

MARCOS ZANFOLIN

**EFEITO DO BAY 41-2272, NA PRESSÃO ARTERIAL DE
RATOS SOB TRATAMENTO CRÔNICO COM INIBIDOR
DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO**

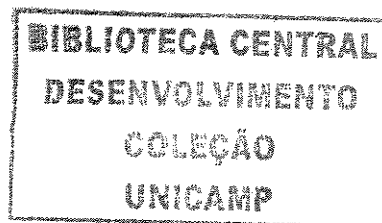
*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Biólogo – Marcos Zanfolin.*

Campinas, 30 de agosto de 2005.

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

CAMPINAS

2005



MARCOS ZANFOLIN

**EFEITO DO BAY 41-2272, NA PRESSÃO ARTERIAL DE
RATOS SOB TRATAMENTO CRÔNICO COM INIBIDOR
DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS

2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
T/UNICAMP	
Z16e	
V	EX
TOMBO BC/	66557
PROC.	16-9-0008605
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

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

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

BIB ID: 3743 15

Z16e

Zanfolin, Marcos

Efeito do BAY 41-2272, na pressão arterial de ratos sob o tratamento crônico com inibidor da síntese de óxido nítrico / Marcos Zanfolin. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador : Gilberto De Nucci

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

1. Hipertensão. 2. Telemetria. 3. L-Name. 4. Óxido nítrico. 5. BAY 41-2272. I. De Nucci, Gilberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Rovilson Giliolli

Prof. Dr. José Luiz Donato

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

Data: 30/08/2005

200529119

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que dispensa comentários.

Aos meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Sônia, que sempre confiaram em meus sonhos, me ensinaram a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que trabalho duro, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas. E aos meus queridos irmãos e cunhado e cunhadas pelo incentivo.

Ao meu querido filho Marcos Zanfolin Junior, e minhas desculpas pela falta de atenção, pois estava trabalhando neste projeto.

À minha namorada Claudia Salvuchi, que está ao meu lado em todos os momentos, dizendo que posso tudo o que realmente quero e que sou capaz de fazer tudo aquilo que desejo, pois acredita na minha capacidade, além de servir como minha musa inspiradora.

“Aos grandiosos pequenos animais que
involuntariamente cederam suas vidas
para a realização deste aprendizado”

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Renato do R. de A. Faro, pelos ensinamentos, amizade e orientação na minha formação acadêmica.

À Profª Drª Ana M. A. Guaraldo, pelo carinho, pela bondade e afetividade, pelos inúmeros momentos de conforto, apoio e estímulo, pela confiança que sempre imprimiu às nossas discussões, por ter-me mostrados caminhos e neles ter trilhado comigo, de mãos dadas.

Aos Profs Drs. Stephen Hyslop, José Luis Donato, Rovilson Giliolli, Luis A. C. Passos e Ronilson A. Moreno que participaram da Qualificação, Pré-banca e Banca, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

À Profª Drª Delma P. Alves diretora do CEMIB, meus agradecimentos pela paciência e apoio na realização desse curso de Pós-Graduação.

À minha ex-mulher Nádia Alves pelo apoio.

Aos amigos André P. Benevides, Edivana A. V. Alves e Alda J. Antonio pela disposição e colaboração nas diversas etapas desse trabalho e a todos os amigos do CEMIB que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos Luis A. C. Passos e Nelson Tonim pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho.

Aos colegas Juliana Moreira, Cristina E. Okuyama e Wanderlei da Cunha Claro do Departamento de Farmacologia no fornecimento de material didático e paciência em responder minhas dúvidas.

À FAPESP pelo Apoio Financeiro.

“É muito difícil agradecer a todos sem esquecer, inevitavelmente, de alguém, mas aos que esqueci, meu pedido de perdão e meus agradecimentos sinceros!”.

Marcos Zanfolin.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	19
1.1- Aspecto geral da hipertensão.....	20
1.2- Hipertrofia cardíaca.....	23
1.3- Hipertrofia do ventrículo esquerdo.....	23
1.4- Óxido nítrico.....	24
1.5- Mecanismo do óxido nítrico.....	25
1.6- Guanilato ciclase solúvel e GMPc.....	26
1.7- Inibidores da síntese de NO.....	27
1.8- Sistema cardiovascular e óxido nítrico.....	28
1.9- Compostos ativadores da GCs independentes de NO.....	29
2- OBJETIVOS	31
2.1- Objetivo geral.....	32
2.2- Objetivos específicos.....	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1- Animais.....	34
3.2- Implante do transdutor PA-C40.....	34
3.3- Sistema de telemetria.....	36
3.4- Obtenção do índice peso cardíaco e índice do peso do ventrículo esquerdo.....	37

3.5- Análise histológica cardíaca.....	38
3.5.1- Análise estereologica.....	38
3.6- Protocolo experimental.....	39
3.7- Análise estatística.....	39
4- RESULTADOS.....	40
4.1- Efeito do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial sanguínea dos ratos.....	41
4.2- Efeito do tratamento sobre o peso corpóreo.....	42
4.3- Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso cardíaco.....	42
4.4- Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso do ventrículo esquerdo...	43
4.5- Efeito do BAY 41-2272 sobre a frequência cardíaca.....	44
4.6- Efeito do BAY 41-2272 sobre a hipertrofia do cardiomiócitos.....	45
4.7- Efeito do BAY 41-2272 sobre a área de fibrose.....	46
4.8- Fotomicrografia do ventrículo esquerdo.....	47
5- DISCUSSÃO.....	49
6- CONCLUSÃO.....	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8- OBRAS CONSULTADAS.....	67
9- ANEXOS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BAY 41-2272	5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridina-3-il]- pirimidina-4-ilamina
BK	Bradicinina
CaM	Calmodulina
CO ₂	Carbogênio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonuclease
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDRF	Fator de relaxamento derivado de endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GC	Guanilato ciclase
GC _s	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico

GTP	Guanosina trifosfato
H ₄ B	Tetrahidrobiopterina
IPVE	Índice do peso ventricular esquerdo
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS(s)	Óxido nítrico sintase(s)
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1, 2, 4] oxadiazolo quinoxalin-1-one
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
PA	Pressão arterial
PDEs	Fosfodiesterases
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
SIN-1	3-morfolinosidnonimina
SPF	Specific pathogen free
YC-1	3-(5-hidroximetil-2-furil)-1-benzilindazole
VAE	Vírus antibody free

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Efeito do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial sanguínea dos ratos.....	41
Figura 2- Média do peso corporal.....	42
Figura 3- Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso cardíaco dos ratos.....	43
Figura 4- Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso ventrículo esquerdo.....	44
Figura 5- Frequência cardíaca (bpm) ratos wistar/uni tratados durante oito semanas.....	45
Figura 6- Efeito do BAY 41-2272 sobre o tamanho dos cardiomiócitos.....	46
Figura 7- Efeito do BAY 41-2272 sobre a área de lesão dos cardiomiócitos.....	47
Figura 8- Fotomicrografia do ventrículo esquerdo.....	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Pág.</i>
Ilustração 1 - Síntese enzimática do NO a partir da L-arginina pela ação da NOS.....	25
Ilustração 2- Estrutura da guanilato ciclase solúvel	27
Ilustração 3- Transdutor modelo PA-C 40.....	35
Ilustração 4- Implante do transdutor fixo na parede abdominal do animal.....	35
Ilustração 5- Mecanismo utilizado para aquisição dos dados da pressão arterial e frequência cardíaca.....	37

RESUMO

Recentemente, o composto BAY 41-2272, um derivado da pirazolopiridina, 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridina-3-il]-pirimidina-4-ilamina, (Bayer AG-Germany), foi descrito como ativador específico de GCs de ação NO-independente (STRAUB et. al., 2001; STASCH et. al., 2001). Experimentos *in vitro* demonstraram uma potente ativação da GCs pelo BAY 41-2272 nas concentrações de 0.1 nM a 100 µM, sendo esta estimulação potencializada na presença de doador de NO (DEA)/NO 1 µM (STACH et. al., 2001). Em estudos utilizando enzimas desprovidas de grupamento heme, o BAY 41-2272 não foi capaz de ativá-las demonstrando que seu mecanismo, apesar de ser NO-independente, é heme-dependente (STACH et. al., 2001). Diante do exposto, observa-se que a inibição da síntese de óxido nítrico é responsável, em grande parte, pelo surgimento de processos patológicos, principalmente para o sistema cardiocirculatório. Neste sentido, o presente estudo foi realizado para investigar, principalmente, o efeito de um recente e potente estimulador da GCs (BAY 41-2272, Bayer AG, Germany) - independente de NO na hipertensão e miocardiopatia em ratos, avaliando desta forma a importância dessa via de estimulação na presença da patologia.

Foram utilizados no experimento ratos Wistar/Uni S.P.F., pesando entre 250 a 350g fornecidos do Centro Multidisciplinar para investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, dentro de estantes ventiladas (ALESCO), sob condições controladas de luminosidade (12/12 horas) e temperatura (22°C).

A técnica iniciou-se por intermédio da implantação de uma unidade transdutor/transmissor na aorta descendente, fixado na parede abdominal interna do animal. As gaiolas com os animais foram colocadas em cima de *receivers* individuais, ligados a um computador no qual registrava a medição da pressão arterial e a frequência cardíaca dos animais, por um período de 90 segundos, duas vezes por semana. A aquisição desses dados foi realizada de modo contínuo por meio do sistema de telemetria (Data Science Inc., St. Paul, MN, USA).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, pesados semanalmente e tratados por oito semanas consecutivas. O grupo Controle (n= 10) recebeu (1ml de DMSO, Dimetil Sulfóxido) por gavagem esofágica; o grupo L-NAME (n=20) recebeu L-NAME

(N^G-nitro-L-arginina-metil-éster), recebeu (20mg/rato/dia); o grupo L-NAME + BAY (n=15) recebeu L-NAME (20mg/rato/dia) + BAY (10mg/kg/dia) e o Grupo BAY 41-2272 (n=15) recebeu BAY 41-2272 (10mg/kg/dia).

O L-NAME foi dissolvido em água autoclavada e fornecido normalmente para os animais, e o BAY 41-2272 foi administrado através de gavagem oral diária dissolvido em DMSO 80%.

Os resultados demonstraram que o BAY 41-2272 diminui significativamente a hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com L-NAME, diminui o peso cardíaco, diminui o peso do ventrículo esquerdo e reduz a área de lesão dos cardiomiócitos, e que somente os animais do grupo BAY 41-2272 apresentaram um aumento na frequência cardíaca que pode ser caracterizado por um mecanismo compensatório devido à queda da pressão arterial nos animais.

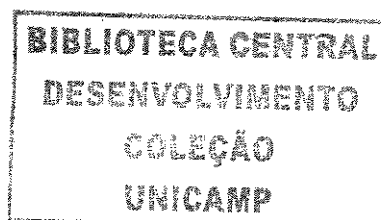
ABSTRACT

Recently, the compound BAY 41-2272, a pyrazolopyridine derivative, was described as an specific GCs activator by a mechanism that is independent of NO (Straub et al., 2001; Stasch et al., 2001). In vitro experiments demonstrated that BAY 41-2272 stimulates potently sGC at concentrations of 0.1 nM to 100 nM, this effect is potentiated in the presence of NO donors like 2-(N, N-diethylamino)-diazetidine-2-oxide (DEA)/NO (Stach et al., 2001). In studies using enzymes where the heme group was removed, BAY 41-2272 did not activate the heme-free enzyme demonstrating that BAY 41-2272 activates sGC by an NO-independent, but heme-dependent mechanism (Stach et al., 2001). It is observed that the inhibition of the synthesis of nitric oxide is responsible, largely, for the appearance of pathological processes, mainly in the cardiac system. In this sense, this research seeks mainly to investigate the effects of BAY 41-2272 (BAY 41-2272, Bayer AG-Germany, a potent NO-independent stimulator of sGC) in rats, in a physiologic point of view and in a process physiopathological process (hypertension), evaluating the importance of this stimulation way in the presence of the pathology.

For this purpose, Wistar/Uni S.P.F.(250 to 350g) obtained from the Center of Bioterism of the State University of Campinas (CEMIB - UNICAMP), were housed in individual cages and kept in ventilated shelves (ALESCO) under controlled conditions of light (12h light dark cycle) and temperature (22°C). The mean arterial blood pressures (MABP) were collected during 90 seconds two times a week for eight weeks. Rats were equipped with implantable radiotelemetry, and a data acquisition system (Data Science Inc., St. Paul, MN, USA), comprising a chronically implantable transducer/transmitter unit fluid-filled catheter. The transmitter was implanted into the peritoneal cavity and the descending aorta, affixed to the inner peritoneal wall.

The animals were divided in four experimental groups as follow: 1) Control receiving 1 ml of DMSO 80% per day; 2) L-NAME, receiving L-NAME, alone (20mg/rat per day), 3) BAY 41-2272, receiving alone (10mg/kg per day); 4) L-NAME + BAY 41-2272, receiving concomitantly L-NAME (20mg/rat per day) and BAY 41-2272 (10mg/kg per day). L-NAME was dissolved in the drinking autoclavated water daily drunk by the rats, BAY 41-2272 was dissolved in 80% of DMSO and administered by gavages. The experiments were performed for up to 8 weeks.

The results obtained showed that BAY 41-2272 reduces significantly the arterial hypertension induced by chronic treatment with L-NAME, as well the weight of the heart and of the left ventricle and the cardiomyocyte injured area. Only animals had receiving BAY 41-2272 showed an increase in the heart rate that can be characterized by a compensatory mechanism in function of reduction of the arterial pressure in these animals.



1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspecto geral da hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica é o distúrbio cardiovascular de grande incidência e afeta centenas de milhares de pessoas ao redor do mundo. Apesar da crescente consciência pública e do amplo acervo de medicamentos anti-hipertensivos encontrados no mercado, a hipertensão arterial continua sendo um dos fatores de risco mais comuns de morbidade e mortalidade cardiovasculares, além de ser considerado uma entidade clínica multifatorial, conceituada como síndrome caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados associados a alterações metabólicas e hormonais e a fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular). Estima-se em 15% a 20% a prevalência de hipertensão arterial na população brasileira adulta. Seu alto custo social é responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de absentismo no trabalho.

Devido à magnitude do problema, tem sido constante a preocupação mundial em ampliar e aperfeiçoar os métodos para diagnóstico e tratamento da hipertensão arterial. O tratamento deve ser empreendido dentro do contexto de uma conduta global em relação aos fatores de risco da doença cardiovascular, e seu objetivo final deve ser o de reduzir o risco cardiovascular global.

