesmo indivíduo nunca foi utilizado mais de uma vez para o mesmo protocolo experimental.

#### *2.5.1.2 - Protocolo experimental*

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Chrono-Log Corporation) calibrado para 0% com plasma rico em plaquetas (PRP) e 100% utilizando-se plasma pobre em plaquetas (PPP).

Em cada ensaio, foi utilizada uma amostra de 400 µl de PRP adicionada em cubetas siliconizadas, mantidas sob agitação constante a 37°C no agregômetro. As amostras foram mantidas nestas condições por 1 min antes da adição do agonista ou inibidor. A agregação foi registrada por 8 a 10 min.

Em PRP foi utilizado ADP (adenosina difosfato) como agonista. Uma curva concentração-resposta de ADP (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) foi realizada para determinar a concentração que causa a resposta sub-máxima. O efeito inibitório de NCX899 (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ), SNP (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ) ou enalapril (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) foi observado na agregação induzida pela concentração de ADP pré-determinada. A droga foi adicionada na cuveta 2 minutos antes da adição do ADP.

A resposta do agente agregante (ADP) foi definida como a diferença na transmissão da luz através da amostra de PRP antes e após a adição de ADP, e expressada como porcentagem da máxima transmissão de luz (porcentagem de transmissão de luz (PPP) – transmissão de luz (PRP)). A resposta inibitória para NCX899, SNP e enalapril foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{ADP (presença de veículo)} - \text{ADP (presença da droga)}}{\text{ADP (presença de veículo)}} \times 100\%$$

## **2.5.2 - Agregação plaquetária com plaquetas lavadas (PL)**

### *2.5.2.1 - Procedimento experimental*

Sangue de voluntários sadios que não receberam qualquer medicamento durante os 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo 9 partes de sangue para 1 parte de citrato tri-sódico 125 mM, ácido cítrico 130 mM e glicose 111 mM (ACD-C). O sangue foi centrifugado a 200 g, a 22°C, por 15 min, e o sobrenadante coletado (PRP-ACD-C). Foi adicionado ao PRP-ACD-C, tampão de lavagem com pH de 6 (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, citrato de sódio 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12,5 mM), e o mesmo foi centrifugado a 800 g, a 20°C, durante 12 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em tampão de lavagem até o volume inicial de PRP, e centrifugadas novamente a 800 g, a 20°C, durante 12 min. Depois, o

sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de plaquetas foi ressuspenso em solução de Krebs-Ringer desprovida de  $\text{Ca}^{2+}$  (NaCl 118 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, glicose 5,6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,7 mM) aproximadamente a metade do volume inicial de PRP (RADOMSKI e MONCADA, 1983). Após contagem manual das plaquetas em câmara de Neubauer, adicionou-se solução de Krebs-Ringer a fim de se obter uma suspensão com  $2,0 \times 10^8$  plaquetas/ml. Antes de iniciar o protocolo experimental de agregação plaquetária, foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  no volume necessário para se obter uma concentração final de 1 mM.

#### *2.5.2.2 - Protocolo experimental*

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Chrono-Log Corporation) calibrado para 0% com suspensão de plaquetas lavadas e 100% utilizando-se solução de Krebs.

Em cada ensaio, utilizamos uma amostra de 400  $\mu\text{l}$  de PL adicionada em cubetas siliconizadas, mantidas sob agitação constante a  $37^\circ\text{C}$  no agregômetro. As amostras foram mantidas nestas condições por 1 min antes da adição do agonista ou inibidor. A agregação foi registrada por 8 a 10 min.

Nos experimentos com PL, foi utilizada trombina humana (Tromb) como agonista. Uma curva concentração-resposta de trombina (10 a 100 mU/ml) foi realizada para determinar a concentração que causa a resposta sub-máxima. O efeito inibitório de NCX899 (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ), SNP (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ) ou enalapril (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) foi observado na agregação induzida pela concentração de trombina pré-determinada. A droga foi adicionada na cubeta 2 minutos antes da adição da trombina.

A resposta do agente agregante (trombina) foi definida como a diferença na transmissão da luz através da amostra de PL antes e após a adição de trombina, e expressada como porcentagem da máxima transmissão de luz (porcentagem de transmissão de luz (solução de Krebs) – transmissão de luz (PL)). A resposta inibitória para NCX899, SNP e enalapril foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{Tromb (presença de veículo)} - \text{Tromb (presença da droga)} \times 100\%}{\text{Tromb (presença de veículo)}}$$

## 2.6 - Análise Estatística

Os resultados da avaliação farmacocinética foram analisados utilizando testes paramétricos (ANOVA), com o auxílio dos softwares WinNolin Professional Network Edition, version 1.5m, GraphPad Prism version 3.0 e WinStat version 3.1. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), e a análise estatística foi realizada através do teste *t* de *Student*, onde valores de  $*P < 0,05$  foram considerados significantes quando comparado entre grupos.

Para a análise dos resultados (expressos como média  $\pm$  erro padrão da média) de atividade da enzima conversora de angiotensina utilizamos o teste *t* de *Student*, onde valores de  $*P < 0,05$  foram considerados significantes quando comparado ao basal e valores de  $\#P < 0,05$  foram considerados significantes na comparação entre grupos.

Os resultados de parâmetros hemodinâmicos (expressos como média  $\pm$  erro padrão da média) foram analisados por one-way análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação Bonferroni. Valores de  $*P < 0,05$  foram considerados significantes quando comparado ao basal e valores de  $\#P < 0,05$  foram considerados significantes na comparação entre grupos.

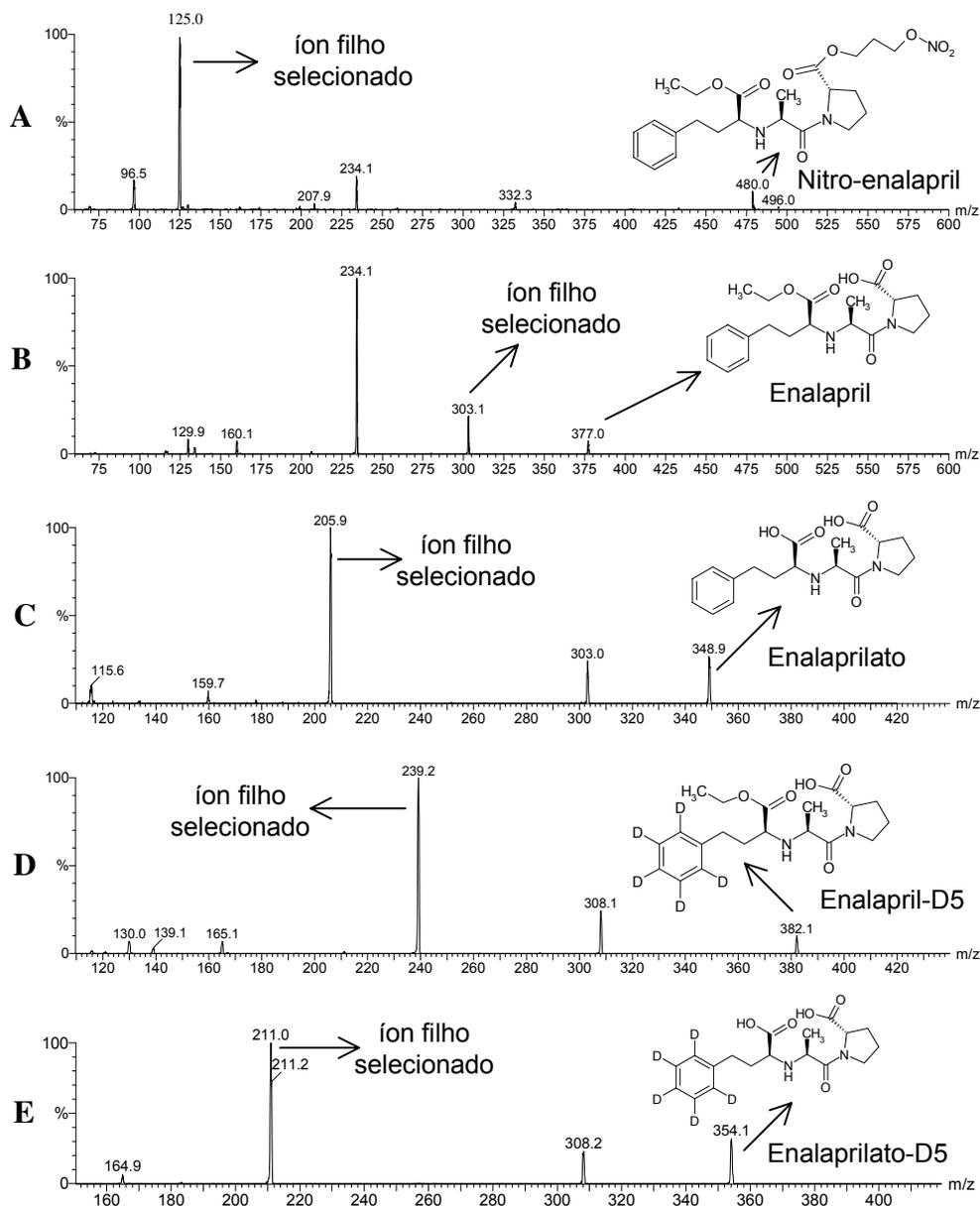
Os resultados de agregação plaquetária também foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, e a análise estatística foi realizada através do teste *t* de *Student*. Valores de  $*P < 0,01$  foram considerados significantes na comparação do grupo NCX899 em relação ao grupo SNP e valores de  $\#P < 0,05$  e  $\#\#P < 0,01$  foram considerados significantes na comparação entre o grupo NCX899 e Enalapril.

### **3 - RESULTADOS**

### **3.1 - Avaliação da Espectrometria de Massa Quatro Micro**

#### **3.1.1 - Espectro de massa**

Os resultados ilustrados na Figura 4 mostram os espectros de massa obtidos das moléculas de nitro-enalapril, enalapril, enalaprilato, dos padrões internos (enalapril-fenil-D<sub>5</sub> e enalaprilato-fenil-D<sub>5</sub>) e seus fragmentos.



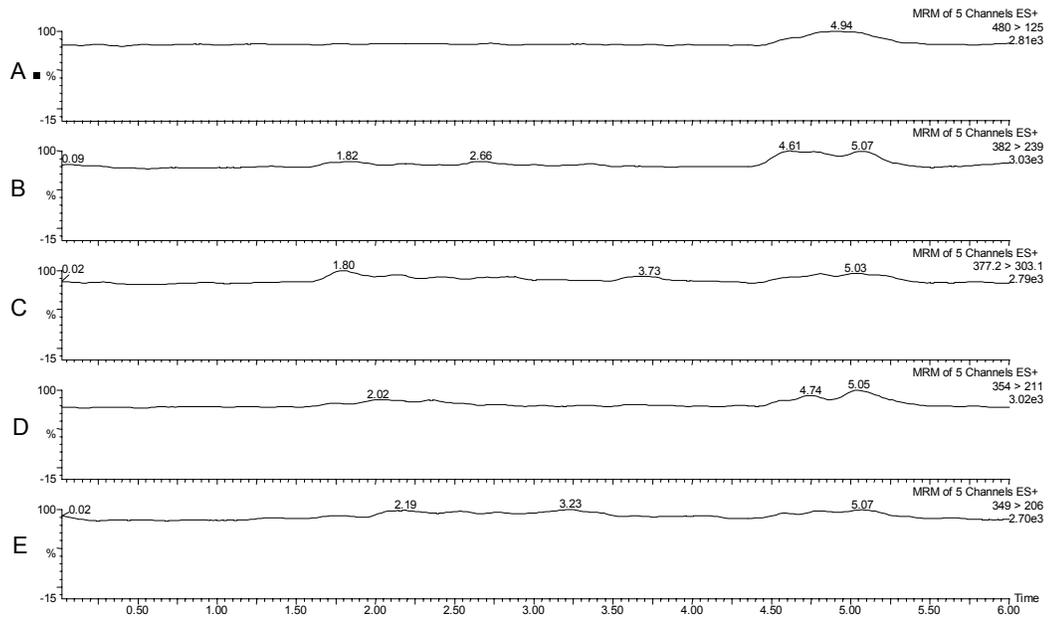
**Figura 4:** Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de (A) nitro-enalapril m/z 480 (fragmento m/z 125); (B) enalapril m/z 377,2 (fragmento m/z 303,1); (C) enalaprilato m/z 349 (fragmento m/z 206); (D) enalapril-fenil-D5 m/z 382 (fragmento m/z 239); (E) enalaprilato m/z 354 (fragmento m/z 211).

### 3.1.2 - Cromatogramas

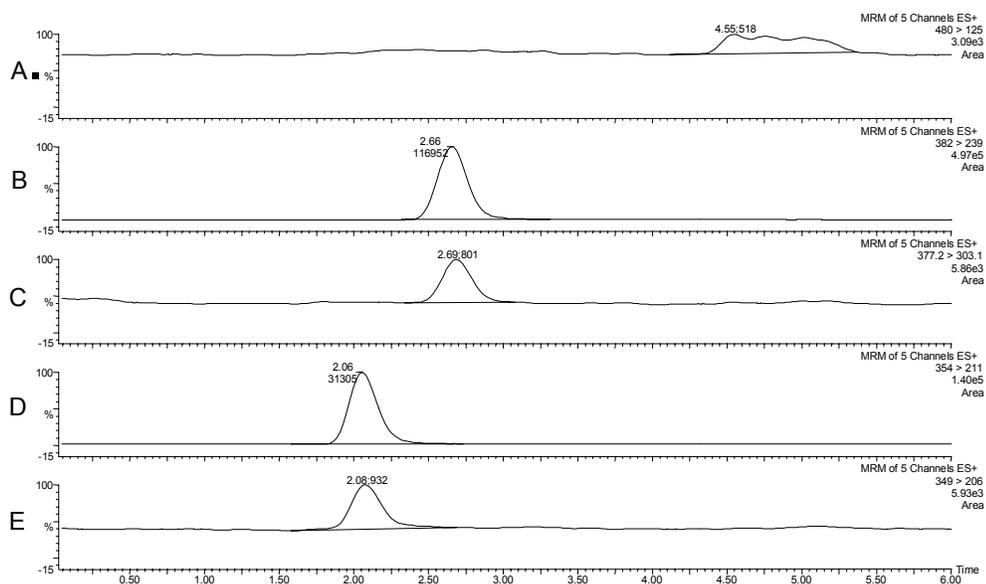
As Figuras 5 e 6 demonstram típicos cromatogramas LC-MS/MS de massas obtidos pelo MRM em massa/carga de nitro-enalapril, enalapril-fenil-D<sub>5</sub> (padrão interno), enalapril, enalaprilato-fenil-D<sub>5</sub> (padrão interno) e enalaprilato. O tempo de retenção foi de 4,6, 2,8, 2,6, 2,1 e 2,1 min, respectivamente, em relação aos analitos citados anteriormente (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores da massa de cada analito e de seu íon filho.

<b>Analitos</b>	<b>MS-MS transição</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
Nitro-enalapril	480 > 125	4,6 ± 0,3
Enalapril	377 > 303	2,6 ± 0,3
Enalaprilato	349 > 206	2,1 ± 0,3
Enalapril-fenil-D <sub>5</sub>	382 > 239	2,8 ± 0,3
Enalaprilato-fenil-D <sub>5</sub>	354 > 211	2,1 ± 0,3



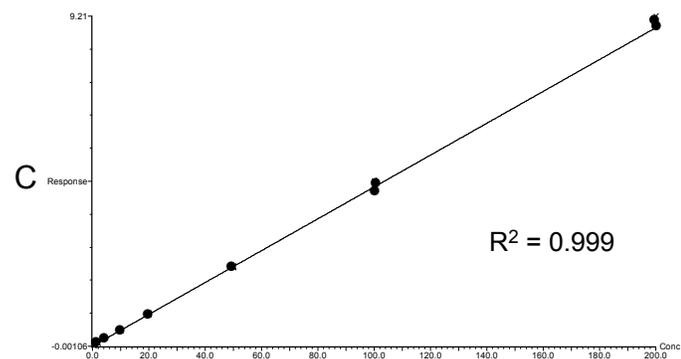
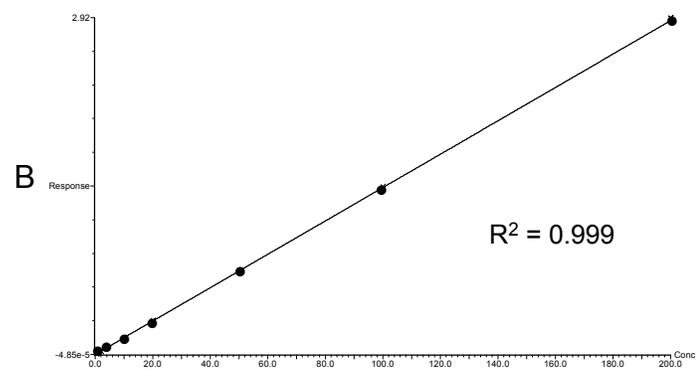
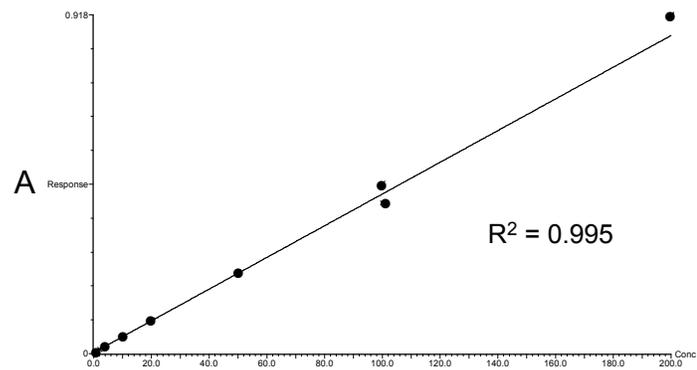
**Figura 5:** Cromatograma HPLC-MS/MS obtido em MRM através de massa/carga e o tempo de retenção, representando a avaliação das amostras extraídas do plasma branco normal. (A) nitro-enalapril, (B) enalapril-fenil-D5 (padrão interno), (C) enalapril, (D) enalaprilato-fenil-D5 (padrão interno) e (E) enalaprilato.



**Figura 6:** Cromatograma HPLC-MS/MS obtido em MRM através de massa/carga e o tempo de retenção, representando a avaliação das amostras de plasma do limite inferior de quantificação (LIQ). (A) nitro-enalapril, (B) enalapril-fenil-D5 (padrão interno), (C) enalapril, (D) enalaprilato-fenil-D5 (padrão interno) e (E) enalaprilato.

### 3.1.3 - Curvas de calibração

Foram obtidas curvas de calibração lineares e com coeficiente de correlação de 0,995, 0,999 e 0,999, para nitro-enalapril, enalapril e enalaprilato, respectivamente, como demonstrado na Figura 7.



**Figura 7:** Curvas de calibração do (A) nitro-enalapril, (B) enalapril e (C) enalaprilato obtidas pela áreas dos picos cromatográficos LC-MS/MS, pela concentração conhecida de padrão interno (0,5 - 200 ng/ml).

### 3.1.4 - Demonstração do limite inferior de quantificação (LIQ)

A padronização da metodologia empregada demonstrou um limite inferior de quantificação dos analitos nas amostras plasmáticas de 0,5 ng/ml. O LIQ foi definido como a mais baixa concentração na curva de calibração, o qual foi estabelecido após análise de 6 preparações de amostras plasmáticas. O que valida o valor do LIQ é a obtenção de valores de coeficiente de variação (CV) e de acurácia, abaixo de 15% e entre 85-115%, respectivamente (Guia da FDA). Na Tabela 3 estão os valores do LIQ observados em cada analito.