Por definição, a hipertensão arterial em indivíduos maiores de 18 anos é classificada por *Joint National Committee On Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (2000)* da forma apresentada no quadro a seguir:

Condição	Pressão Sistólica(mmHg)	Pressão Diastólica(mmHg)
Normal	<130	<85
Normal alta	130-139	85-89
Estágio 1 (brando)	140-159	90-99
Estágio 2 (moderado)	160-179	100-109
Estágio 3 (severo)	180-209	110-119
Estágio 4 (muito severo)	>210	>120

A pressão sanguínea média é o produto do rendimento cardíaco e resistência periférica total, considerando pressão e fluxo constantes. Na prática clínica, pressão é definida em termos de pressão sanguínea sistólica e diastólica, as quais referem-se ao fenômeno pulsátil. A pressão sanguínea média significa um valor médio dos extremos da oscilação de pressão (LE NOBLE et al., 1998; VAN BORTEL et al., 2001).

Existem vários agentes físicos e neuro-humorais conhecidos por serem responsáveis pelos estímulos exercidos no controle funcional vascular, levando a alterações hemodinâmicas. A rigidez arterial, por exemplo, é rapidamente seguida pela ativação do sistema nervoso autonômico. Associado com este processo está o aumento da liberação de catecolaminas e angiotensina II. Esta resposta é caracterizada pelo aumento da pressão arterial, ocasionando perda da função endotelial responsável pela determinação da resistência periférica total. Alteração na permeabilidade endotelial pode levar a um edema intersticial e mudanças na propriedade físico-química do compartimento intersticial (PLANTE, 2002).

A conformidade das artérias depende do volume arterial e da propriedade elástica da parede do vaso. O controle vascular teve melhor compreensão, mediante estudos realizados na camada de células endoteliais que revestem todo o sistema vascular (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Esta camada não atua apenas como uma barreira passiva que impede a livre saída das células e proteínas para os tecidos, mas também como uma fonte de várias substâncias que, por sua vez, controlam as células musculares lisas subjacentes. Entre estas substâncias pode-se destacar as prostaglandinas, tromboxano, endotelina e óxido nítrico (MONCADA et al., 1987; YANAGISAWA et al., 1998).

O tratamento da hipertensão arterial sistêmica visa à prevenção primária de doenças cardiovasculares e renais e não ao controle de sintomas, poucas vezes diretamente associados aos níveis pressóricos. 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 modulam a via do NO demonstram oferecer uma grande ferramenta no controle da pressão arterial. Em 1989, PATRICK VALLANCE et al., realizaram a infusão intra-arterial de um inibidor específico da óxido nítrico sintase (NOS), NG-monometil L-arginina (L-NMMA), demonstrando que o NO endógeno contribuiu para o restabelecimento do tônus arteriolar e mediou a vasodilatação induzida pela acetilcolina em humanos.

O NO é conhecido por ser um potente vasodilatador que tem um importante papel na regulação do músculo liso vascular. Sua presença inibe a adesão de leucócitos e plaquetas no endotélio, ativação de leucócitos e agregação plaquetária, e permeabilidade endotelial. Assim, otimiza a regulação do fluxo sanguíneo na microcirculação. No coração, o NO derivado do endotélio modula o relaxamento do miocárdio e função diastólica, reduzindo o consumo de oxigênio independente dos efeitos na função contrátil (JONAS e KACZMAREK, 1996; SHAH, 2000; LECLERCQ et al., 2002). Sendo assim, a inibição da síntese do NO pode levar a alterações hemodinâmicas, como hipertensão arterial acompanhada de lesões isquêmicas cardíacas e renais (MORENO et al., 1996; BERTHOLD et al., 1999).

ZAPPELLINI et al. (1996), demonstraram que a inibição aguda da síntese de NO utilizando L-NAME, induziu hipertensão arterial em cães anestesiados. A hipertensão arterial decorrente do aumento da resistência vascular sistêmica é observada também em ratos (GARDINER et al., 1990a), em coelhos (KLABUNDE et al., 1991), em gatos (BOWER e LAW, 1993) e em humanos (STAMLER et al., 1994). Por outro lado, a queda de débito cardíaco é desencadeada por compostos que inibem a NOS (GARDINER et al., 1990b). Verifica-se que a produção contínua de NO é essencial para a manutenção do tônus basal em diversos leitos vasculares (HUSSAIN, 1998; HIGASHI e CHAYAMA, 2002) mantendo a homeostase vascular por meio da atividade constante do estado de vasodilatação da célula muscular lisa (MONCADA e HIGGS, 1993).

1.2- Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca está associada a diversas alterações que variam de remodelamento de miócito (aumento das dimensões miocitárias, rearranjo estrutural dos mesmos, alteração de propriedades elétricas e de processos de sinalização) a remodelamento de tecido intersticial e fibras colágenos e de tecido vascular. Essas alterações contribuem para que a hipertrofia seja um fator de risco para morbidade e mortalidade (CAMPBELL et al., 1991; BRAUNWALD et al., 2001).

Alguns autores defendem que o crescimento hipertrófico cardíaco é semelhante ao fisiológico e pode ser atribuído somente à hipertrofia miocitária. Argumentos a este favor foram apresentados por KORECKY e RAKUSAN (1978), que comparando miócitos hipertrofiados (induzidos por constrição aórtica), com corações normais provenientes de corações de igual peso, constataram que não houve diferença de volume. Resultados semelhantes também foram observados na hipertrofia induzida pela hipertensão (RAKUSAN et al., 1984; VAN DER LAARSE et al., 1989).

Entretanto, ANVERSA et al., (1986) constataram diferenças histológicas em tecidos cardíacos e em miócitos de corações hipertrofiados. De fato, a hipertrofia cardíaca pode ser atribuída, entre outros fatores, ao aumento das dimensões miocitárias; mas também ao aumento de colágeno intersticial e de proliferação de tecido vascular (ANVERSA et al., 1975; LOUD et al., 1978; ELEFThERIADES et al., 1993).

1.3- Hipertrofia do ventrículo esquerdo

O ventrículo esquerdo contrai-se bombeando sangue oxigenado para todo o corpo através da valva aórtica. A via inicial de condução do sangue arterial é a artéria aorta, principal artéria sistêmica da grande circulação. O principal suprimento sistêmico para o tórax e todo o organismo deriva-se dos ramos da aorta. De acordo com seu percurso, a artéria aorta é denominada aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente torácica e aorta descendente abdominal (GRAY et al., 1998).

A hipertrofia do ventrículo esquerdo pode ser associada à hipertensão arterial, e constitui importante indicador de risco para arritmias e morte súbita, independentemente da própria hipertensão. O tratamento medicamentoso é imperativo. Todas as drogas, à exceção dos vasodilatadores de ação direta, são eficazes na redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo. Até o momento, entretanto, os benefícios da regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo não estão bem estabelecidos (FRANCHINI, 2001).

1.4- Óxido nítrico

FURCHGOTT e ZAWADZKI (1980) demonstraram que em resposta à acetilcolina, as células endoteliais liberavam um fator não prostanóide denominado fator de relaxamento derivado de endotélio (EDRF), que causava relaxamento de músculo liso. Evidências biológicas e clínicas demonstraram posteriormente que o EDRF é o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (IGNARRO et al., 1987).

O NO é o ativador endógeno da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) e é atualmente considerado um biomensageiro de ampla distribuição, existente em uma grande variedade de organismos (HOBBS e IGNARRO, 1996). O NO é um importante mediador de vários eventos fisiológicos e fisiopatológicos (IGNARRO e MURAD, 1995), enquanto a arginase é uma enzima chave no ciclo da uréia, uma via metabólica essencial na remoção de íons amônio resultantes da degradação proteica (WU e MORRIS, 1998).

As NO sintases (NOS), enzimas responsáveis pela formação do óxido nítrico (NO), catalisam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina, formando NO e L-citrulina em duas etapas (Ilustração 1), com a formação do intermediário N^o-hidroxi-L-arginina (FELDMAN *et al.*, 1993; MARLETTA, 1993; IGNARRO e MURAD, 1995; KERWIN *et al.*, 1995).

As NOS são divididas em duas famílias: (1) NOS constitutivas isoforma neuronal nNOS ou NOS TIPO I e isoforma endotelial eNOS ou NOS tipo III, reguladas pelo complexo Ca²⁺/calmodulina (CaM) e responsáveis pela produção de pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), o qual desempenha

funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular; e (2) NOS induzível iNOS ou NOS tipo II, enzima essencialmente Ca^{2+} -independente, responsável pela produção de NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão.

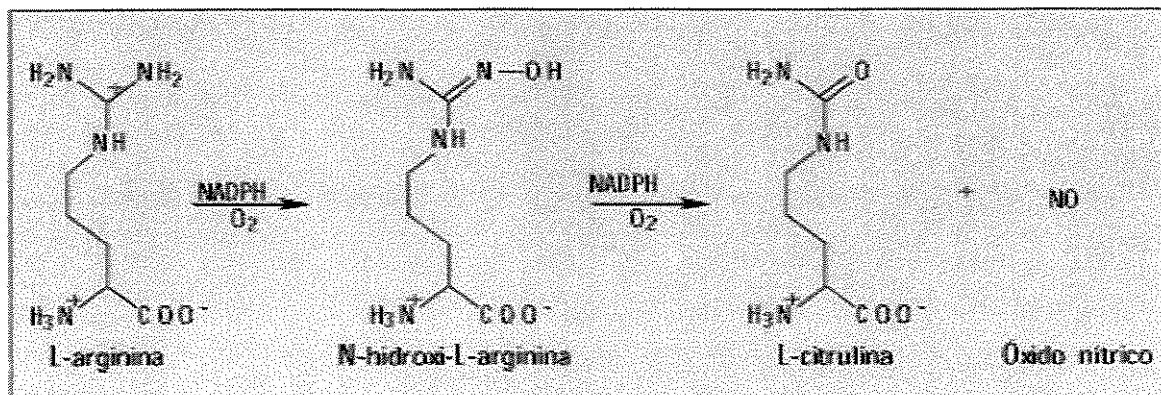


Ilustração 1 – Síntese enzimática do NO a partir da L-arginina pela ação da NOS.

1.5- Mecanismos do óxido nítrico

Em mamíferos, o NO participa de numerosas funções na sinalização inter e intracelular, incluindo dilatação dos vasos sanguíneos, transmissão neuronal, toxicidade contra patógenos, tumores, coordenação do ritmo cardíaco e regulação da atividade respiratória celular (GROVES e WANG, 2000).

Em uma grande variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, o NO têm sido descrito como capaz de modular reações inflamatórias agudas e crônicas. De modo geral, a ação do NO ocorre através da ativação da GCs e subsequente produção de GMPc. Por essa razão, a maioria dos efeitos biológicos provocados pelo NO é mediado pelo GMPc, o qual atua como segundo mensageiro (MURAD, 1986).

O NO apresenta duas categorias de efeitos: diretos e indiretos. Efeitos diretos compreendem as reações nas quais o NO interage diretamente com moléculas biológicas e tais efeitos ocorrem na presença de baixas concentrações de NO. Sendo assim, o NO apresenta um efeito direto ao agir diretamente sobre a GCs ligando-se ao grupo heme

formando um complexo heme-ferroso-nitrosil (MURAD, 1994; WINK e MITCHELL, 1998). Ao formar este complexo, a enzima GCs torna-se ativa levando à formação de GMPc (MURAD, 1994; STONE e MARLETTA, 1994; YU et al., 1994).

O NO também pode formar o complexo Fe-nitrosil com o grupamento heme do citocromo P450, inibindo sua atividade (KHATSENKO et al., 1993; WINK et al., 1993; STADLER et al., 1994), enquanto os efeitos indiretos são aqueles provenientes da reação do NO com o ânion superóxido (O_2^-) ou oxigênio (O_2), levando à formação de espécies reativas de óxido de nitrogênio (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; BECKMAN, 1996).

1.6- Guanilato ciclase solúvel e GMPc

Os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc representam os segundos mensageiros importantes na transdução de sinais e na regulação de respostas fisiológicas. Os níveis intracelulares desses nucleotídeos cíclicos são controlados por uma complexa família de enzimas denominadas fosfodiesterases (PDEs).

O GMPc é sintetizado por uma família de enzimas denominadas guanilato ciclase particulada e guanilato ciclase solúvel (GCs), as quais possuem algumas seqüências idênticas de aminoácidos na região catalítica à adenilato ciclase, que é a responsável pela síntese de AMPc (KRUPINSKI et al., 1989). O GMPc é formado pela ação da GCs, que é uma enzima expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e realiza a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para GMPc. Este segundo mensageiro modula uma variedade de respostas celulares e fisiológicas, dependendo do tipo de célula e tecido, incluindo relaxamento de músculo liso vascular e não vascular, inibição da adesão, agregação plaquetária e neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (SZABO e THIEMERMANN, 1995).

O GMPc exerce seus efeitos por meio da ativação de diferentes efetores como modulação de canais iônicos (BIEL et al., 1999), proteínas quinases dependente de GMPc (LOHMANN et al., 1997) e PDEs reguladas por GMPc (JUILFS et al., 1999; FRANCIS et al., 2001).

A GCs é um heterodímero composto de subunidades α e β (HOBBS, 1997), e cada subunidade pode ser dividida em três domínios funcionais: domínio de ligação heme, região de dimerização e domínio catalítico. O domínio de ligação está localizado no N-terminal de cada subunidade (GERZER et al., 1982; IGNARRO et al., 1982; OHLSTEIN et al., 1982). A expressão das duas subunidades, α e β , é necessário para a atividade catalítica desta enzima (HARTENECK et al., 1990; BUECHLER et al., 1991). A análise da GCs de diferentes tecidos demonstrou a existência de múltiplas isoformas com diferentes composições de subunidades. As subunidades mais abundantes são $\alpha 1$ e $\beta 1$, e estão presentes na maioria dos tecidos (BRAUGHLER et al., 1979).