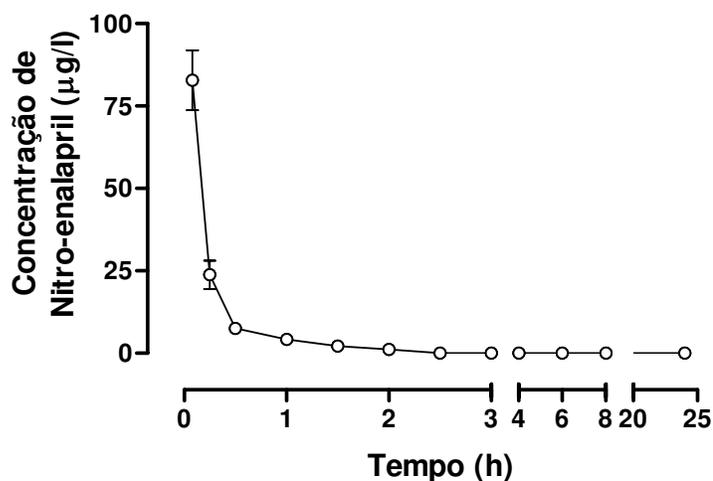
**Tabela 3:** Valores de limite inferior de quantificação (LIQ) dos analitos.

0,5 ng/ml	Nitro-enalapril	Enalapril	Enalaprilato
<b>Média</b>	0,49	0,50	0,51
<b>DP</b>	0,03	0,02	0,02
<b>CV (%)</b>	6,65	3,81	3,54
<b>Acurácia (%)</b>	98,91	99,50	101,55

## 3.2 - Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos

### 3.2.1 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito nitro-enalapril

O traçado da curva concentração-tempo do plasma e os parâmetros farmacocinéticos do analito nitro-enalapril no grupo NCX899 (4 µmol/Kg, i.v.) estão representados na Figura 8 e na Tabela 4. Os valores de nitro-enalapril no grupo Enalapril não foram demonstrados, visto que todos os valores foram encontrados abaixo do limite mínimo de quantificação, conforme o esperado.



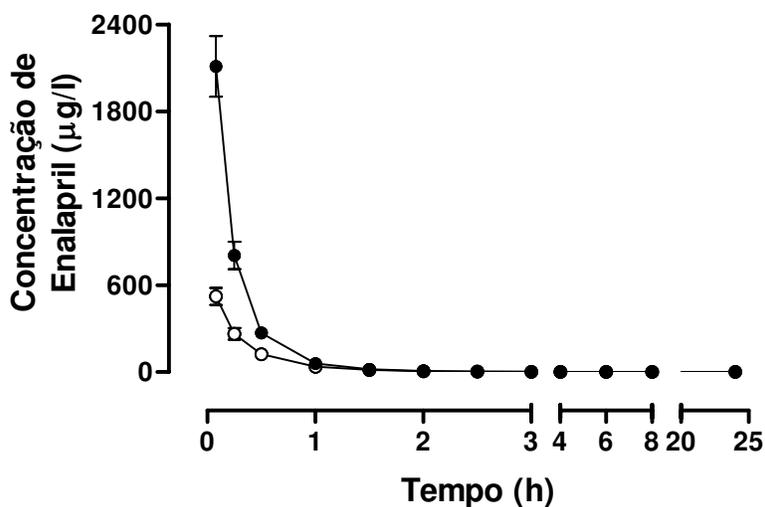
**Figura 8:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito nitro-enalapril (○) em plasma de cão do grupo NCX899 (4 µmol/Kg, i.v., n=5). Os valores são expressos em média ± DP.

**Tabela 4:** Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito nitro-enalapril analisadas em plasma de cão do grupo que recebeu NCX899 (4 µmol/Kg, i.v., n=5). Os valores são expressos como média ± DP.

Analito Nitro-enalapril	
Parâmetros	NCX899
$C_o$ (µg/l)	173,54 ± 29,13
$C_{max}$ (µg/l)	82,81 ± 18,15
$ASC_{0-24h}$ (µgh/l)	29,18 ± 4,72
$T_{1/2}$ (h)	0,12 ± 0,02
Vd (l/kg)	11,82 ± 2,32
Cl (l/h/kg)	69,92 ± 11,32

### 3.2.2 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalapril

O traçado da curva concentração-tempo do plasma e os parâmetros farmacocinéticos do analito enalapril provenientes dos grupos Enalapril (cães que receberam 4  $\mu\text{mol/Kg}$  de maleato de enalapril, i.v., n=5) e NCX899 (cães que receberam 4  $\mu\text{mol/Kg}$  de nitro-enalapril, i.v., n=5) são demonstrados na Figura 9 e Tabela 5. Os valores de  $ASC_{0-24h}$ ,  $C_0$  e  $C_{m\acute{a}x}$  para o analito enalapril foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) no grupo NCX899 quando comparado ao grupo Enalapril. Entretanto, os parâmetros de  $K_e$  e  $T_{1/2}$  não apresentaram diferença entre os grupos.



**Figura 9:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito enalapril nos grupos Enalapril (●, 4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) e NCX899 (○, 4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) em plasma de cão. Os valores são expressos em média  $\pm$  DP.

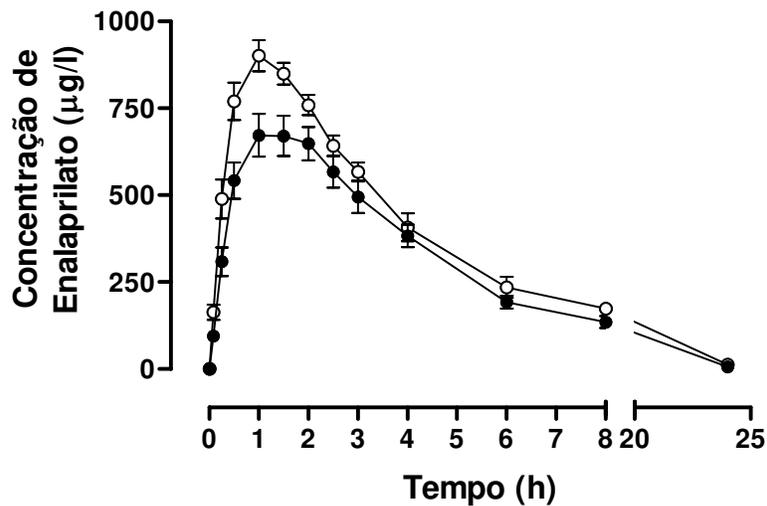
**Tabela 5:** Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalapril analisados nos grupos Enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) e NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) em plasma de cão. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP.

<b>Analito Enalapril</b>		
<b>Parâmetros</b>	<b>Enalapril</b>	<b>NCX899</b>
$C_0$ ( $\mu\text{g/l}$ )	2897,87 $\pm$ 679,02	742,62 $\pm$ 148,88*
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	2110,00 $\pm$ 465,73	522,40 $\pm$ 131,76*
$ASC_{0-24\text{ h}}$ ( $\mu\text{gh/l}$ )	704,53 $\pm$ 158,86	229,37 $\pm$ 51,32*
$K_e$ (1/h)	0,70 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,19
$T_{1/2}$ (h)	0,17 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,05
$V_d$ (l/kg)	0,72 $\pm$ 0,14	2,82 $\pm$ 0,76*
$Cl$ (l/h/kg)	2,95 $\pm$ 0,64	9,05 $\pm$ 1,87*

\* $P < 0,05$  comparado com o grupo Enalapril.

### 3.2.3 - Análise dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalaprilato

O traçado da curva concentração-tempo do plasma e os parâmetros farmacocinéticos do analito enalaprilato dos grupos Enalapril (4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) e NCX899 (4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) estão demonstrados na Figura 10 e Tabela 6. Os valores de  $ASC_{0-24\text{h}}$ ,  $C_0$  e  $C_{\text{máx}}$  do analito enalaprilato não foram diferentes estatisticamente entre o grupo NCX899 quando comparado ao grupo Enalapril. Os demais parâmetros também não apresentaram diferenças estatísticas.



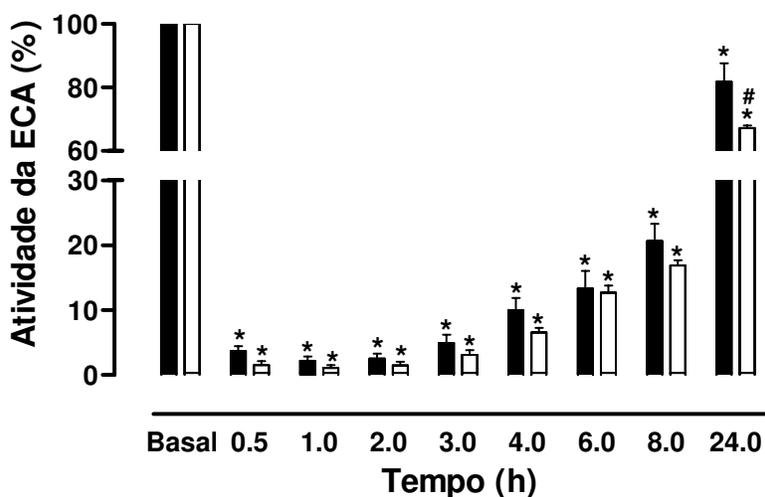
**Figura 10:** Curva concentração-tempo da média da concentração do analito enalaprilato dos grupos Enalapril (●, 4 µmol/Kg, i.v., n=5) e NCX899 (○, 4 µmol/Kg, i.v., n=5) em plasma de cão. Os valores são expressos como média ± DP.

**Tabela 6:** Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito enalaprilato analisados nos grupos Enalapril (4 µmol/Kg, i.v., n=5) e NCX899 (4 µmol/Kg, i.v., n=5) em plasma de cão. Os valores são expressos como média ± DP.

<b>Analito Enalaprilato</b>		
<b>Parâmetros</b>	<b>Enalapril</b>	<b>NCX899</b>
$C_0$ (µg/l)	$883,32 \pm 172,25$	$1025,74 \pm 91,34$
$C_{max}$ (µg/l)	$694,20 \pm 130,56$	$903,20 \pm 97,18$
$ASC_{0-24\ h}$ (µgh/l)	$4149,27 \pm 847,30$	$5159,23 \pm 514,88$
$K_e$ (1/h)	$0,21 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,04$
$T_{1/2}$ (h)	$3,26 \pm 0,13$	$3,69 \pm 0,31$

### 3.3 - Avaliação da Atividade da ECA

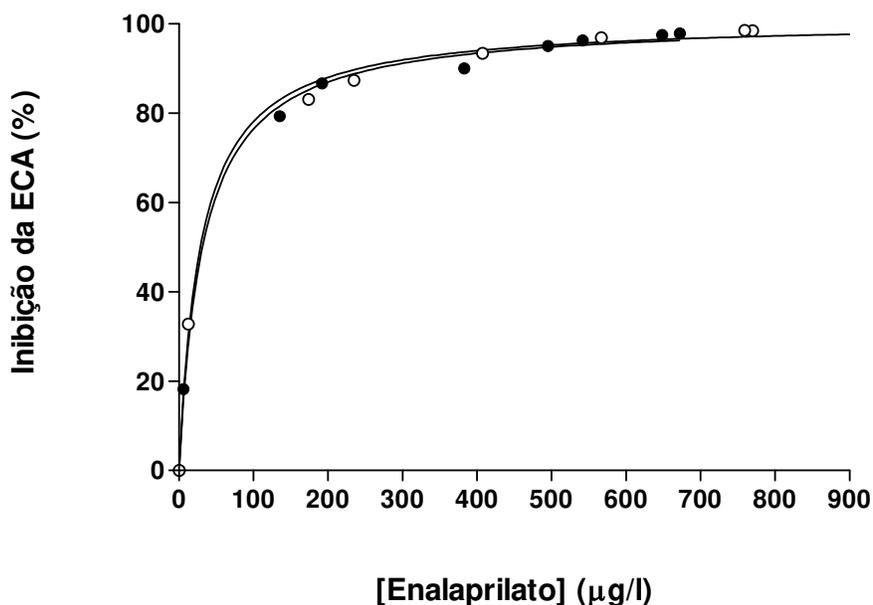
Os grupos NCX899 e Enalapril mostraram que a atividade da enzima conversora de angiotensina foi abolida durante as 4 horas após administração das drogas (Figura 11). Eles mantiveram similar atividade de inibição enzimática, exceto no tempo 24 h quando os animais tratados com NCX899 apresentaram uma significativa inibição ( $32,80 \pm 0,81\%$ ) quando comparado com o grupo Enalapril ( $18,19 \pm 5,82\%$ ;  $P < 0,05$ ).



**Figura 11:** Efeito do grupo NCX899 (□, 4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) e Enalapril (■, 4  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.v., n=5) na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) em soro de cães. Os dados são apresentados como porcentagem de variação aos valores basais (média  $\pm$  E.P.M.). \* $P < 0,05$  foram considerados significantes quando comparados ao basal. # $P < 0,05$  foram considerados significantes quando comparados entre grupos.

### 3.4 - Relação Farmacocinética e Farmacodinâmica

A Figura 12 representa a porcentagem de inibição da ECA no soro em função da média das concentrações plasmáticas de enalaprilato. A relação entre as concentrações no soro de enalaprilato e a porcentagem de inibição da ECA foi descrita com base no modelo de Michaelis-Menten. A equação é representada por  $Y = Y_{\max} \cdot [X] / (I_{50} + [X])$ , onde  $Y$  representa a % de inibição da ECA,  $[X]$  a concentração de enalaprilato ( $\mu\text{g/l}$ ),  $I_{50}$  a concentração de enalaprilato que causa 50% de inibição da ECA e  $Y_{\max}$  a máxima inibição da ECA correlacionada com os valores basais. Os valores de  $I_{50}$  obtidos da curva por regressão linear para os grupos NCX899 e Enalapril foram  $29,1 \pm 2,7 \mu\text{g/l}$  e  $31,9 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$ , enquanto os valores de  $Y_{\max}$  foram  $100,8 \pm 1,1\%$  e  $100,9 \pm 1,3\%$ , respectivamente.



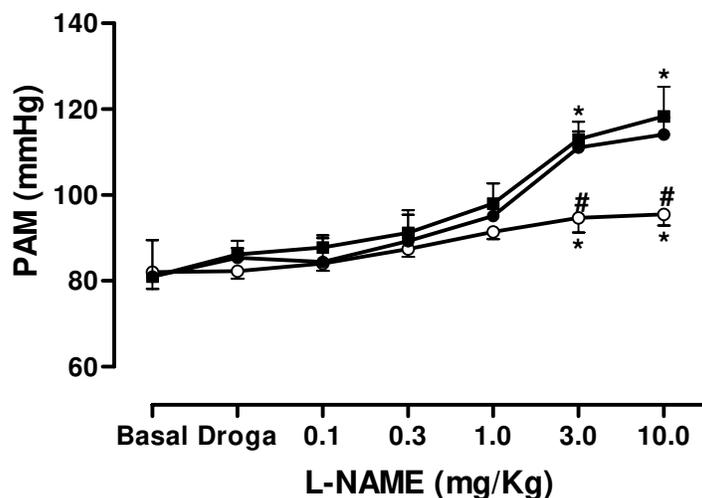
**Figura 12:** Relação entre os valores médios da % de inibição da ECA no soro e a concentração média plasmática de enalaprilato obtida após a administração de Enalapril (●,  $4 \mu\text{mol/Kg}$ , i.v.,  $n=5$ ) e NCX899 (○,  $4 \mu\text{mol/Kg}$ , i.v.,  $n=5$ ).

### 3.5 - Parâmetros Hemodinâmicos

Foram observados os efeitos do Veículo, NCX899 e Enalapril na pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), índice cardíaco (IC) e índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), em cães anestesiados.

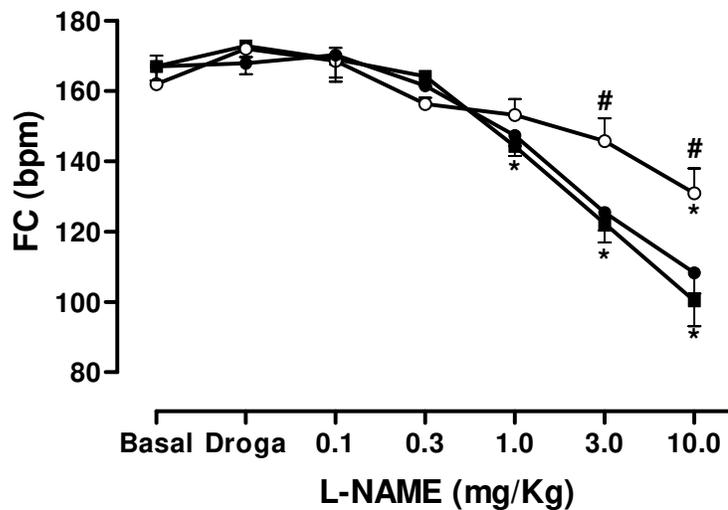
A infusão de Enalapril (20 µg/Kg/min), NCX899 (20 µg/Kg/min) e Veículo (solução fisiológica 0,9%) não afetaram significativamente os valores basais de PAM, FC, IC e IRVS.

No entanto, o aumento na PAM induzida pela infusão aguda de L-NAME (0,1 - 10 mg/Kg) foi atenuado (mas não abolido) nos cães que receberam NCX899, particularmente nas doses de 3 e 10 mg/Kg de L-NAME (Figura 13), quando comparado com os grupos Veículo e Enalapril ( $P < 0,05$ ). Já entre os grupos tratados com Enalapril e Veículo, nenhuma mudança significativa pode ser observada.



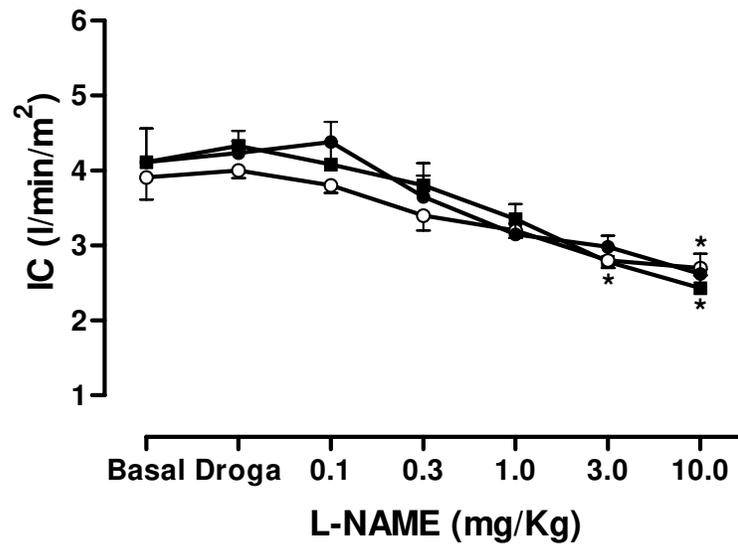
**Figura 13:** Efeito do L-NAME (0,1 - 10 mg/kg) na pressão arterial média (PAM) nos animais pré-infundidos com NCX899 (○, 20 µg/Kg/min, n=4), Enalapril (●, 20 µg/Kg/min, n=4), ou Veículo (■, solução fisiológica 0,9%, n=4). Os valores foram expressos como média ± EPM. \* $P < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados com o respectivo basal. # $P < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados entre grupos.

Nos grupos Enalapril e NCX899, a FC foi diminuída em 35,1% (de  $167 \pm 4$  para  $108,3 \pm 5,9$  bpm,  $P < 0,05$ ) e 19,1% (de  $162 \pm 8$  para  $131 \pm 7,1$  bpm,  $P < 0,05$ ) quando comparado com valores basais, respectivamente (Figura 14). Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos Veículo e Enalapril. Para as doses de 3 e 10 mg/Kg de L-NAME, a frequência cardíaca observada no grupo NCX899 foi significativamente diferente dos valores observados nos grupos Veículo e Enalapril ( $P < 0,05$ ).