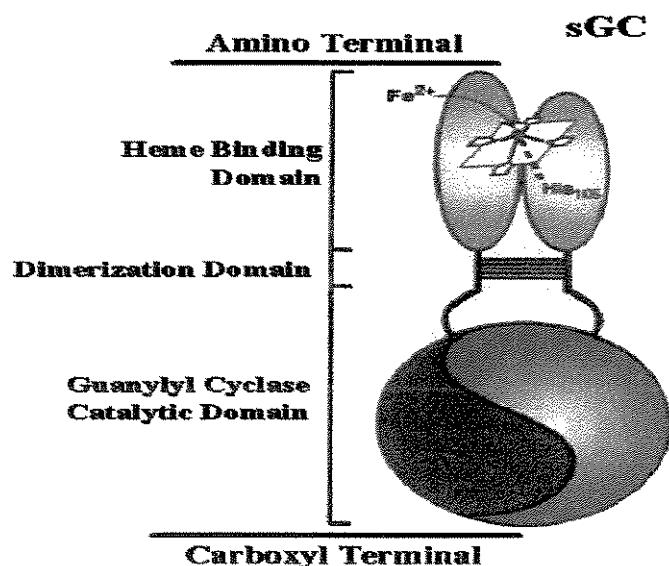


Ilustração 2 – Estrutura da guanilato ciclase solúvel. (Extraído e adaptado de Lucas et al., 2000).

1.7- Inibidores da síntese de NO

Compostos estruturalmente análogos à L-arginina inibem competitivamente a NOS. Inicialmente, observou-se que a NG-monometil L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO e que este efeito caracterizava-se pelo fato de ser dependente da dose e de ser específico para a forma levógira (PALMER et al., 1988; REES et al., 1989).

Posteriormente, outros inibidores foram sintetizados destacando-se a NG-nitro-L-arginina (L-NNA), o N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, MOORE et al., 1990) e N-iminoetil-L-orнитина (L-NIO),(MULSCH e BUSSE, 1990).

Atualmente, acredita-se que a NOS constitutiva esteja relacionada à modulação de parâmetros fisiológicos, enquanto a NOS induzível estaria mais relacionada aos processos patológicos (PETROS et al., 1994). Deste modo, agentes que atuam na inibição seletiva das diferentes isoformas de NOS poderiam ser de grande valor terapêutico. Recentemente, algumas isotiurêias, compostos não análogos à L-arginina, vêm sendo descritas como inibidores mais seletivos da NOS induzível (SOUTHAN et al., 1995).

1.8- Sistema cardiovascular e óxido nítrico

A célula endotelial expressa receptores para diversas substâncias. Quando um vasodilatador dependente de endotélio, como por exemplo, a bradicinina se acopla ao seu receptor, ocorre aumento transitório na concentração intracelular de Ca²⁺, que, por sua vez, se liga à calmodulina. O complexo cálcio/calmodulina ativado estimula a NOS, gerando NO, que desta forma é liberado continuamente pelas células endoteliais mantendo a célula muscular lisa em constante estado de vasodilatação (MONCADA e HIGGS, 1993).

Os efeitos do NO podem ser reproduzidos pelos nitrovasodilatadores, destacando-se o gliceril trinitrato e o nitroprussiato de sódio. Desde então, considera-se que o NO seja o nitrovasodilatador endógeno. *In vivo*, a inibição aguda da síntese de NO determina aumento da resistência vascular podendo levar à hipertensão. Estes efeitos geralmente são acompanhados por queda do débito cardíaco e bradicardia (GARDINER et al., 1990a; ZAPPELLINI et al., 1996). Estas alterações indicam que o NO, em condições basais, é liberado para modular o tônus da célula muscular lisa vascular bem como o fluxo sanguíneo.

De fato, a inibição crônica da síntese de NO em ratos constitui atualmente um modelo de hipertensão arterial (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992), causando também hipertrofia cardíaca, isquemia miocárdica, necrose e fibrose (MORENO et al., 1996).

1.9- Compostos ativadores da GCs independentes de óxido nítrico

Nos últimos anos, uma nova classe de substâncias tem sido descrita como capaz de ativar a GCs por um mecanismo independente de NO. Esta nova classe de compostos tem como precursor o YC-1 que é capaz de ativar diretamente a GCs devido ao seu acoplamento a um sítio regulatório da enzima, independente do sítio regulatório e ligação do óxido nítrico (KO et al., 1994; WU et al., 1995). Este composto se liga a um sítio alostérico da enzima, nas cisteínas 238 e 243 da subunidade $\alpha 1$ da enzima. Esta região da GCs modula sua atividade catalítica e a resposta ao ligante acoplado ao grupamento heme, podendo ser intensificada na presença do NO (MÜLSCH et al., 1997; BECKER et al., 2001; MARTIN et al., 2001; STASCH et al., 2001; BRIONI et al., 2002).

Trabalhos realizados com anéis aórticos de coelho e cultura de células endoteliais de aorta bovina demonstraram que o YC-1 é capaz de aumentar os níveis de GMPc. Na presença do L-NAME, o efeito máximo do YC-1 é somente parcialmente diminuído, indicando que o YC-1, além de estimular a GCs em sítio diferente do NO, também estimula a síntese e liberação de NO endógeno das células endoteliais devido à ativação da NOS exercendo uma ação sinérgica sobre a GCs (WOHLFART et al., 1999). O YC-1 também aumenta os níveis de GMPc em células cromafins e células endoteliais adrenomedulares, sendo sua ação bloqueada pelo (1H-[1,2,4] oxadiazolo quinoxalin -1-one) ODQ (FERRERO e TORRES, 2001).

Em trabalho recente Hwang et. al., observaram que a inibição do *burst* respiratório e desgranulação de neutrófilos humanos pelo YC-1, não ocorre através da ativação da via dependente de GMPc, mas sim da via dependente de AMPc/proteína quinase A (PKA). Isto sugere a existência de um outro mecanismo de sinalização intracelular desencadeado por estes novos ativadores da GCs.

Recentemente, foi descrito o perfil farmacológico de um novo estimulador da GCs, o BAY 41-2272 e o seu análogo, BAY 41-8543, os quais são descritos como os mais promissores dentre mais de 2.000 derivados sintetizados. São moléculas com características e mecanismos similares ao YC-1, sendo, porém, mais potentes (STASCH et al., 2001, 2002 a).

A incubação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com BAY 41-2272 aumentou significativamente os níveis intracelulares de GMPc (CONNELLY et al., 2003).

O BAY 41-2272 é também um potente ativador da GCs em plaquetas humanas, sendo capaz de inibir os efeitos agregantes induzidos pelo colágeno, sem interferir com aquele induzido pela trombina (STASCH et al., 2001, 2002).

O BAY 41-2272 promove o relaxamento de musculatura lisa de anéis de aorta e artéria safena de coelhos *in vitro*. Quando administrado oralmente em ratos, o BAY 41-2272 produziu, em longo prazo, diminuição da pressão arterial média em animais hipertensos e normotensos (STASCH et al., 2001, 2002; STRAUB et al., 2002). O BAY 41-2272 também induz relaxamento *in vitro* de corpo cavernoso de coelho e humano (BARACAT et al., 2003; KALSI et al., 2003), tecido vaginal e clitoral de coelhas (CELLEK, 2003) e promove ereção peniana em coelhos (BISCHOFF et al., 2003). Este composto é ainda capaz de prolongar o tempo de sangramento em ratos (STASCH et al., 2001), e em modelo de insuficiência cardíaca congestiva em cães, o BAY 41-2272 aumenta o débito cardíaco e preserva a taxa de filtração glomerular, sem induzir ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (BOERRIGTER et al., 2003).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o BAY 41-2272 ativa a GCs nas concentrações de 0,1 nM a 100 µM. Esta estimulação é potencializada na presença de doadores de NO (2-(N,N-dietilamino)-diazendate-2-oxide e SIN-1) e revertido pelo ODQ (STASCH et al., 2001; Straub et al., 2001). Em estudos com a enzima GCs desprovida de grupamento heme, o BAY 41-2272 não foi capaz de ativá-la, demonstrando que seu mecanismo de ação é NO-independente, porém heme-dependente (STASCH et al., 2001).

Sendo assim, os estudos realizados sugerem a existência de um novo sítio regulatório na GCs, independente de NO, que por sua vez é ativado pelo BAY 41-2272, capaz de induzir vasodilatação (STACH et al., 2002 b) podendo atuar na modulação do sistema cardiovascular.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

A inibição da síntese de óxido nítrico pelo L-NAME é responsável em grande parte pelo surgimento de processos patológicos, principalmente para o sistema cardiovascular. O presente estudo teve como objetivo principal investigar o efeito do (BAY 41-2272, Bayer AG, Germany), um recente e potente estimulador da GCs - independente de NO em ratos, tanto do ponto de vista fisiológico quanto em processo fisiopatológico avaliando desta forma a importância desta via de estimulação na presença da hipertensão.

2.2- Objetivos específicos

- 1- Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial;
- 2- Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso cardíaco;
- 3- Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre o peso do ventrículo esquerdo;
- 4- Investigar o efeito do BAY 41-2272 na hipertrofia dos cardiomiócitos;
- 5- Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre a área de fibrose miocárdica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, o protocolo experimental foi submetido e aprovado junto a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA: <http://www.ib.unicamp.br/ceea>) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (parecer nº 438-2, de agosto de 2002).

3.1- Animais

Foram utilizados ratos machos heterogênicos, da linhagem Wistar/Uni, livres de patógenos específicos (SPF), pesando entre 250 a 350g com seis semanas de idade, procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polycarbonato transparente, no interior de uma estante ventilada (ALESCO), assegurando a qualidade sanitária dos animais, sob condições controladas de luminosidade 12 horas com luz fluorescente e temperatura ambiente de 19 a 21°C, recebendo água autoclavada e ração Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda.) esterilizadas fornecidas *ad libitum*, no setor quarentena do CEMIB, durante todo o experimento.

3.2- Implante do transdutor PA-C40

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico 3%- (Cristália – Produtos químicos farmacêuticos, Ltda), 30mg/Kg administrado por via intraperitoneal. Após a depilação da região abdominal, foi feita uma pré- assepsia com álcool iodado a 10%. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 4 cm na pele do abdômen para ter acesso à aorta descendente abdominal. O intestino foi afastado para o acesso da aorta descendente abdominal e a veia. Neste procedimento foi necessário separar a aorta da veia. A aorta descendente abdominal foi perfurada com agulha, e com o auxílio de uma espátula especial, foi introduzido o cateter do transdutor PA-C40 na luz da aorta e fixado com cola Vetbond (3M). Imediatamente após a fixação do cateter, verificou-se o sinal de frequência da

pulsção do animal utilizando um imã para ligar o transdutor e um rádio de frequência baixa para captar o sinal emitido pelo transdutor. Uma vez validado o sucesso do implante, o transdutor foi fixado com linha de sutura na parede interna do abdôme e a pele foi suturada e desinfectada com rifocina.

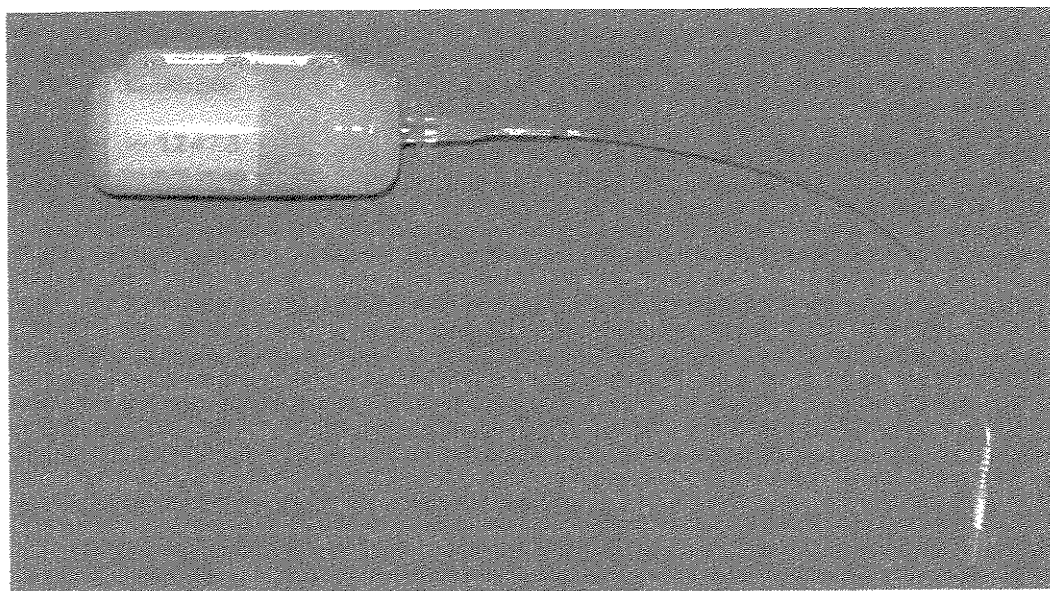


Ilustração 3 – Transdutor modelo PA-C 40



Ilustração 4 – Implante do transdutor fixo na parede abdominal do animal

3.3- Sistema de telemetria

Os animais implantados com o transdutor PA-C 40 ficaram sob observação, quanto à sua recuperação clínica, durante uma semana, sem qualquer tratamento da droga. Após esse período os animais foram pesados semanalmente e tiveram sua pressão arterial registrada, por um período de noventa segundos, duas vezes semanais, durante oito semanas consecutivas. Foram registradas as pressões sistólica, diastólica e frequência cardíaca, aproximadamente duas horas antes do início de qualquer manipulação. A coleta dos dados foi registrada, armazenada e mostrada pelo sistema de telemetria (Data Science Inc., St. Paul, MN, USA).

No dia pré-estabelecido da coleta dos registros da pressão arterial de cada rato, as gaiolas dos animais foram colocadas sobre o *receiver* individual. Logo após, foi ativado o transdutor dentro do animal, mediante a passagem de um ímã no exterior da gaiola próximo ao animal. Desta forma, o transdutor passou a enviar sinal para o computador registrar, armazenar e exibir as medições da pressão arterial e frequência cardíaca, conforme mostra a Ilustração 5.