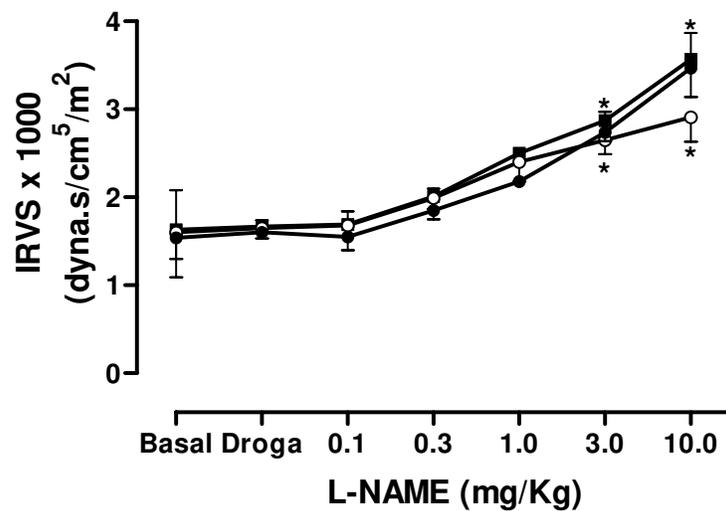
**Figura 14:** Efeito do L-NAME (0,1 - 10 mg/kg) na frequência cardíaca (FC) nos animais pré-infundidos com NCX899 (○, 20  $\mu$ g/Kg/min, n=4), Enalapril (●, 20  $\mu$ g/Kg/min, n=4), ou Veículo (■, solução fisiológica 0,9%, n=4). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados com o respectivo basal. # $P < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados entre grupos.

Os dados apresentados na Figura 15, demonstram que o IC apresentou queda nos grupos Veículo, Enalapril e NCX899 de 40,9% (de  $4,11 \pm 0,45$  para  $2,43 \pm 0,25$  l/min/m<sup>2</sup>), 36,2% (de  $4,11 \pm 0,45$  para  $2,62 \pm 0,27$  l/min/m<sup>2</sup>) e 30,9% (de  $3,91 \pm 0,30$  para  $2,70 \pm 0,10$  l/min/m<sup>2</sup>), respectivamente, durante a realização da curva de L-NAME (0,1 - 10 mg/Kg).



**Figura 15:** Efeito do L-NAME (0,1 - 10 mg/kg) no índice cardíaco (IC) nos animais pré-infundidos com NCX899 (○, 20 µg/Kg/min, n=4), Enalapril (●, 20 µg/Kg/min, n=4), ou Veículo (■, solução fisiológica 0,9%, n=4). Os valores foram expressos como média ± EPM. \**P* < 0,05 foram considerados significativos quando comparados com o respectivo basal.

A infusão de L-NAME (0,1 - 10 mg/Kg) produziu aumento do IRVS nos grupos de cães pré-tratados com Enalapril, NCX899 e Veículo. Este aumento foi de 125,3% ( $1,54 \pm 0,45$  para  $3,47 \pm 0,33$  dyna.s/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup>), 81,8% ( $1,60 \pm 0,30$  para  $2,91 \pm 0,28$  dyna.s/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup>) e de 119% ( $1,63 \pm 0,45$  para  $3,57 \pm 0,30$  dyna.s/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup>), para os grupos Enalapril, NCX899 e Veículo, respectivamente. Estes dados estão representados na Figura 16.

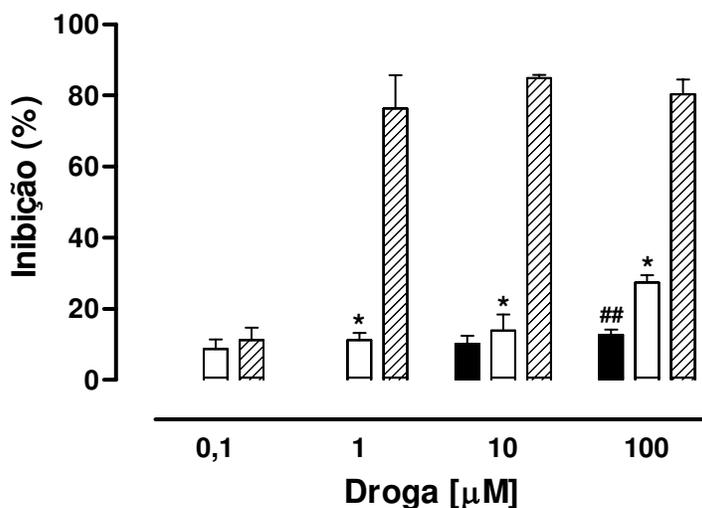


**Figura 16:** Efeito do L-NAME (0,1 - 10 mg/kg) no índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) nos animais pré-infundidos com NCX899 (○, 20 µg/Kg/min, n=4), Enalapril (●, 20 µg/Kg/min, n=4), ou Veículo (■, solução fisiológica 0,9%, n=4). Os valores foram expressos como média ± EPM. \**P* < 0,05 foram considerados significativos quando comparados com o respectivo basal.

### 3.6 - Agregação Plaquetária

#### 3.6.1 - Amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

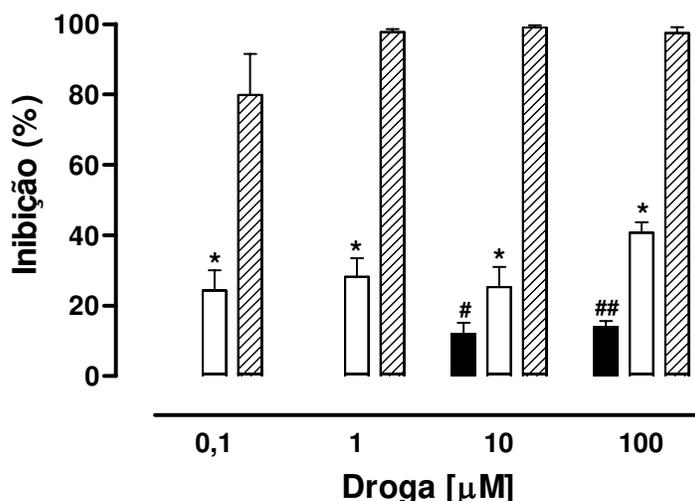
Na Figura 17, podemos observar o efeito do SNP, NCX899 e Enalapril na agregação plaquetária induzida pelo ADP (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) em plasma rico em plaquetas. O SNP (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ) inibiu a agregação plaquetária em aproximadamente 85%, sendo que na menor concentração 0,1  $\mu\text{M}$ , o SNP apresentou uma inibição de 11,1%. Enquanto o NCX899 (0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ) inibiu 27,4% a agregação plaquetária na sua maior concentração. O NCX899 foi considerado significativamente diferente quando comparado ao veículo e ao SNP. Quando comparado ao Enalapril, o NCX899 foi significativamente diferente apenas na maior concentração avaliada (100  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 17:** Efeito da incubação (2 min) do SNP (#; 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ , n=4), NCX899 ( $\square$ ; 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ , n=4) ou Enalapril ( $\blacksquare$ ; 10 e 100  $\mu\text{M}$ , n=4) na agregação induzida por (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) de ADP em amostras de PRP. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,01$  foram considerados significantes, na comparação entre o grupo NCX899 e SNP. ## $P < 0,01$  foram considerados significantes entre os grupos NCX899 e Enalapril.

### 3.6.2 - Amostras de Plaquetas Lavadas (PL)

Na Figura 18, podemos observar o efeito do SNP, NCX899 e Enalapril na agregação plaquetária induzida pela trombina (10 a 100 mU/ml) em amostra de plaquetas lavadas. O SNP (0,1 a 100  $\mu$ M) inibiu aproximadamente 100% a agregação plaquetária induzida pela trombina. O NCX899 (0,1 a 100  $\mu$ M) inibiu 40,7% a agregação plaquetária na sua maior concentração. O NCX899 foi considerado significativamente diferente quando comparado ao veículo, ao SNP e ao Enalapril.



**Figura 18:** Efeito da incubação (2 min) do SNP (#; 0,1 a 100  $\mu$ M, n=4), NCX899 ( $\square$ ; 0,1 a 100  $\mu$ M, n=4) e Enalapril ( $\blacksquare$ ; 10 e 100  $\mu$ M, n=4) na agregação induzida por (10 a 100 mU/ml) de trombina em amostras de PL. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,01$  foram considerados significantes, na comparação entre o grupo NCX899 e SNP. # $P < 0,05$  ou ## $P < 0,01$  entre os grupos NCX899 e Enalapril.

#### ***4 - DISCUSSÃO***

O arsenal de medicamentos disponíveis para o tratamento da hipertensão arterial permite intervenções em vários sistemas e mecanismos envolvidos na gênese e na patologia já instalada. Alguns parâmetros, entretanto, representam desafios no tratamento anti-hipertensivo, tais como a manutenção do tratamento e o permanente controle da pressão arterial ao longo do tratamento. Estes fatores são certamente os maiores determinantes do sucesso que se imagina ter com as intervenções medicamentosas.

Para caracterizar estudos com um novo fármaco, se faz necessária a compreensão do mecanismo de ação, de seus efeitos e de suas propriedades farmacocinéticas. Atualmente, vários estudos têm demonstrado que a associação de drogas com atividades farmacológicas pré-estabelecidas pode melhorar a terapêutica anti-hipertensiva (MARTELLI et al., 2006). Uma delas está relacionada com a adição de uma molécula de NO em fármacos de referência (NAPOLI e IGNARRO, 2003), já que o NO é um dos mediadores que controla a homeostasia vascular.

No presente trabalho, a farmacocinética do NCX899 (nitro-derivado do enalapril) foi avaliada em cães saudáveis, em comparação ao maleto de enalapril (inibidor da ECA de referência). Nesta análise, realizamos a determinação dos analitos nitro-enalapril, enalapril e enalaprilato pelo método LC-MS/MS, através do qual diferentes parâmetros analíticos foram desenvolvidos, possibilitando que se conseguisse determinar um limite inferior de quantificação (LIQ) de 0,5 ng/ml. Isso caracteriza que o método, além de ser exato e preciso, apresenta grande sensibilidade, podendo ser comparado com outros estudos que também realizaram a quantificação dos analitos enalapril e enalaprilato através de um sistema semelhante ao utilizado (YOON et al., 2004; GU et al., 2004).

Os valores dos analitos enalapril, enalaprilato e nitro-enalapril foram avaliados em ambos os grupos (Enalapril e NCX899) após a administração de uma simples dose. Os valores de  $C_0$ ,  $C_{máx}$  e  $ASC_{0-24h}$  plasmáticos do analito enalapril quantificados no grupo NCX899 foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo Enalapril. Isso demonstrou uma diferença na quantidade total do analito enalapril na circulação sistêmica. Estes baixos valores de quantidades

plasmáticas do analito enalapril no grupo NCX899, não são considerações tão relevantes, já que não houve diferença significativa na quantificação do metabólito ativo do enalapril, o enalaprilato, entre ambos os grupos. Esses dados caracterizam semelhante perfil metabólico (concentração de enalaprilato) da molécula de nitro-enalapril quando comparado à molécula enalapril, já que o nitro-enalapril, após sofrer algumas reações, produz o enalaprilato. Uma das hipóteses quanto a diferença significativa da concentração do analito enalapril em ambos os grupos, mas similar concentração de enalaprilato, é que parte da molécula do nitro-enalapril esteja sendo metabolizado em nitro-enalaprilato e em seguida em enalaprilato.

Todavia, o grupo NCX899 inibiu a atividade enzimática da ECA de modo tempo-dependente, e essa inibição persistiu até 24 horas após sua administração. O mesmo pôde ser observado em nossos resultados com o grupo Enalapril, o que já é bem fundamentado em trabalhos previamente publicados com inibidores da ECA (TAKADA et al., 1982; MENG et al., 1995). Com isso, podemos sugerir que a inibição da ECA deve estar relacionada com a presença, em ambos os grupos, de enalaprilato, o metabólito ativo do enalapril.

Os dados da inibição da ECA podem ser utilizados como apropriada medida farmacodinâmica aguda. A Figura 11 demonstra que as curvas de inibição da ECA no soro, versus tempo, foram semelhantes para as duas drogas. A inibição máxima da ECA (aproximadamente 100% em relação aos valores basais) foi observada por 4 horas após a administração do Enalapril ou NCX899. Após esse instante, foi observada inibição menor que 50% ao longo das 4 horas seguintes.

Com base na relação entre as concentrações de enalaprilato circulante e o grau de inibição da ECA sérica (Figura 12), observamos que o grau de inibição da enzima não é diretamente proporcional às concentrações de enalaprilato circulantes (salvo na região das concentrações de enalaprilato mais baixas). Deste modo, concentrações maiores de enalaprilato promovem inibição quase total da atividade da ECA, e assim, a medida da atividade da ECA não parece ser um

modelo farmacodinâmico apropriado para avaliar biodisponibilidade desta classe de hipotensores.

Além disso, o resultado da atividade enzimática mostra que o NCX899 possui um melhor perfil de inibição da ECA, embora não significativo, quando comparado ao maleato de enalapril. Este efeito talvez esteja relacionado à associação da molécula de NO com o inibidor da ECA, já que estudos relatam que o NO endógeno e exógeno podem modular diretamente a enzima conversora de angiotensina (HIGASHI et al., 1995; ACKERMANN et al., 1998; PERSSON et al., 2000).

Uma das possíveis explicações para atuação do óxido nítrico na ECA está relacionada ao sítio ativo desta enzima. A enzima, que é uma carboxipeptidase, separa pares de aminoácidos básicos, e seu sítio ativo é composto por um átomo de zinco (WEI et al., 1991). Como o NO consegue se ligar ao  $Fe^{2+}$  da guanilato ciclase (DEINUM et al., 1996) e da hemoglobina (SAMPATH et al., 1994), sugere-se que este se ligue ao  $Zn^{2+}$  encontrado na ECA (PERSSON et al., 2000), já que os inibidores da ECA atuam neste mesmo sítio ativo. Outros trabalhos também demonstraram que o NO modula a inibição da ECA em ratos (ACKERMANN et al., 1998) e porcos (PERSSON e ANDERSSON, 1999).

Todavia, já é bem estabelecido que o óxido nítrico possui um papel fundamental no controle da pressão arterial, através da manutenção de um estado ativo de vasodilatação (MONCADA e HIGGS, 1993). A administração aguda do inibidor não-seletivo da NO sintase, L-NAME, aumenta a resistência vascular sistêmica e a pressão arterial, as quais podem estar associadas com a diminuição do débito cardíaco e frequência cardíaca (GARDINER et al., 1990; VAN GELDEREN et al., 1993; STAMLER et al., 1994).

Conseqüentemente, em nossos estudos, a administração aguda de L-NAME em cães anestesiados elevou de maneira dose-dependente a pressão arterial, que foi acompanhada pela bradicardia. Simultaneamente, a infusão de enalapril nestes animais não afetou a pressão sangüínea nem a frequência cardíaca. Assim, de maneira semelhante ao encontrado em estudos prévios em cães, nossos resultados mostraram que as alterações cardiovasculares

provocadas pelo L-NAME não são dependentes da ativação da ECA (ZAPPELLINI et al., 1996).

Inibidores da ECA são freqüentemente efetivos no tratamento de alterações cardiovasculares produzidas pela inibição prolongada da síntese de NO. Nessa condição, a hipertensão arterial é geralmente acompanhada por alterações estruturais no coração, tais como fibroses do miocárdio, necroses, hipertrofia ventricular e alterações estruturais das artérias coronárias (MORENO et al., 1995; ZATZ e BAYLIS, 1998).

Diante do exposto acima, fica claro que a participação do sistema renina-angiotensina desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da hipertensão decorrente da inibição crônica, mas não aguda, da síntese de NO (GRACIANO et al., 2004).

Em nossos estudos, a infusão do NCX899 nos animais atenuou a hipertensão, bradicardia e vasoconstrição periférica induzidas pelo L-NAME. Estes parâmetros hemodinâmicos observados são interessantes, pois sugerem que há liberação endovenosa do NO exógeno do analito nitro-enalapril, e que este mediador atua diretamente impedindo a vasoconstrição provocada pela deficiência aguda de NO em cães tratados com L-NAME.

Além disso, é sabido que o NO atua na manutenção das atividades antitrombóticas do endotélio. É um mediador cujo radical livre é altamente instável, e que potencializa a inibição da adesão (RADOMSKI et al., 1987) e agregação plaquetárias (RADOMSKI et al., 1990). O NO é sintetizado pela NOS constitutiva das células endoteliais (PALMER et al., 1987), e pelas próprias plaquetas (RADOMSKI et al., 1990). Como as plaquetas são elementos que tendem a aderir à parede dos vasos, e se agregarem formando trombos, o NO liberado pela célula endotelial difunde-se rapidamente para o interior das plaquetas, descolando-as da parede dos vasos.

O NO liberado pelo endotélio atravessa as membranas plaquetárias e liga-se ao grupo heme da GCs. A ligação heme ativa a GCs e aumenta a produção de GMPc. Nitrovasodilatadores, como gliceril trinitrato (GTN) e nitroprussiato de sódio (SNP), são amplamente empregados na terapia de doenças cardiovasculares

devido à capacidade de liberar óxido nítrico. Assim, tanto GTN quanto SNP, através do aumento da disponibilidade do NO, exibem suas propriedades antitrombóticas influenciando a resposta das plaquetas circulantes (IGNARRO e KADOWITZ, 1985).

Nossos resultados demonstraram diferenças na intensidade das respostas do NCX899, enalapril e SNP na agregação plaquetária, entre as amostras de plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas. Este aumento da intensidade das respostas das plaquetas lavadas pode ser decorrente da sensibilidade dessas plaquetas, pois são plaquetas que foram isoladas do plasma rico em componentes tais como as enzimas superóxido dismutase (SCHETTLER et al., 1998), que seqüestram substâncias como o óxido nítrico.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o NCX899 inibe a agregação plaquetária quando induzida pelo ADP em PRP, ou pela trombina em plaquetas lavadas.

Estudos *in vitro* demonstram que o enalapril não afeta o mecanismo antiplaquetário (MOSER et al., 1997), embora *in vivo* o mesmo não foi observado (SHANKAR et al., 2001). Inibidores da ECA juntamente com drogas doadoras de NO podem aumentar a resposta na inibição da agregação plaquetária (PERSSON et al., 2000). TSUI e colaboradores (2003) demonstraram que S-nitrosocaptopril, um derivado do inibidor de ECA nitrosilado (captopril), é um potente inibidor plaquetário em ratos. No entanto, PERSSON e colaboradores (2000) demonstraram que o captopril não afetou a agregação plaquetária, mas o enalaprilato (metabólito ativo do enalapril), em altas concentrações, reduziu a agregação. Este efeito foi mais evidente com a atuação conjunta com um doador de NO.

Sendo assim, nossos resultados sugerem que o NCX899 esteja liberando sua molécula de NO, já que seu efeito foi significativamente diferente do enalapril sozinho. Contudo, como demonstrado anteriormente, estudos *in vitro* com enalaprilato e *in vivo* com enalapril mostram que o enalapril tem efeito na atividade plaquetária. Estes resultados reforçam que a ação conjunta do inibidor da ECA com o NO exógeno pode ter grande papel na modulação plaquetária *in vivo*.

## **5 - CONCLUSÃO**

Embora existam algumas diferenças nas características farmacocinéticas entre as moléculas de nitro-enalapril e enalapril, nossos resultados sugerem que o perfil metabólico (concentração de enalaprilato) entre o NCX899 e o maleato de enalapril é semelhante.