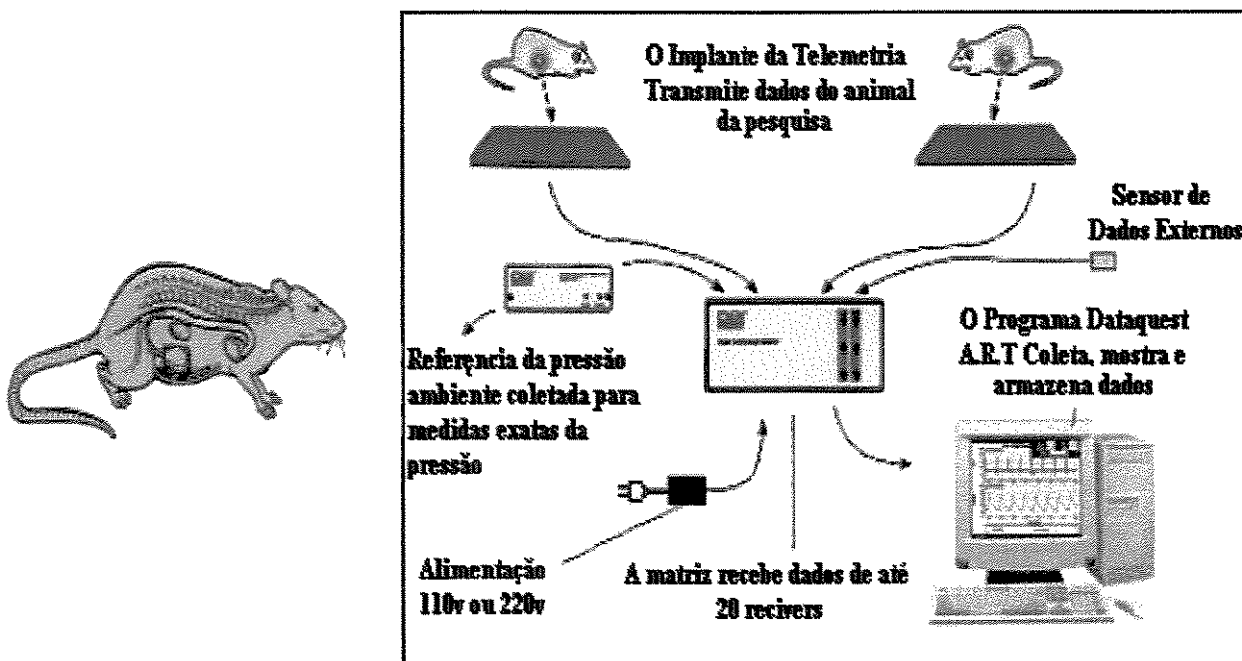


Ilustração 5 – Mecanismo utilizado para aquisição dos dados da pressão arterial e frequência cardíaca.

3.4- Obtenção do índice do peso cardíaco e do índice do peso do ventrículo esquerdo

Após oito semanas de tratamento, os ratos foram pesados e sacrificados por overdose de pentobarbital sódico 3%. O coração foi extraído, lavado com solução salina (cloreto de sódio dissolvido em água na concentração de 0,9%, p/v) para a remoção de coágulos e imersos em solução de formalina 10% por 24 horas. Em seguida, os corações foram dissecados, os átrios removidos e os ventrículos pesados, obtendo dessa forma o peso cardíaco.

Após a retirada do ventrículo direito, o tecido remanescente foi pesado e obteve-se o peso ventricular esquerdo. Esses valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido na última semana e, dessa forma, foram finalmente expressos como: peso cardíaco e índice do ventrículo esquerdo.

3.5- Análise histológica cardíaca

O ventrículo esquerdo e septo foram cortados em cinco diferentes anéis equidistantes perpendiculares ao maior eixo do ventrículo. A seguir, os anéis sofreram processamento histológico de rotina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Os anéis foram embebidos em parafina, cortados em micrótomo com espessura de 5µm e corados com tricrômico de Masson para análise estereológica.

3.5.1- Análise estereológica

O grau de fibrose foi avaliado quantitativamente pelo método de densidade de volume (Vv) (AHERNE, 1970). A análise das lâminas foi feita em microscópio ótico (Zeiss, Alemanha), e o volume relativo ocupado pelo tecido conjuntivo nos átrios foi medido com uma ocular contendo um retículo de integração de 25 pontos (5 linhas paralelas com 5 pontos cada).

Para avaliar o grau de fibrose no corte histológico considerou-se o número de vezes em que os 25 pontos coincidiam com áreas de tecido conjuntivo. Foi obtida a fração de volume ocupado por tecido conjuntivo (**Ppi**) através da seguinte fórmula: **Ppi**=**p/P**, onde **p** é a soma de números de pontos que coincidem com tecido conjuntivo e **P** é o número total de pontos do campo total na lâmina.

O parâmetro estereológico da densidade de volume (Vv) foi analisado para determinar a hipertrofia do cardiomiócito. Vv foi calculado pela seguinte fórmula:

Vv= **p/Pt**, onde **p** = ponto que coincidem no miócito e **Pt** =total de pontos do sistema teste que caem sobre o coração nos 20 campos microscópio. A área de fibrose foi avaliada quantitativamente usando programa Software Zeins (Axio Vision 3.01, Germany), que permite calcular eletronicamente a área total da lesão do miocárdio.

3.6- Protocolo experimental

Hipertensão induzida pela inibição crônica da síntese de NO

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, submetidos a um tratamento diário por um período de oito semanas:

Grupo Controle – (n= 10) recebeu 1ml de DMSO 80% por gavagem esofágica;

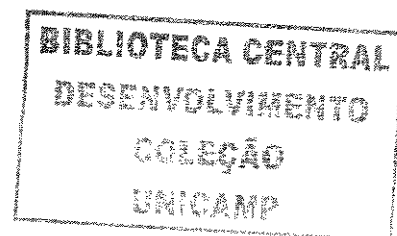
Grupo L-NAME – (n=20) recebeu L-NAME (20 mg/rato/dia) no bebedouro e 1ml DMSO 80% por gavagem esofágica;

Grupo L-NAME + BAY – (n=15) receberam L-NAME (20 mg/rato/dia) no bebedouro e BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia) dissolvidos em 1ml DMSO 80% por gavagem esofágica.

Grupo BAY – (n=15) recebeu BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia) dissolvidos em 1 ml DMSO 80% por gavagem esofágica.

3.7- Análise estatística

Os valores experimentais foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (EPM) de n experimentos indicados em cada caso. Análise de variância (ANOVA) e teste de t de *Student* (pareado ou para comparação múltiplas) foram empregados para avaliar diferenças entre grupos experimentais. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.



4- RESULTADOS

4.1. Efeito do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial sanguínea dos ratos

É possível observar na Figura 1 os resultados obtidos da média da pressão arterial dos ratos após oito semanas de tratamento consecutivo, onde os animais do grupo controle permaneceram normotensos durante todo o período do experimento.

O tratamento crônico com o inibidor da NO sintase (L-NAME) induziu um aumento significativo da pressão arterial média (178 ± 8.4 mmHg) quando comparado aos animais do grupo controle (109 ± 5.0 mmHg) adotando que $P < 0.01$ é significativo.

O grupo dos animais tratados com o ativador específico da guanilato ciclase solúvel L-NAME + BAY mostrou uma diminuição na pressão arterial média (112 ± 5.1), quando comparado ao grupo L-NAME, considerando $P < 0.01$.

Os animais tratados com BAY 41-2272 apresentaram uma diminuição na pressão arterial média (92 ± 2.1 mmHg) comparado ao grupo controle, considerando $P < 0.05$.

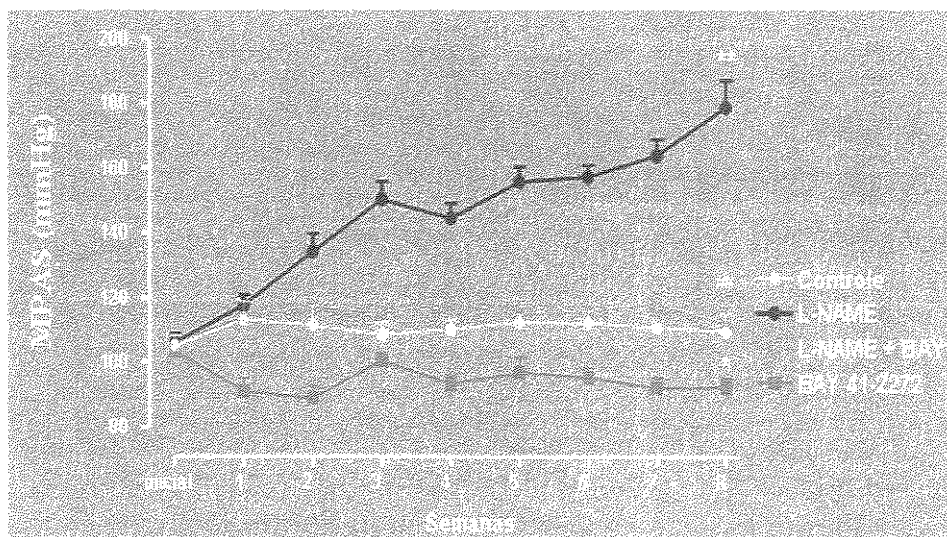


Figura 1 – Efeito do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial sanguínea dos ratos. Média da pressão arterial (mmHg) determinada pela radiotelemetria em ratos Wistar/Uni, tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20), BAY 41-2272 (n=15) comparados com o grupo controle (n=10), L-NAME + BAY (n=15) comparados ao grupo L-NAME. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM, onde * $P < 0,05$, ** comparado ao grupo controle $P < 0,01$ e ## $P < 0,01$, comparado ao L-NAME.

4.2- Efeito do tratamento sobre o peso corpóreo

A Figura 2 demonstra que os animais tratados com L-NAME e o BAY 41-2272 apresentaram um ganho de peso significativamente menor quando comparado ao peso corpóreo do grupo controle.

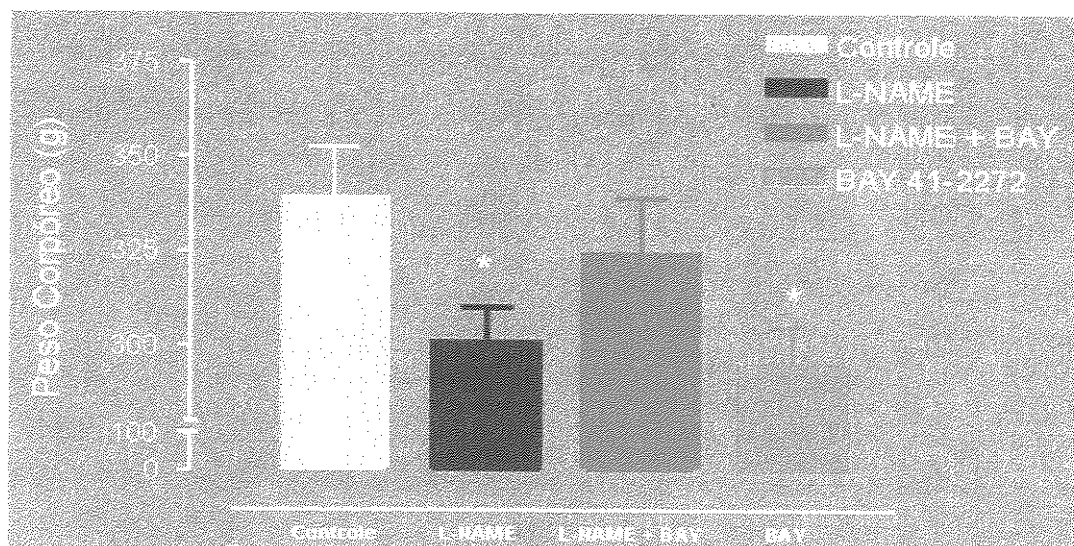


Figura 2 - Média do peso corporal. Ratos WISTAR/Uni tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20), L-NAME + BAY (n=15) e BAY 41-2272 (n=15) comparados com grupo controle (n=10). Resultados são expressos como média ± EPM, onde * $P < 0,05$

4.3- Efeito do BAY 41-2272 sobre índice do peso cardíaco

A Figura 3 demonstra um aumento significativo do índice do peso cardíaco (IPC) nos animais tratados durante oito semanas com L-NAME ($2.81 \pm 0.13 \text{ mg/g}$) comparado ao grupo controle ($2.39 \pm 0.18 \text{ mg/g}$).

Os animais tratados concomitantemente com L-NAME + BAY ($2.46 \pm 0.21\text{mg/g}$), atenuaram significativamente o aumento do índice do peso cardíaco quando comparados ao grupo L-NAME. Já os animais tratados com BAY 41-2272 não apresentaram mudanças comparadas ao grupo controle.

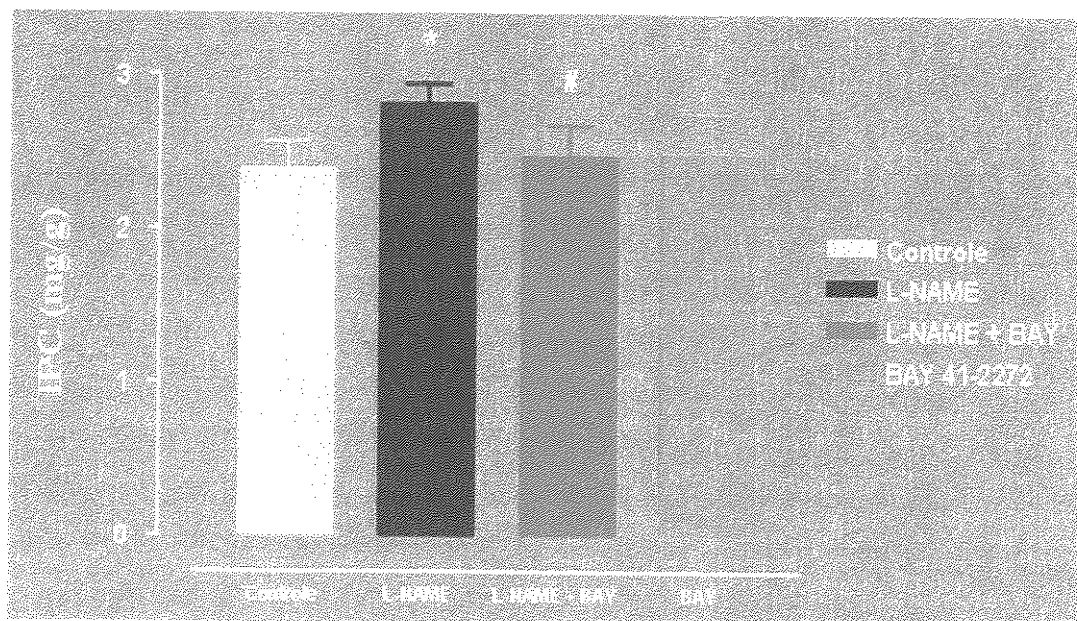


Figura 3 – Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso cardíaco dos ratos. Média do índice do peso cardíaco (IPC) expresso em mg/g de ratos Wistar/Uni tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20), L-NAME + BAY(n=15) e BAY 41-2272 (n=15). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM, onde * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (n=10) e # $P < 0,05$ comparado ao grupo L-NAME.

4.4- Efeito do BAY 41-2272 sobre o índice do peso do ventrículo esquerdo

A Figura 4 ilustra o índice do peso do ventrículo esquerdo (IPVE) expresso em mg/g, após oito semanas de tratamento. Os animais tratados com L-NAME apresentaram um aumento significativo do IPVE ($2.08 \pm 0.19 \text{ mg/g}$), quando comparado ao grupo controle (1.12 ± 0.15).

O Co-tratamento com BAY (1.22 ± 0.59 mg/g) reduziu significativamente o aumento do IPVE, quando comparado ao grupo L-NAME. Já os animais tratados com BAY 41-2272 não apresentaram qualquer alteração quando comparado ao grupo controle.

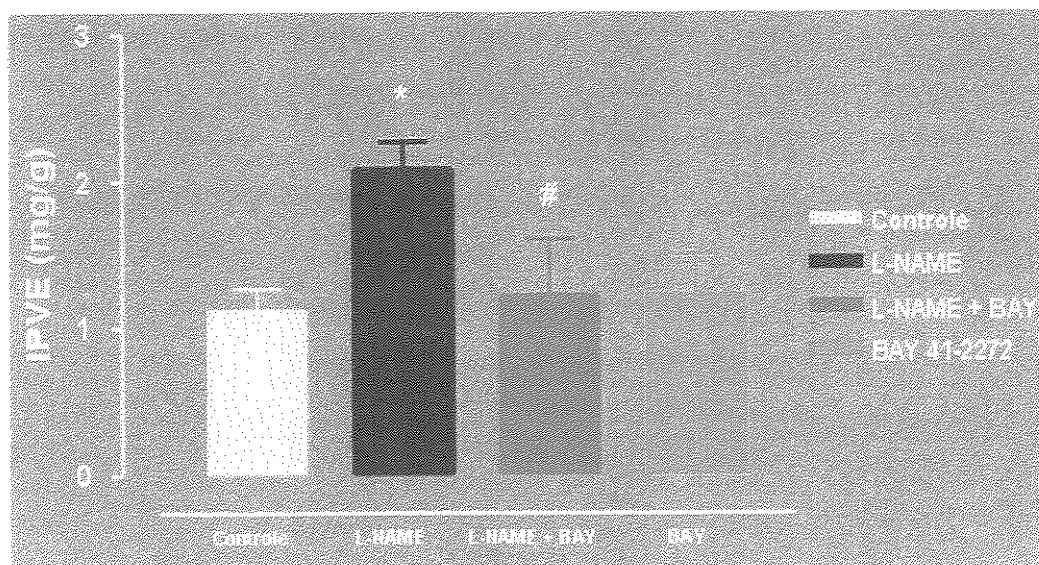


Figura 4- Efeito do BAY 41-2272 sobre índice do peso ventrículo esquerdo. Média do índice do peso ventrículo esquerdo IPVE expresso em mg/g de ratos Wistar/Uni tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20) L-NAME + BAY(n=15) e BAY 41-2272 (n=15). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM, onde * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (n=10) e # $P < 0,05$ comparado ao grupo L-NAME.

4.5- Efeito do BAY 41-2272 sobre a frequência cardíaca

Somente o grupo dos animais tratados com o BAY 41-2272 apresentou um aumento significativo da frequência cardíaca em relação ao grupo controle Figura 5.

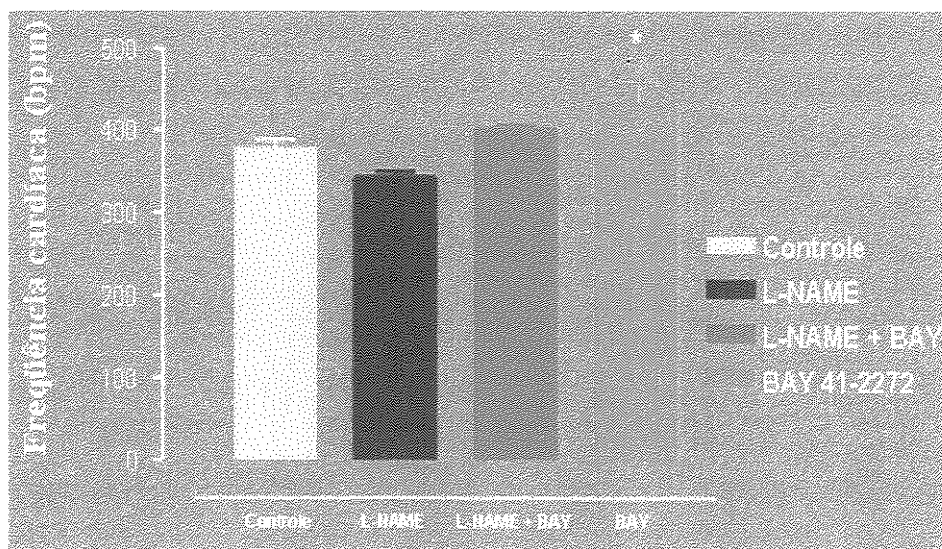


Figura 5- Frequência cardíaca (bpm) ratos wistar/uni tratados durante oito semanas. L-NAME, (n=20) L-NAME + BAY (n=15) e BAY 41-2272 (n=15). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM, onde * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (n=10).

4.6- Efeito do BAY 41-2272 sobre a hipertrofia dos cardiomiócitos

Os animais submetidos ao tratamento crônico com o inibidor da NO sintase (L-NAME), após oito semanas, induziu significativamente a hipertrofia dos cardiomiócitos (83.25 ± 1.65), expressada pela densidade do volume (Vv) quando comparado ao grupo controle (74.06 ± 1.70).

Os animais submetidos ao tratamento de L-NAME associado ao BAY 41-2272 apresentaram uma redução do tamanho do cardiomiócito (75.16 ± 1.72), quando comparado ao grupo L-NAME. Já os animais do grupo BAY e do grupo controle não apresentaram nenhuma alteração do tamanho dos cardiomiócitos. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 6.

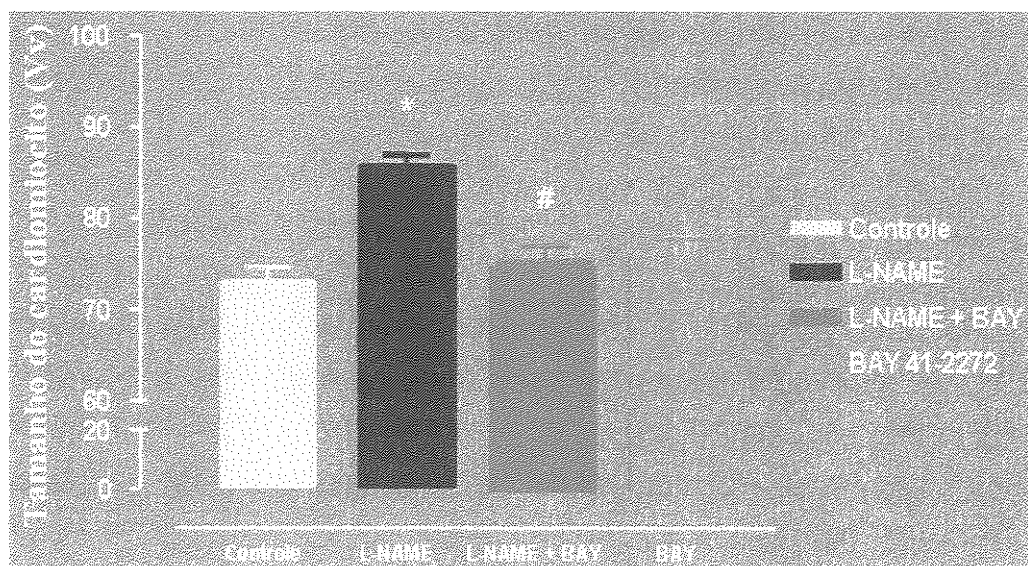


Figura 6- Efeito do BAY 41-2272 sobre o tamanho dos cardiomiócitos. Média da densidade de volume do cardiomiócito (Vv) em ratos Wistar/Uni tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20) L-NAME + BAY(n=15) e BAY 41-2272 (n=15). Resultados são expressos como média ± EPM, onde * P<0,05, comparado ao grupo controle (n=10) e # P<0,05 comparado ao grupo L-NAME.

4.7- Efeito do BAY 41-2272 sobre a área de fibrose

A Figura 7 demonstra que o grupo de animais submetidos ao tratamento com L-NAME apresentou uma extensa área de fibrose cardíaca ($13.2 \pm 1.3 \mu\text{m}^2 \times 10^3$).

Os animais que receberam o tratamento com BAY + L-NAME ($4.3 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \times 10^3$) apresentaram uma redução significativa da área de lesão quando comparado ao grupo L-NAME. E os animais tratados com BAY 41-2272 não apresentaram alterações.

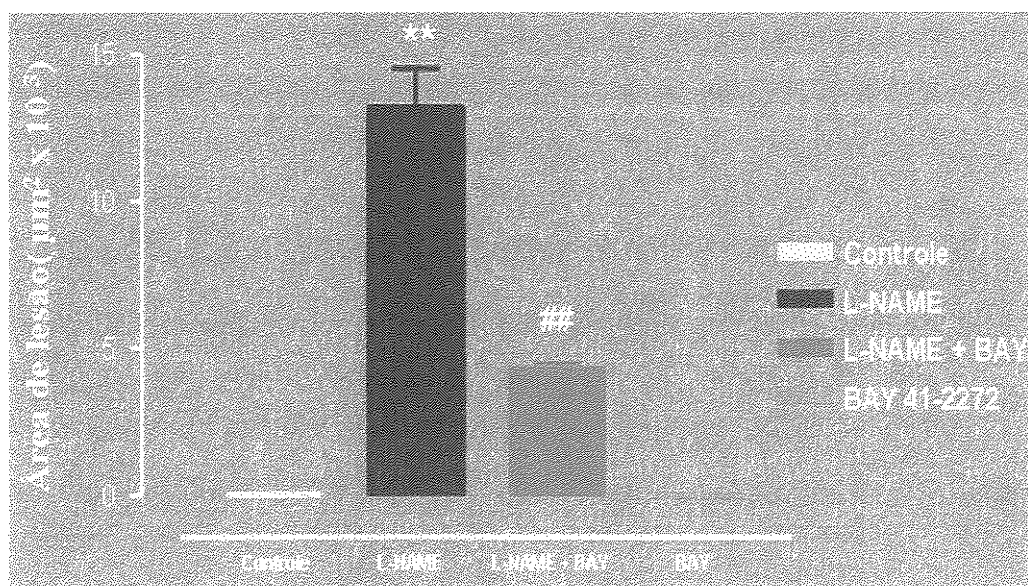


Figura 7- Efeito do BAY 41-2272 sobre área de lesão dos cardiomiócitos. Média da área de fibrose cardíaca expressa em $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ nos ratos Wistar/Uni tratados durante oito semanas com L-NAME (n=20) L-NAME + BAY (n=15) e BAY 41-2272 (n=15). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM, onde **P<0,01, comparado ao grupo controle (n=10) e ## P<0,01 comparado com o grupo L-NAME.

4.8- Fotomicrografia do ventrículo esquerdo

A Figura 8 ilustra uma fotomicrografia do ventrículo esquerdo de cada grupo experimental;

- Imagem 8A mostra a ausência de lesão cardíaca do grupo controle;
- Imagem 8B mostra o resultado dos animais que receberam o tratamento crônico com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME), evidenciado na figura por (*) uma extensa área de fibrose.

- Imagem 8C mostra a fotomicrografia do grupo L-NAME + BAY, onde não se encontra focalizada área de fibrose, apesar da constatação de baixa frequência da lesão neste tratamento.
- Imagem 8D revela a ausência de fibrose cardíaca no grupo BAY, comportando-se semelhante ao grupo controle Imagem 8A.

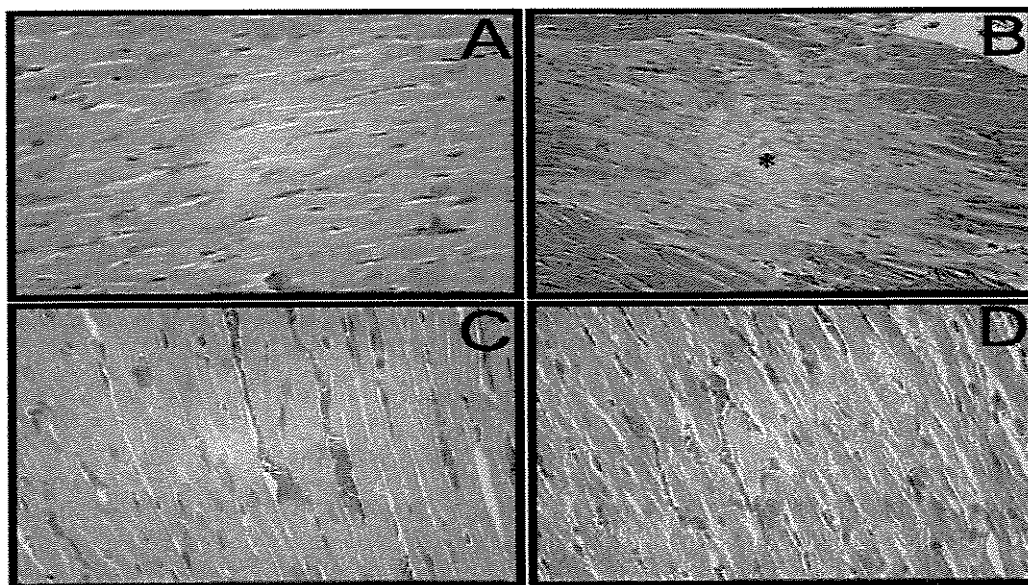


Figura 8- Fotomicrografia do ventrículo esquerdo. A- controle; B- L-NAME; C- L-NAME + BAY; D- BAY. Coloração pelo tricrômico de Masson (1000x). (*) Indica a área de fibrose cardíaca.

5- DISCUSSÃO

O NO tem papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo e na pressão arterial (MONCADA et al., 1991). No coração, o NO derivado do endotélio modula o relaxamento do miocárdio e a função diastólica, reduzindo o consumo de oxigênio independente dos efeitos na função contrátil (JONAS & KACZMAREK, 1996; SHAH, 2000; LECLERCQ et al., 2002). Por outro lado, a queda de débito cardíaco é desencadeada por compostos que inibem a NOS (GARDNER et al., 1990). Verifica-se que a produção contínua de NO é essencial para a manutenção do tônus basal em diversos leitos vasculares (HUSSAIN, 1998; HIGASHI & CHAYAMA, 2002) mantendo a homeostase vascular através da atividade constante do estado de vasodilatação da célula muscular lisa (MONCADA e HIGGS, 1993).

ZAPPELLINI et al., (1996) demonstraram que a inibição aguda da síntese de NO utilizando L-NAME induziu a hipertensão arterial em cães anestesiados. A hipertensão arterial decorrente do aumento da resistência vascular sistêmica é observada também em ratos (GARDINER et al., 1990), em coelhos (KLABUNDE et al., 1991), em gatos (BOWER e LAW, 1993) e em humanos (STAMLER et al., 1994).