Na avaliação farmacodinâmica, através da atividade da ECA, o NCX899 inibe a atividade da enzima conversora de angiotensina *in vivo* e inibe a agregação plaquetária *in vitro*.

Além disso, a atuação conjunta do NO exógeno e do inibidor da ECA (enalapril) pode modular processos cardiovasculares, atenuando a hipertensão arterial, bradicardia e vasoconstrição periférica induzida pela administração aguda do inibidor da NOS, o L-NAME.

Como conclusão, verificamos com este estudo que o NCX899, em comparação ao maleato de enalapril, representa uma nova perspectiva terapêutica no controle de distúrbios cardiovasculares.

## ***6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ACKERMANN, A.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.; SÁNCHEZ DE ROJAS, R.; ORTEGA, T.; PAUL, M.; GONZÁLES, C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. **Br J Pharmacol**, 124:291-298, 1998.
- AL-SWAYEH, O.A.; CLIFFORD, R.H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P.K. A comparison of the antiinflammatory and antinociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. **Br J Pharmacol**, 129:343-50, 2000.
- ARAUJO, M.C.; MELO, R.L.; CESARI, M.H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; CARMONA, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, 39:8519-8525, 2000.
- BARNETT, A. Prevention of loss of renal function over time in patients with diabetic nephropathy. **The Am. J. Med.**, 119: 405-475, 2006.
- BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J Clin Invest**, 90:278-281, 1992.
- BELLISSANT, E.; CHAU, N.P.; GIUDICELLI, J.F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model relating lisinopril plasma concentrations to regional hemodynamic effects in healthy volunteers. **J Cardiovasc Pharmacol**, 28:470-478, 1996.
- BODE-BOGER, S.M.; KOJDA, G. Organic nitrates in cardiovascular disease. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, 51:307-320, 2005.
- BOWER, E.A.; LAW, A.C. The effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside and noradrenaline on venous return in the anaesthetized cat. **Br J Pharmacol**, 108:4933-4940, 1993.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med**, 26(1-2):3-31, 2005.
- BURGAUD, J.L.; ONGINI, E.; DEL SOLDATO, P. Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. **Ann N Y Acad Sci**, 962:360-371, 2002.

- BURKE, A.P.; FARB, A.; LIANG, Y.H. Effect of hypertension and cardiac hypertrophy on coronary artery morphology in sudden cardiac death. **Circulation**, 12:3138-3145, 1996.
- CALVER, A.; COLLIER, J.; MONCADA, S.; VALLANCE, P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. **J Hypertens**, 10:1025-1031, 1992.
- CAREY, R.M. Angiotensin type-2 receptors and cardiovascular function: are angiotensin type-2 receptors protective? **Curr Opin Cardiol**, 20:264-269, 2005.
- CAUGHEY, G.H.; REYMOND, W.W.; VANDERSLICE, P. Dog mast cell chymase: molecular cloning and characterization. **Biochemistry**. 29:5166-5171, 1990.
- COCKCROFT, J.R. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. **Am. J. hypertens.**, 18: 177-183, 2005.
- DE GENNARO COLONNA, V.; RIGAMONTI, A.; FIORETTI, S.; BONOMO, S.; MANFREDI, B.; FERRARIO, P. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, 516:253-259, 2005.
- DEINUM, G.; STONE, J.R.; BABCOCK, G.T.; MARLLETA, M.A. Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with resonance Raman spectroscopy. **Biochem**, 35:1540-1547, 1996.
- DU BOIS; DU BOIS. Body surface area of adults. **Arch Intern Med**, 17:863, 1916.
- ESLER, M. Differentiation in the effects of the angiotensin II receptor blocker class on autonomic function. **J Hypertens Suppl**, 5:S13-S19, 2002.
- FARO, R.; TANUS-SANTOS, J.E.; ZAPPELLINI, A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. The role of heart rate in the modulation of the decrease cardiac output induced by acute nitric oxide inhibition in anaesthetized dogs. **J Auton Pharmacol**, 19:257-262, 1999.
- FERRARIO, C.M.; TRASK, A.J.; JESSUP, J.A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 289:H2281-H2290, 2005.

- FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca. **Br J Pharmacol**, 24:163-169, 1965.
- FISCHER, M.; BAESSLER, A.; SCHUNKERT, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiol Res**, 53:672-677, 2002.
- FLEMING, I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. **Circ. Res.**, **98**: 887-896, 2006.
- FLEMING, I.; KOHLSTEDT, K.; BUSSE, R. New fACEs to the renin-angiotensin system. **Physiology**, 20:91-95, 2005.
- FOUNTAIN, S.T. A mass spectrometry primer. In: Rossi, D.; Sinz, M.W. Mass spectrometry in drug discovery. New York: **Marcel Dekker**, 2002.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. Reveal the obligatory role of endothelium for arterial relaxation to acetylcholine. **Nature**, 288:373–376, 1980.
- GANZ, W.; DONOSO RAND MARCUS, H.S. A new technique for measurement of cardiac output by thermodilution in man. **Am J Cardiol**, 227:392, 1971.
- GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; KEMP, P.A.; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. **Br J Pharmacol**, 101:625-31, 1990.
- GERZER, R.; RADANY, E.W.; GARBERS, D.L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. **Biochem Biophys Res Commun**, 108:678-686, 1982.
- GRACIANO, M.L.; CAVAGLIERI, R.C.; DELLE, H.; DOMINGUEZ, W.V.; CASARINI, D.E.; MALHEIROS, D.M. et al. Intrarenal Renin-Angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **J Am Soc Nephrol**, 15:1805-1815, 2004.
- GU, Q.; CHEN, X.; ZHONG, D.; WANG, Y. Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr**, 813:337-342, 2004.
- HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. GOODMAN & GILMAN'S: The pharmacological basis of therapeutics. **McGraw-Hill**, 11 ed, 2006.

- HIGASHI, Y.; CHAYAMA, K. Renal endothelial dysfunction and hypertension. **J Diabetes Complications**, 16:103-107, 2002.
- HIGASHI, Y.; OSHIMA, T.; ONO, N.; HIRAGA, H.; YOSHIMURA, M.; WATANABE, M. et al. Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, 80:2198-2202, 1995.
- HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.A. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, 377:239-242, 1995.
- HUSSAIN, S.N.A. Activity of nitric oxide synthase in the ventilatory muscle vasculature. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 119:191-201, 1998.
- IGNARRO, L.J.; DEGNAN, J.N.; BARICOS, W.H.; KADOWITZ, P.J.; WOLIN, M.S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochem Biophys Acta**, 718:49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; KADOWITZ, P.J. Pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle cell relaxation. **Annu Rev Pharmacol**, 25:171-191, 1985.
- IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J Pharmacol Exp Ther**, 218:739-749, 1981.
- IGNARRO, L.J.; MURAD, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Adv Pharmacol**, 34:1-516, 1995.
- IGNJATOVIC, T.; STANISAVLJEVIC, S.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. **Mol Pharmacol**, 66:1310-1316, 2004.

- IGNJATOVIC, T.; TAN, F.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors. **Int Immunopharmacol**, 2(13-14):1787-1793, 2002.
- IWANAGA, Y.; GU, Y.; DIETERLE, T.; PRESOTTO, C.; DEL SOLDATO, P.; PETERSON, K.L. et al. A nitric oxide-releasing derivative of enalapril, NCX899, prevents progressive cardiac dysfunction and remodeling in hamsters with heart failure. **FASEB J**, 18:587-588, 2004.
- JONAS, E.A.; KACZMAREK, L.K. Regulation of potassium channels by protein kinases. **Curr Opin Neurobiol**, 6:318-323, 1996.
- KANEMITSU, H.; TAKAI, S.; TSUNEYOSHI, H.; NISHIMA, T.; YOSHIKAWA, K.; MIYAZAKI, M.; IKEDA, T.; KOMEDA, M. Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and dysfunction after myocardial infarction in rats. **Hypertens Res**. 29:57-64, 2006.
- KERWIN, J.F.JR.; LANCASTER, J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **J Med Chem**, 38:4343-4362, 1995.
- KIRIMURA, K.; TAKAI, S.; JIN, D.; MURAMATSU, M.; KISHI, K.; YOSHIKAWA, K.; NAKABAYASHI, M.; MINO, Y.; MIYAZAKI, M. Role of chymase-dependent angiotensin II formation in regulating blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**. 28:457-464, 2005.
- KLABUNDE, R.E.; RITGER, R.C.; HELGREN, M.C. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. **Eur J Pharmacol**, 199: 51-59, 1991.
- KO, F.N.; WU, C.C.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; TENG, C.M. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**, 84:4226-4233, 1994.
- LECHI, C.; GAINO, S.; TOMMASOLI, R.; ZULIANI, V.; BONAPACE, S.; FONTANA, L. et al. In vitro study of the anti-aggregating activity of two nitroderivatives of acetylsalicylic acid. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 7:206-209, 1996.
- LECLERCQ, B.; JAIMES, E.A.; RAIJI, L. Nitric Oxide synthase and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 11:185-189, 2002.

- LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **J Liquid Chromatogr & Related Technol**, 28:1161-1202, 2005.
- LEU, H.B.; CHARNG, M.J.; DING, P.Y. A double blind randomized trial to compare the effects of eprosartan and enalapril on blood pressure, platelets, and endothelium function in patients with essential hypertension. **Jpn Heart J**, 45:623-635, 2004.
- MARLETTA, M.A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, 27:8706-8711, 1988.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**, 268: 12231-12234, 1993.
- MARTELLI, A.; RAPPOSELLI, S. & CALDERONE, V. NO-releasing hybrids of cardiovascular drugs. **Curr. Med. Chem.**, 13: 609-625, 2006.
- MENG, Q.C.; BALCELLS, E.; DELL'ITALIA, L.; DURAND, J.; OPARIL, S. Sensitive method for quantitation of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in tissue. **Biochem Pharmacol**, 50:1445-1450, 1995.
- MIYAZAKI, M.; TAKAI, S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. **J Pharmacol Sci**. 100:391-397, 2006.
- MIYAZAKI, M.; TAKAI, S.; MURAMATSU, M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. **Pharmacol Ther**. Jul 10, 2006.
- MONCADA, R.; HIGGS, E.A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb Exp Pharmacol**, 176:213-254, 2006a.
- MONCADA, R.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, 147S 1:S193-201, 2006b.
- MONCADA, S.; HERMAN, A.G.; VANHOUTTE, P. Endothelium-derived relaxing factor identified as nitric oxide. **Trends Pharmacol Sci**, 8:365-368, 1987.
- MONCADA, S.; HIGGS, G.A. Leukotrienes in disease. Implications for drug development. **Drugs**, 30:1-5, 1993.
- MOORE, P.K.; AL-SWAYEH, O.A.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine reversible inhibitor of

- endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". **Br J Pharmacol**, 99:408-412, 1990.
- MORENO, H.; METZE, K.; BENTO, A.C.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertension heart muscle disease. **Basic Res Cardiol**, 91:248-255, 1996.
- MORENO, H.; NATHAN, L.P.; COSTA, S.K.P.; METZE, K.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Enalapril does not prevent the myocardial ischaemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur J Pharmacol**, 287:93-96, 1995.
- MOSER, L.; CALLAHAN, K.S.; CHEUNG, A.K.; STODDARD, G.J.; MUNGER, M.A. ACE inhibitor effects on platelet function in stages I-II hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, 30:461-467, 1997.
- MULLINS, L.J.; BAILEY, M.A. & MULLINS, J.J. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. **Physiol. Rev.**, **86**: 709-746, 2006.
- MUSCARÁ, M.N.; LOVREN, F.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; DEL SOLDATO, P.; TRIGGLE, C.R.; WALLACE, J.L. Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats. **Br J Pharmacol**, 133:1314-1322, 2001.
- MUSCARÁ, M.N.; MCKNIGHT, W.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Antihypertensive properties of a nitric oxide-releasing naproxen derivative in two-kidney, one clip-rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279:H528-H535, 2000.
- NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 43:97-123, 2003.
- NASEEM, K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol Aspects Med**, 26:33-65, 2005.
- OHLSTEIN, E.H.; WOOD, K.S.; IGNARRO, L.J. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. **Arch Biochem Biophys**, 218:187-198, 1982.

- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-526, 1987.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Comm**, 153:1251-1256, 1988.
- PARK, J.W. Dual role of S-nitrosocaptopril as an inhibitor of angiotensin-converting enzyme and a nitroso group carrier. **Biochem Biophys Res Commun**, 189:206-210, 1992.
- PATCHETT, A.A. The chemistry of enalapril. **Br J Clin Pharmacol**, 18 Suppl 2:201S-207S, 1984.
- PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev.** 86(3):747-803, 2006.
- PERSSON, K.; ANDERSSON, R.G.G. Nitric oxide modulates captopril-mediated angiotensin-converting enzyme inhibition in porcine iliac arteries. **Eur J Pharmacol**, 385:21-27, 1999.
- PERSSON, K.; WHISS, P.A.; NYHLÉN, K.; JACOBSSON-STRIER, M.; GLINDELL, M.; ANDERSSON, R.G.G. Nitric oxide donors and angiotensin-converting enzyme inhibitors act in concert to inhibit human angiotensin-converting enzyme activity and platelet aggregation in vitro. **Eur J Pharmacol**, 406:15-23, 2000.
- PLANTE, G.E. Vascular response to stress in health and disease. **Metabolism**, 51:6-S1:25-30, 2002.
- RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. **Thromb Res**, 30:383-389, 1983.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87:5193-5197, 1990.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, 2:1057-1058, 1987.

- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, 9:281-296, 1983.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 86:3375-3378, 1989.
- RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypert**, 20:298-303, 1992.
- RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M.N. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Rev Bras Hipertens**, 8:114-124, 2001.
- RUILOPE, L.M.; SCHIFFRIN, E.L. Blood pressure control and benefits of antihypertensive therapy: Does it make a difference which agents we use? **Hypertension**, 38:537-542, 2001.
- SALEH, F.H.; JURJUS, A.R. A comparative study of morphological changes in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats treated with an angiotensin-converting enzyme inhibitor or a calcium-channel blocker. **J Pathol**, 3:415-420, 2001.
- SAMPATH, V.; ZHAO, X.J.; CAUGHEY, W.S. Characterization of interactions of nitric oxide with human hemoglobin A by infrared spectroscopy. **Biochem Biophys Res Commun**, 198:281-287, 1994.
- SBH - SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. [www.sbh.org.br](http://www.sbh.org.br), 2005.
- SCHETTLER, V.; WIELAND, E.; METHE, H.; SCHUFF-WERNER, P.; OELLERICH, M.; MULLER, G.A. Activity of free radical scavenging enzymes in red cells and plasma of patients undergoing extracorporeal low-density lipoprotein apheresis. **Artif Organs**, 22:123-128, 1998.
- SHAFFER, J.E.; LEE, F.; THOMSON, S.; HAN, B.J.; COOKE, J.P.; LOSCALZO, J. The hemodynamic effects of S-nitrosocaptopril in anesthetized dogs. **J Pharmacol Exp Ther**, 256:704-709, 1991.

- SHAH, A.M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. **Cardio Res**, 45:148-155, 2000.
- SHANKAR, R.P.; BHARGAVA, V.K.; GROVER, A.; MAJUMDAR, S.; GARG, S.K. Involvement of nitric oxide in the antiaggregatory effect of enalapril. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 23:255-257, 2001.
- SIMÕES e SILVA, A.C.; PINHEIRO, S.V.; PEREIRA, R.M.; FERREIRA, A.J.; SANTOS R.A. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. **Mini Rev Med Chem**, 6(5):603-609, 2006.
- SKIDGEL, R.A.; STANISAVLJEVIC, S.; ERDOS, E.G. Kinin- and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-mediated nitric oxide production in endothelial cells. **Biol Chem**, 387(2):159-165, 2006.
- SLEIGHT, P. The role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. **Curr Cardiol Rep**, 3:511-518, 2001.
- SMITH, C.G.; VANE, J.R. The discovery of captopril. **FASEB J**, 17:788-789, 2003.
- SONG, J.C.; WHITE, C.M. Clinical pharmacokinetics and selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors: an update. **Clin Pharmacokinet**, 41:207-224, 2002.
- SPIEKER, L.E.; FLAMMER, A.J.; LUSCHER, T.F. The vascular endothelium in hypertension. **Handb Exp Pharmacol**, (176 Pt 2):249-283, 2006.
- STAMLER, J.S.; LOH, E.; RODDY, M.A.; CURRIE, K.E.; CREAGER, M.A. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. **Circulation**, 89:2035-40, 1994.
- STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas)**, 39:333-341, 2003.
- SULE, S.S.; FRISHMAN, W. Nebivolol: new therapy update. **Cardiol Rev**, 14:259-264, 2006.
- TABACOVA, S.A.; KIMMEL, C.A. Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity. **Reprod Toxicol**, 15:467-478, 2001.

- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. **Drugs**, 62:265-284, 2002.
- TAKADA, Y.; UNNO, M.; HIWADA, K.; KOKUBU, T. Biochemical and immunological studies of angiotensin converting enzymes from human, bovine, dog, hog, rabbit, rat and sheep kidneys. **Comp Biochem Physiol**, 73:189-194, 1982.
- TIMMERMANS, P.B.; CARINI, D.J.; CHIU, A.T.; DUNCIA, J.V.; PRICE, W.A.JR.; WELLS, G.J. et al. Angiotensin II receptor antagonists. From discovery to antihypertensive drugs. **Hypertension**, 18:136-142, 1991.
- TREVETHAN CRAVIOTO, S. Converting enzyme inhibitors or AT1 receptor blockers. **Arch Cardiol Mex**, 71:171-176, 2001.
- TSUI, D.Y.; GAMBINO, A.; WANSTALL, J.C. S-nitrosocaptopril: in vitro characterization of pulmonary vascular effects in rats. **Br J Pharmacol**, 138:855-864, 2003.
- URATA, H.; KINOSHITA, A.; MISONO, K.S.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **J Biol Chem**. 265:22348-22357, 1990.
- VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Cardiovasc Res**, 23:1053-1057, 1989.
- VAN BORTEL, L.M.A.B.; STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J.; SAFAR, M.E. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. **Hypertens**, 38:914-921, 2001.
- VAN GELDEREN, E.M.; DEN BOER, M.O.; SAXENA, P.R. NG-nitro L-arginine methyl ester: systemic and pulmonary haemodynamics, tissue blood flow and arteriovenous shunting in the pig. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 348:417-23, 1993.
- WALLACE, J.L.; IGNARRO, L.J.; FIORUCCI, S. Potential cardioprotective actions of NO-releasing aspirin. **Nat Ver Drug Discov**, 1:375-382, 2002.

- WALLACE, J.L.; REUTER, B.K.; CIRINO, G. Nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs: a novel approach for reducing gastrointestinal toxicity. **J Gastroenterol Hepatol**, 9:S40-44, 1994.
- WANG, Y.X.; PANG, C.C. Pressor effect of NG-nitro-L-arginine in pentobarbital-anesthetized rats. **Life Sci**, 47:2217-2224, 1990.
- WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin-converting enzyme are both catalytically active. **J Biol Chem**, 266:9002-9008, 1991.
- WELLING, P.G. Pharmacokinetics: processes and mathematics. Washington: **Am Chem Soc**, 213-240z, 1986.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 2002.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332:411-415, 1998.
- YOON, K.H.; KIM, W.; PARK, J.; KIM, H.J. Determination of enalapril in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Bull Korean Chem Soc**, 25:878-880, 2004.
- ZAPPELLINI, A.; MORENO, H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs. **J Cardiovasc Pharmacol**, 29:45-48, 1997.
- ZAPPELLINI, A.; MORENO, H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs. **Braz J Med Biol**, 29:33-39, 1996.
- ZATZ, R.; BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32:958-64, 1998.