A inibição da síntese de NO pelo tratamento crônico com L-NAME em ratos acarreta hipertensão arterial acompanhada de alterações patológicas do coração, tais como fibrose intersticial, necrose subendocárdica e hipertrofia ventricular esquerda (MORENO et al., 1996). (PACCA et al., 2002) adotando protocolo similar em ratos Wistar, tratados com L-NAME durante oito semanas, constataram a elevação da média da pressão arterial, hipertrofia do cardiomiócito e fibrose do miocárdio, destacando-se que houve uma mortalidade de 33%.

Os resultados do presente estudo referentes ao tratamento com L-NAME evidenciaram o aumento da pressão arterial, hipertrofia do ventrículo esquerdo, aumento do tamanho do cardiomiócito e fibrose cardíaca. Ao final do experimento testes microbiológicos em animais sentinelas mantidos em cada grupo de animais tratados não detectaram alterações no padrão sanitário, indicando que as técnicas de manejo e as condições ambientes adotadas foram suficientes na preservação das condições de saúde dos animais. A certificação sanitária desses animais pode ser comprovada no laudo emitido

pelo laboratório de controle de qualidade animal (Anexo 2) do CEMIB, que o classifica como livre dos agentes patógenos pesquisados e padrão VAF (Vírus Antibody Free).

O tratamento pelo L-NAME apresenta algumas implicações que devem ser consideradas: 1- L-NAME inibe também outras enzimas que apresentam o grupo “heme” em sua estrutura, como por exemplo, a P450, importante na síntese de produtos vasoativos; 2- O L-NAME pode ativar sistemas pressores tais como simpático e sistema renina-angiotensina; 3- O L-NAME produz agregação plaquetária podendo induzir isquemia renal pela ativação do sistema renina-angiotensina (KRIEGER et al., 1996). Convém ressaltar que os resultados obtidos nos grupos L-NAME e BAY 41-2272 revelaram redução do peso corporal, o que suscita oportunamente a avaliação histopatológica dos rins para possível confirmação de lesão renal.

No presente trabalho, adotamos o sistema de telemetria para monitoramento da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos Wistar tratados com o potente estimulador da GCs, o BAY 41-2272 que é duas vezes mais potente que seu precursor, o YC-1 (STASCH et al., 2001, 2002 b). Trabalhos realizados com anéis aórticos de coelho e cultura de células endoteliais de aorta bovina demonstraram que o YC-1 é capaz de aumentar os níveis de GMPc. Na presença do L-NAME, o efeito máximo do YC-1 é somente parcialmente diminuído, indicando que o YC-1, além de estimular a GCs em sítio diferente do NO, também estimula a síntese e liberação de NO endógeno das células endoteliais devido à ativação da NOS exercendo uma ação sinérgica sobre a GCs (WOHLFART et al., 1999). O YC-1 também aumenta os níveis de GMPc em células cromafins e células endoteliais adrenomedulares, sendo sua ação bloqueada pelo ODQ (FERRERO e TORRES, 2001).

O presente estudo mostrou que o BAY 41-2272 diminuiu significativamente a hipertensão causada pela administração prolongada de L-NAME, sugerindo que o mesmo inibe a vasoconstrição determinada pela deficiência crônica de NO. Estes resultados são concordantes com Stasch et al., (2001, 2002 b) e STRAUB et al., (2002) observaram que o BAY 41-2272, quando administrado oralmente em ratos, produziu, a longo prazo, a diminuição da pressão arterial média em animais hipertensos e normotensos.

Outros grupos de autores demonstraram que o BAY 41-2272 também induziu relaxamento *in vitro* de corpo cavernoso de coelho e humano (BARACAT et al., 2003; KALSI et al., 2003), tecido vaginal e clitoral de coelhas (Cellek, 2003) e promoveu ereção peniana em coelhos (BISCHOFF et al., 2003). Este composto é ainda capaz de prolongar o tempo de sangramento em ratos (STASCH et al., 2001). Em modelo de insuficiência cardíaca congestiva em cães, o BAY 41-2272 aumenta o débito cardíaco e preserva a taxa de filtração glomerular, sem induzir ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (BOERRIGTER et al., 2003).

Neste modelo experimental de inibição crônica de NO, observou-se que a hipertrofia do ventrículo esquerdo e dos cardiomiócitos acompanha a hipertensão arterial (MORENO, JR et al., 1995; NUMAGACHI et al., 1995; MORENO, JR et al., 1996; AKUZAWA et al., 1998; DEVLIN et al., 1998; GOMES PESSANHA et al., 1999). Isto foi confirmado no presente estudo; em oito semanas verificou-se que o tratamento com L-NAME acarretou aumento da pressão arterial, aumento significativo no índice de peso cardíaco (IPC) e índice do peso do ventrículo esquerdo (IPVE), como também aumento no tamanho dos cardiomiócitos dos ratos. Estes efeitos foram reduzidos significativamente pela terapia concomitante com BAY 41-2272.

Houve um aumento significativo da frequência cardíaca no grupo de animais tratados somente com BAY 41-2272, que pode ser caracterizado por um mecanismo compensatório à queda de pressão arterial. Entretanto, a confirmação dessas hipóteses deve ser investigada.

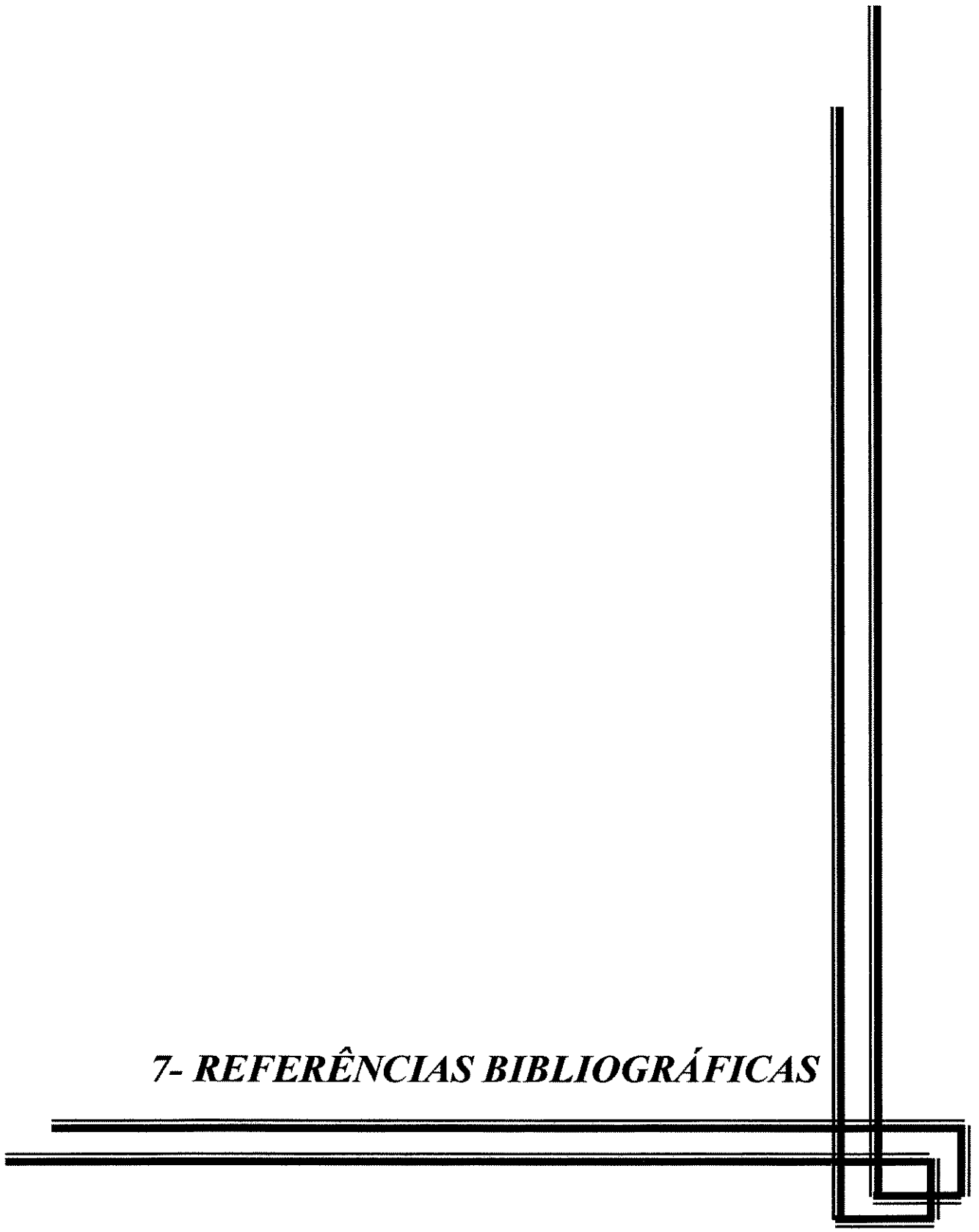
Dentre os novos compostos ativadores da GCs, o BAY 41-2272 parece ser útil como ferramenta farmacológica para o melhor entendimento do mecanismo de ação da guanilato ciclase solúvel, independente de óxido nítrico.

Um conhecimento mais aprofundado neste sentido pode ajudar no desenvolvimento de uma nova classe de drogas com perfil farmacológico diferente das drogas doadoras de NO e pode representar um novo recurso para prevenção e/ou tratamento da hipertensão.

6- CONCLUSÃO

- O BAY 41-2272 diminuiu de forma significativa a pressão arterial dos ratos submetidos ao tratamento crônico com L-NAME.
- O BAY 41-2272 reduziu de forma significativa o aumento do peso cardíaco dos ratos tratados com L-NAME.
- O BAY 41-2272 reduziu significativamente o aumento do índice do ventrículo esquerdo dos animais submetidos ao tratamento com L-NAME.
- O BAY 41-2272 reduziu significativamente a hipertrofia dos cardiomiócitos dos animais tratados cronicamente com L-NAME.
- O BAY 41-2272 produz um aumento significativo da frequência cardíaca.
- Baseado nos resultados obtidos pôde-se concluir que o BAY 41-2272 supre a deficiência de óxido nítrico em ratos tratados cronicamente com L-NAME por um mecanismo independente de NO.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AHERNE W. Quantitative methods in histology. *J Med Lab Technol.* 2: 160-70, 1970.

AKUZAWA N, NAKAMURA T, KURASHINA T, SAITO Y, HOSHINO J, SAKAMOTO H, SUMINO H, ONO Z, NAGAI R. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. **Am J Hypertens.** 11: 697-707, 1998

ANVERSA , P; HILER, B; RICCI, R; GUIDERI, G; OLIVETTI, G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. **Journal American Coll Cardiology**, 8: 1441-8, 1986.

ANVERSA, P.; VITALI-MAZZA. L.: LOUD, AV. Morphometric and autoradiographic study of developing ventricular and atrial myocardium in fetal rats. **Laboratory Investigation**, 6: 696-705, 1975.

BARACAT, J.S.; TEIXEIRA, C.E.; OKUYAMA, C.E.; PRIVIERO, F.B.; FARO, R.; ANTUNES, E.: DE NUCCI, G. Relaxing effects induced by the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, 477, 163-69, 2003.

BAYLIS ,C.; MITRUKA, B.: DENG A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **Journal of Clinical Investigation**, 90, 278-281, 1992.

BECKER, E.M. ; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PLEI, U. ; SCHMIDT, P.; SCHRAMM, M.; SCHRÖDER, H.; SCHROEDER, W.; STEINKE, W.; STRAUB, A.; STASCH, J-P. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-I and BAY 41-2272. **BCM Pharmacology**, 1: 13-24, 2001.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology**, 271: 1424-1437, 1996.

BECKMAN, J.S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical Research Toxicology**, 9: 836-844, 1996.

BERTHOLD, H.; JUST, A.; KIRCHHEIN, H.R.; EHMKE, H. Interaction between nitric oxide and endogenous vasoconstrictors in control of renal blood flow. **Hypertension**, 34; 1254-58, 1999.

BIEL, M.; ZONG, X.; LUDWIG, A.; SAUTTER, A.; HOFMANN, F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. **Rev. Physiology Biochemistry Pharmacology**, 135: 151-171, 1999.

BISCHOFF, M.; SCHRAMM, M.; STRAUB, A.; FEURER, A.; STASCH, J.P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylate cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. **Urology**, 61: 464-67, 2003

BOERRIGTER, G.; COSTELLO-BOERRIGTER, L.C.; CATALIOTTI, A.; TSURUDA, T.; HARTY, G.J.; LAPP, H.; STASCH, J.P.; BURNETT, J.C. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. **Circulation**, 107: 686-89, 2003.

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. **British Journal Pharmacology**, 108; 4933-4940, 1993.

BRAUGHLER, J.M.; MITTAL, C.K.; MURID, F. Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver. **Proceedings of National Academic of Science**, 76; 219-222, 1979.

BRAUNWALD E, PFEFFER MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. **Am J Cardiol.**, 14:1D-6D, Review. 1991

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of National Academic Science**, 86: 9030-33, 1991

BRIONI, J.D.; NAKANE, M.; HSIEH, G.C.; MORELAND, R.B.; KOLASA, T.; SULLIVAN, J.P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **International Journal Impot. Research**, 14:8-14, 2002.

CAMPBELL SE, KORECKY B, RAKUSAN K.; Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. **Circ Res.**, 68:984-96, 1991

CELEK, S. The Rho-kinase inhibitor Y-27632 and the soluble guanylate cyclase activator BAY 41-2272 relax rabbit vaginal wall and clitoral corpus cavernosum. **British Journal of Pharmacology**, 138: 287-290, 2003.

CONNELLY, L.; JACOBS, A.T.; PALACIOS-CALLENDER, M.; MONCADA, S; HOBBS, A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **Journal Biology and Chemistry**, 278: 26.480- 87, 2003.

ELEFThERIADES, EG.; DURAND, JB.; FERGUSON, AG.; ENGELMANN ,GL.; JONES, SB. & SAMAREL. AM. Regulation of procollagen metabolism in the pressure-overloaded rat heart. **Journal Clinical Investigation**, 91: 1113-1122, 1993.

FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H, STUEHR DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **J Med Chem**, 4: 491-6, 1993.

FERRERO, R.; TORRES, M. Prolonged exposure to YC-1 induces apoptosis in adrenomedullary endothelial and chromaffin cells through a cGMP-independent mechanism. **Neuropharmacology**, 41: 895-906, 2001.

FRANCIS, S.H.; TURKO, I.V.; CORBIN, J.D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, 65: 1-52 ,2001.

FRANCHINI C, CORBO F, LENTINI G, BRUNO G, SCILIMATI A, TORTORELLA V, CONTE CAMERINO D, DE LUCA A.; Synthesis of new 2,6-prolylxylidide analogues of tocainide as stereoselective blockers of voltage-gated Na(+) channels with increased potency and improved use-dependent activity., 5: 3792-8 **J Med Chem**. 2000.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. Reveal the obligatory role of endothelium for arterial relaxation to acetylcholine. **Nature**, 288: 373-76, 1980.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T.; HARTLEY, C.J. Can pulsed Doppler technique measure changes in aortic blood flow in conscious rats? **Journal Physiology**, 259: 448-456, 1990a.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; KEMP, P.A.; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **British Journal of Pharmacology**, 101: 632-39, 1990b.

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: 678-86, 1982.

GOMES PESSANHA M, MANDARIM-DE-LACERDA CA, DUMAS HAHN M. Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of the nitric oxide synthesis. **Pathobiology**. 1: 26-33, 1999

GRAY MO, LONG CS, KALINYAK JE, LI HT, KARLINER JS, Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. **Cardiovasc. Res**, 2: 352-63, 1998

GROVES, J.T.; WANG, C.Y. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Curr Op Chem Biol**, 4: 687-695, 2000.

HARTENECK, C.; KOESLING, D.; SÖLING, A.; SCHULTZ, G; BÖHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Letters**; 272: 221-23, 1990.

HIGASHI, Y.; CHAYAMA, K. Renal endothelial dysfunction and hypertension. **Journal Diabetes Complications**, 16: 103-07, 2002.

HOBBS, A.J.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. **Methods Enzymology**, 269: 134-148, 1996.

HOBBS, A.J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends of Pharmacology Science**, 18: 484-91, 1997.

HUSSAIN, SNA. Activity of nitric oxide synthase in the ventilatory muscle vasculature. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiology**, 119: 191-201, 1998.

HWANG, T.; HUNG, H.; KAO, S.; TENG, C.; WU, C. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. **Molecular Pharmacology**, 64: 1419-1427, 2003.

IGNARRO, L.; MURAD, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Advances in Pharmacology**, 34: 1-516, 1995.

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. **Biochim. Biophys. Acta**, 718: 49-59, 1982.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.; BUGA, G.M.; WOOD, R.S.; CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superóxide dismutase to study the endothelium dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, 244: 181-9, 1987.

JONAS, E.A.; KACZMAREK, L.K. Regulation of potassium channels by protein kinases. **Current Opinion in Neurobiology**, 6: 318-23, 1996.

JUILFS, DM.; SODERLING, S.; BURNS, F.; BEAVO, JA. CYCLIC GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Rev Physiol Biochem Pharmacology**, 135: 67-104, 1999.

JUNQUEIRA L.C; CARNEIRO J. **Histologia básica**, São Paulo ed. NOBEL, 1978 . A histologia e seus métodos de estudo; 1-2, 1999

KALSI, J.S.; REES, R.W.; HOBBS, A.; ROYLE, M., KELL, P.D.; RALPH, D.J.; MONCADA, S.; CELLEK, S. BAY 41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **The Journal of Urology**, 169: 761-6, 2003.

KERWIN, JF ; LANCASTER, JR.; FELDMAN, PL .Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **Journal of Medicine Chemistry**, 38: 4343-62, 1995.

KHATSENKO, OG; GROSS, SS; RIFKIND, AB; VANE, JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. **Proceedings of National Academic of Science**, 90: 11147-51, 1993.

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. **European Journal of Pharmacology**, 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: 4226-33, 1994.

KORECKY B, RAKUSAN K.; Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. **Am J Physiol**, 2: 123-8 1978.

KRIEGER, E.M.; FRANCHINI, K.G.; KRIEGER, JE. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. **Circ Res. Medicina**, Ribeirão Preto: 29: 181-92, 1996.

KRUPINSKI, J.; COUSSEN, F; BAKALYAR, H.A.; TANG, W.J.; FEINSTEIN, P.G.; ORTH, K. & SLAUGHTER, C. Adenyl cyclase amino acid sequence: Possible channel-or transporter-like structure. **Science**, 244: 1558-64, 1989.

LE NOBLE, F.A.; STASSEN, F.R.; HACKING, W.J.; STRUIJKER. BOUDIER, H.A. Angiogenesis and hypertension. **Journal Hypertension**, 16: 1563-72, 1998.

LECLERCQ, B.; JAIMES, E.A.; RAIJI, L. Nitric Oxide synthase and hypertension. **Current Opinion Nephrology Hypertension**, 11: 185-9, 2002.

LOHMANN, S.M.; VAANDRAGER, A.B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; De LONGE, H.R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends of Biochemistry Science**, 22: 307-12, 1997.

LOUD AV, ANVERSA P, GIACOMELLI F, WIENER J. Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size. **Lab Invest**, 38:586-96, 1978.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P. & WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, 52: 375-413, 2000.

MARLETTA MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**, Review, 17:12231-4. 1993.

MARTIN, E.; LEE, Y.C.; MURAD, F. YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. **Proceedings of National Academic of Science**, 98: 12938-42, 2001.

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, 2:109-42. 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, 329: 2002-12, 1993 a.

MONCADA, S.; HIGGS, G.A. Leukotrienes in disease. Implications for drug development. **Drugs**, 30: 1-5, 1993 b.

MOORE, P.K.; AL-SWAYEH, O.A.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. L-^N-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". **British Journal of Pharmacology**, 99: 408-12, 1990.

MORENO ,H .Jr; METZE. K.; BENTO. AC.; ANTUNES.E.; ZATZ. R.; De NUCCI , G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Research Cardiology**, 91: 248-55,1996.

MÜLSCH, A., BAUERSACHS, J., SCHAFER, A., STASCH, J.P., KAST, R., BUSSE, R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **British Journal of Pharmacology**, 120: 681-9, 1997.

MÜLSH, A.; BUSSE, R. NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, 341: 143-7, 1990.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. **Journal Clinical Investigation**, 78: 1-5, 1986.

MURAD F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent Prog Horm Research**, 49: 239-48, 1994.

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. Biochemistry and Biophysics**, 218: 187-98, 1982.

PACCA, SRMC.; AZEVEDO , AP.; OLIVEIRA, CF.; De LUCA,IMS.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Attenuation of hypertension cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by β -adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 39: 201-7, 2002.

PALMER ,RM; REES, DD; ASHTON ;DS; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Research Commun.**, 153: 1251-56, 1988.

PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovascular Research**, 28: 34-39, 1994.

PLANTE, G.E. Vascular response to stress in health and disease. **Metabolism**, 51: 25-30, 2002.

RAKUSAN K, RAMAN S, LAYBERRY R, KORECKY B.;The influence of aging and growth on the postnatal development of cardiac muscle in rats. **Am J Physiol**, 2: 212-8, 1978.

RAKUSAN ,K.; HRDINA, PW.; TUREK, Z.;LAKATTA ,EG.; SPURGEON, HA.; WOLFORD GD. Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. **Basic Res Cardiology**, 79: 389-95. 1984.

REES, DD; PALMER, RM; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of National Academic of Science**, 86: 3375-8, 1989.

RIBEIRO, MO.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, SM; ZATZ , R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, 20: 298-303, 1992.

SHAH, A.M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. **Cardiology Research.**, 45: 148-155, 2000.

SOUTHAN, GJ.; SZABO, C. THIERMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **British Journal of Pharmacology**, 114: 510-6, 1995.

STADLER J.; TROCKFELD, J.; SHMALIX. WA.; BRILL .T; SIEWERT.JR.; GREIM. H.; DOEHMER. J. Inhibition of cytochromes P450 1A by nitric oxide. **Proceedings of National Academic of Science**, 91: 3559-63, 1994.

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.

STASCH. JP.; BECKER. EM.; ALONSO-ALIJA. C.; APELER H.; DEMBOWSKY. K.; FEURER. A.; GERZER. R.; MINUTH. T.; PERZBORN .E.; PLEISS. U.; SCHRODER. H.; SCHROEDER. W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB. A.; SCHRAM, M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, 410: 212-5, 2001.

STASCH ,JP.; SCHMIDT ,P.; ALONSO-ALIJA ,C.; APELER, H.; DEMBOWSKY ,K.; HAERTER ,M.; HEIL, M.; MINUTH,T.; PERZBORN ,E.; PLEISS, U.; SCHRAMM ,M.; SCHROEDER, W.; SCHRODER ,H.; STAHL, E.; STEINKE ,W.; WUNDER F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British Journal of Pharmacology**, 36: 773-83. 2002 a.

STASCH, J.P., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., DEMBOWSKY, K., FEURER, A., MINUTH, T., PERZBORN, E., SCHRAMM, M., STRAUB, A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. **British Journal of Pharmacology**, 135: 333-43, 2002 b.

STONE. JR.; MARLETTA. MA .Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric state. **Biochemistry**, 33: 5636-40, 1994.

STRAUB. A.; STASCH .JP.; ALONSO-ALIJA .C.; BENET-BUCHHOLZ .J.; DUCKE B.; FEURER .A.; FURSTNER .C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorganism Medicine Chem Lett**, 11: 781-4, 2001.

STRAUB, A.; BENET-BUCHHOLZ, J.; FRÖDE, R.; KERN, A.; KOHLSDORFER, C.; SCHMITT, P.; SCHWARZ, T.; SIFERT, H.; STASCH, J.P. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorganism & Med. Chem.**, 10: 1711-17, 2002

CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, CUSHMAN WC, GREEN LA, IZZO JL JR, JONES DW, MATERSON BJ, OPARIL S, WRIGHT JT JR, ROCCELLA EJ; **Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee**, 6: 1206-52, 2000.

SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**, 34: 113-53, 1995.

VAN DER LAARSE, A.; VLIEGEN, HW.; VAN DER NAT, KH.; HOLLAAR, L.; EGAS, JM.; SWIER, GP.& VAN DEN BROEK AJ. Comparison of myocardial changes between pressure induced hypertrophy and normal growth in the rat heart. **Cardiovascular Research**, 23: 308-14, 1989.

WINK, DA.; MITCHELL, JB . Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic Biology Medicine**, 25: 434-56, 1998.

WOHLFART, P., MALINSKI, T., RUETTEN, H., SCHINDLER, U., LINZ, W., SCHOENAFINGER, K., STROBEL, H., WIEMER, G. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. **British Journal Pharmacology**, 128: 1316-22, 1999.

WU ,G; MORRIS ,SM JR . Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemistry Journal**, 336: 1-17, 1998.

WU, C.C.; KO, F.N.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; TENG, C.M. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. **British Journal Pharmacology**, 116: 1973-78, 1995.

YU,AE.; HU, S.; SPIRO. TG.; BURSTYN, JN. Resonance raman spectroscopy of soluble guanylyl cyclase reveals displacement of distal and proximal heme ligand by NO. **Journal of American Chemical Society**, 116: 4117-18, 1994.

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. **Brazilian Journal Medicine and Biology**, 29: 33-39, 1996.

8- OBRAS CONSULTADAS

BECKMAN JS; YE Y,Z; ANDERSON,PG; CHEN, J; ACCAVITTI ,MA, TARPEY . MM; WHITE ,CR. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, 375: 81-88, 1994.

BUECHLER, W.A., NAKANE, M.; MURAD, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochemistry Biophysics Research Community**, 174: 351-57, 1991.

BURCH, S.; OU, N. Current indications for ACE inhibitors and hope for the future. **American Journal Management Care**, 8: 478-490, 2002.

FISCHER, M.; BAESSLER, A. & SCHUNKERT, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiologic Research** , 53: 672-77, 2002.

FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 352: 351-364, 1995.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, 23: 1121-31, 1994.

FUKUYAMA, N.; TAKEBAYASHI, Y.; HIDA,M.; ISHIDA, H.; ICHIMORI, K.; NAKAZAWA, H .Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. **Free Radical Biology Medicine**, 22: 771-4, 1997.

GOOD, PF.; WERNER, P.; HSU. A.; OLANOW ,CW.; PERL ,DP .Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, 149: 21-28, 1996.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. ; GOODMAN,; GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. 9º ed . McGraw-Hill, 1996. HORIUCHI, M.; JUKKA, Y.A.; LEHTONEN-LAURENT, D. Signaling mechanism of the AT2. Angiotensin II receptor:

Crosstalk between AT1 and AT2 receptors in cell growth. **Science**, v. 10, p. 391-396, 1999.

ISCHIROPOULOS, H. ZHU, L. CHEN, J. TSAI, M. MARTIN, J.C. SMITH, C.D.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochemistry Biophysics**, 298: 431-7, 1992.

KAUR, H.; HALLIWELL B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. **FEBS Letters**, 350: 9-12, 1994.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase in mammals. **Biochemistry Journal**, 298: 249-58, 1994.

LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G.K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of National Academic of Science**, 89: 6348-52, 1992.

MONCADA, S.; HERMAN, A.G.; VANHOUTTE, P. Endothelium-derived relaxing factor identified as nitric oxide. **Trends in Pharmacology Science**, 8: 365-8, 1987.

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: 537-42, 2001.

SAYESKI, P.P.; ALI, M.S.; SEMENIUK, D.J.; DOAN, T.N.; BERNSTEIN, K.E. Angiotensin II signal transduction pathways. **Regulatory Peptides**, 78: 19-29, 1998.

SIRAGY, H M.; CARCY, RM. Angiotensin type 2 receptors: potential importance in the regulation of blood pressure. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 1: 99-103, 2001.

SMITH MA.; RICHEY-HARRIS .PL.; SAYRE. LM.; BECKMAN. JS.; PERRY. G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, 17: 2653-57, 1997.

TABACOVA, S.A.; KIMMEL, C.A. Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity. **Reproductive Toxicology**, 15: 467-78, 2001.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. **Drugs**, 62: 265-84, 2002.

TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol Science**, 23: 177-83, 2002.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, 24: 3A-9A, 2002.

VALLANCE,P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Journal of Cardiology Heart**, 85: 342-50, 2001.

VAN BORTEL, L.M.A.B., STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J., SAFAR, M.E. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. **Hypertension**, 38: 914-21, 2001.

VAN DER VLIET, A.; EISERICH, JP.; ONEILL, CA.; HALLIWELL, B.; CROSS, CE. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. **Arch Biochem Biophys**, 319: 341-9, 1995

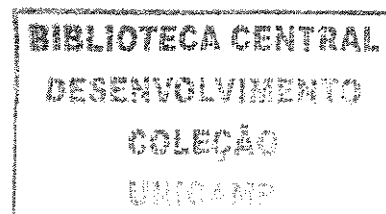
VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, 64: 327- 63, 2001.

WILLIAMS, G.H. The renin-angiotensin system and hypertension. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology Suppl**, 7: 31-40, 1982.

WINK, DA.; OSAWA, Y.; DARBYSHIRE, JF.; JONES,CR. ESHENAU, SC.; NIMS, RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. **Archives Biochemistry and Biophysics**, 300: 115-23, 1993.

WINK. DA; GRISHAM. MB; MITCHELL .JB; FORD. PC. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymology**, 268: 12-31, 1996.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI ,Y.; YAZAKI ,Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332: 411-5, 1998.



9- ANEXOS

Anexo 1- Cópia do certificado submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética na Experimentação Animal – CEEA –IB – UNICAMP.



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**



CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 438-2, sobre "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BAY 41-2272 NA PRESSÃO ARTERIAL SISTEMICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS ACORDADOS" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci/Renato do Rego Araujo Faro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08 de junho de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 438-2, entitled "EFFECT OF BAY 41-2272 ON SYSTEMIC ARTERIAL PRESSURE AND HEART RATE IN AWAKE RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 8, 2005.

Campinas, 08 de junho de 2005.

2ª. VIA

**Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP**

**Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP**

Anexo 2-Cópia do laudo controle sanitário emitido pelo laboratório de controle de qualidade animal do CEMIB.



UNICAMP

Ilmo.

Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI

Departamento de Farmacologia

Faculdade de Ciências Médicas

Unicamp

CEMIB/UNICAMP

ICLAS MONITORING / REFERENCE CENTER

International Council for Laboratory Animal Science



CERTIFICADO DE SANIDADE ANIMAL

Certificamos que os ratos heterogênicos da linhagem **WISTAR/ Uni**, originários das colônias de Produção S.P.F. (bloco B1), apresentam-se isentos dos seguintes agentes patogênicos, de acordo com os últimos testes de monitorização sanitária realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal – C. Q. S. (*):

1 - Ecto e Endoparasitas : *Radfordia sp.*, *Poliplax sp.*, *Ornithonyssus bacoti*, *Notodres muris*, *Laelaps echidimus*, *Syphacia sp.*, *Aspicularis tetraptera*, *Capillaria hepatica*, *Hymenolepis sp.*, *Trichosomoides crassicauda*, *Trichuris muris*, *Taenia taeniaformis*, *Trichinella spiralis*, *Spiromucleus muris*, *Giardia muris*, *Entamoeba muris*, *Tritrichomonas muris*, *Trichomonas minuta*, *Eimeria sp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris*, *Toxoplasma gondii*, *Hexamastix muris*, *Trypanosoma lewisi*.

2 - Bactérias, Rickettsias e fungos : *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma neurolyticum*, *Clostridium piliforme* (*Bacillus piliformis*), *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter freundii* biotipo 4280, *Streptococcus β-hemolíticos grupo A*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptobacillus moniliformis*, *Corynebacterium kutscheri*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella pneumotropica*, *Leptospira sp.*, *Hemobartonella muris*, *Eperythrozoon coccoides*, dermatofitos (*Trichophyton sp.*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*) *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*.

3 - Vírus : Coronavírus do rato (Rat Corona Virus - RCV e vírus da Sialodacrioadenite - SDAV), parvovírus (Kilhan rat virus - KRV, vírus Toxan H-1, vírus minuto do camundongo – MVM e Rat parvovírus – RPV), vírus da encefalomielite de Theiler (TMEV), poxvírus do rato, vírus Sendai, vírus da Coriomeningite linfocitária (LCM), Reovírus tipo 3, Adenovírus murino tipo 1, Citomegalovírus murino (MCMV), Rotavírus grupo A/B (Edim/Idir), vírus da pneumonia do camundongo (PVM).

Informamos ainda que os mesmos se encontram livres de outros agentes infecciosos capazes de causar risco à saúde humana.

ATENÇÃO : para a manutenção do padrão sanitário descrito é fundamental que os animais sejam transportados em contêineres apropriados, que não devem ser abertos durante o transporte e que os animais sejam acondicionados em unidades isoladoras ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção adequadas para manutenção de animais S.P.F..

(*) data dos últimos testes realizados: Dezembro de 2003.

Campinas, 12 de Janeiro de 2004.

Dra. Ana Maria A. Guaraldo

Diretora do Cemib/Unicamp

Fones : (0xx19)3788-7652 / 3788-7638

Fax: 0xx19-3788.7670

E-mail : guaraldo@cemib.unicamp.br

Dr. Rovilson Gilioli

Diretoria de Controle de Qualidade Animal

Seção de Controle de Qualidade Sanitária

Fones : (0xx19) 3788-8272 / 3788-8273

E-mail : rovison@unicamp.br

**Anexo 3- Cópia do Trabalho submetido à Revista ELSEVIER VASCULAR
PHAMACOLOGY.**

**Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart and
cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats.**

**Marcos Zanolin^{a,b}, Renato Faro^{a,*}, Eugênio G. Araujo^c, Ana Maria Aparecida
Guaraldo^b, Edson Antunes^a and Gilberto De Nucci^a**

*^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, ^bCEMIB - Multidisciplinary
Center for Biological Investigation, UNICAMP, Campinas (SP) and ^cVeterinary Medicine
School, Federal University of Goiás (GO), Brazil.*

***Author for correspondence:**

Renato Faro, PhD

Department of Pharmacology

Faculty of Medical Sciences

UNICAMP PO Box 6111

13081-970

Campinas (SP), Brazil

Tel: +55-19-3788-9554

Fax: +55-19-3252-1516

E-mail: rfaro@cartesius.com

Short title: "Protective cardiovascular effects of BAY 41-2272."

Summary

This study evaluated the effects of BAY 41-2272 (BAY), a specific activator of sGC NO-independent action on changes of mean arterial blood pressure (MABP), heart and left ventricle weight indexes (HWI and LVWI, respectively), cardiomyocyte hypertrophy (Vv) and fibrosis area induced by chronic L-NAME treatment in rats. The animals were divided in a) Control group; b) L-NAME group; c) L-NAME+BAY group and d) BAY group. Eight-week of L-NAME treatment caused a significant increase in MABP when compared to untreated rats (173 ± 11.1 and 109 ± 5.0 mmHg, respectively; $p < 0.01$). L-NAME + BAY co-treatment abolished the L-NAME-induced hypertension (112 ± 5.1 mmHg; $p < 0.01$). Significant increases in HWI and LVWI as well as in Vv were observed in the L-NAME-treated animals compared to control group, and concomitant treatment with BAY significantly attenuated this hypertrophic effect. Treatment with L-NAME presented several areas of repairing fibrosis in left ventricles, and this effect was also abolished by BAY co-treatment. Our results demonstrate that BAY 41-2272 inhibits hypertension and prevents heart abnormalities (cardiac hypertrophy and increased fibrosis areas) induced by NOS inhibition.

Key words: NOS inhibition, hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, BAY 41-2272, fibrosis, sGC stimulator.

Introduction

Cardiac hypertrophy is a principal compensatory mechanism for the maintenance of normal contractile function when the heart faces a haemodynamic overload. This can initially be viewed as a salutary response, however, left ventricular hypertrophy and failure constitutes major risks of cardiovascular complications and sudden death among hypertensive subjects (1,2).

Daily administration of NO synthase (NOS) inhibitors such as *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes marked and sustained arterial hypertension (3, 4) accompanied by morphological abnormalities (ventricular hypertrophy and foci of necrosis and fibrosis) in heart (5, 6). Some antihypertensive agents prevent the hypertension induced by NOS inhibitors; however, the morphological abnormalities can either be unaltered (7) or attenuated by these agents.

Nitric oxide, through activation of sGC and cGMP formation, modulates the hypertension in different species and attenuates the hypertrophic response to growth factor stimulation in cardiomyocytes (5, 6). Recently, the compound BAY 41-2272 was identified as a potent, NO-independent, stimulator of sGC (1). This study was designed to evaluate the protective effects of BAY on arterial hypertension and cardiac abnormalities (increase of heart weight index, left ventricular weight index, cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis) induced by chronic L-NAME treatment in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male rats (Wistar-Uni SPF; 130-200 g) provided by the Central Animal House (CEMIB-UNICAMP) were used. The animals were maintained in individual cage under SPF, light and temperature-controlled conditions (12h day/ 12h night, 25°C) and were fed with a standard chow (Nuvilab CR-1[®], Nuvital Nutrientes, Curitiba, Brazil). The experiments were carried out in accordance with the guidelines of State University of Campinas (UNICAMP).

Experimental design

The animals were anaesthetised, surgically manipulated and equipped with radiotelemetry device into the descending aorta. Body weight gain was evaluated weekly and data acquisition was performed during 90 seconds twice a week for eight consecutively weeks (Data Science Inc., St. Paul, MN, USA). The animals were initially divided into four experimental groups, as follows:

1. Control (n=10), rats that received tap water alone;
2. L-NAME (n=20), rats that received L-NAME alone (20 mg/rat per day);
3. L-NAME + BAY 41-2272 (n=15), rats that received concomitantly L-NAME (20 mg/rat per day) in drinking water and BAY (10 mg/kg per day) dissolved in DMSO 80% by diary oral gavage;
4. BAY 41-2272 (n=15), rats that received BAY alone (10 mg/kg per day) dissolved in DMSO 80% by diary oral gavage;

L-NAME (purchased from Sigma Co., St Louis, USA) was dissolved in the drinking water. The volume of water drunk by each rat was approximately 50 ml/rat per day. BAY 41-2272 (kindly provided by Bayer AG, Germany) was dissolved in DMSO 80%

(1mL was administrated for each animal diary). L-NAME and Control animals also received DMSO 80% by diary oral gavage.

Cardiac Weight Index

At the end of study, the animals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (Hypnol; 50mg/Kg, i.p.). The heart was dissected out, washed with saline (0,9%) and fixed in 10% formalin for 24 h. Rats that died before the end of the study were not used for cardiac weight index determination and stereological procedures. Heart weight was obtained by removing of both atria. The left ventricular weight was determined excising the right ventricle and weighing the remaining tissue. Heart weight and left ventricular weight indexes were calculated by dividing heart weight and left ventricular weight by body weight obtained at the last week of treatment.

Histology and stereological procedures

A 4-mm-thick, cross-sectional, midventricular slice was embedded in paraffin, and 5 mm sections were stained with either hematoxylin-eosin or Masson's trichrome. The sections were divided in 4 low-magnification fields (x40), and a set of photographs of these fields was obtained. Two perpendicular lines crossing at the center of the LV cavity were drawn for each section. Microphotographs of optical fields were obtained along these lines, and digitized for subsequent analysis (Olympus DP10 camera and Micro Image, Olympus Optical, Japan).

Volume density (V_v) was the stereological parameter used to determine the cardiomyocyte hypertrophy, and was calculated using the following formula:

$V_v = \text{pCM}/\text{Pt}$; where pCM = points lying in cardiomyocyte and Pt = total test-points.

The myocardial lesions were evaluated quantitatively by using a point counting method that allows the determination of the total area of the foci of repairing fibrosis. In this method, the total area of the lesions was calculated electronically by Zeiss software (AxioVision 3.01, Germany) according the formula:

$TL=PL \times d^2$; where TL: total lesion area (μm^2), PL: number of points lying in the lesions and d: distance between lines of the test system

Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Analysis of variance followed by Bonferroni' s test was applied in order to assess the differences in body weight indexes and mean arterial blood pressure. For stereological procedures, analysis of variance was followed by Tukey' s test. A $p<0.05$ was considered to be significant.

Results

Body weight and Mortality

After eight weeks of treatment, a slight, but significant ($p<0.05$), reduction in body weight was observed in L-NAME and BAY groups compared with control rats (Table 1). No significant reduction in body weight was observed in L-NAME + BAY group. In the L-NAME group, eight out of twenty (40%) died before the end of the treatment, and co-treatment of L-NAME with BAY reduced by 50% this mortality (three out of fifteen rats). All the animals from the remaining groups survived.

Mean Arterial Blood Pressure (MABP) and Heart Rate (HR)

Figure 1 shows that eight weeks of treatment with L-NAME (20 mg/rat/per day) caused a significant and time-dependent increase in MABP when compared to untreated rats, where the maximal response was observed at the last week of treatment (178 ± 8.4 and 109 ± 5.0 mmHg for L-NAME and control, respectively; $p<0.01$). Co-treatment with BAY (10 mg/kg/per day) abolished the L-NAME-induced hypertension throughout the experimental protocol (112 ± 5.1 mmHg at the eighth week; $p<0.01$). Animals receiving BAY treatment alone presented a slight, but significant ($p<0.05$), decrease of MABP in all studied time compared with untreated rats (92 ± 2.1 mmHg at the eighth week).

In addition to hypertension, L-NAME treatment caused a slight bradycardia ($p<0.05$) that was prevented in rats receiving concomitantly BAY (Table 1). BAY alone caused a significant tachycardia when compared with the control group.

Heart Weight Index (HWI) and Left Ventricular Weight Index (LVWI)

After eight weeks of treatment, significant increases ($p<0.05$) in HWI and LVWI were observed in the L-NAME-treated animals compared with control group (Table 1). Concomitant treatment with BAY markedly attenuated the increase in HWI and LVWI caused by L-NAME. Treatment with BAY alone did not significantly affect HWI and LVWI compared to control group (Table 1).

Stereological analysis: Cardiomyocyte size (Vv) and Area of Fibrosis

L-NAME treatment induced an increase on the cardiomyocyte hypertrophy, which was significantly reduced by BAY co-treatment (Figure 2A). Animals treated with BAY had no change in Vv parameter compared to control animals.

The qualitative analysis showed that left myocardium in Control and BAY groups was normal and no injuries were observed (Figure 3, panels A and D, respectively). In contrast, in L-NAME group, the majority (87%) of the animals presented several areas of repairing fibrosis (Figure 2B), consisting of remote myocardial infarctions completely healed where the necrotic cardiac fibres were replaced by dense collagenous scar. In this group, animals also exhibited small areas of granulation tissue compatible with more recent myocardial microinfarctions. In these healing areas there were a rich vascular network, fibroblasts and little collagenization. In animals receiving concomitantly BAY treatment, these lesion areas were absents or markedly smaller and less extended than L-NAME group (Figure 3, panel B). The quantitative analysis demonstrated that co-treatment with BAY significantly prevented the increased area of fibrous tissue (Figure 2B).

DISCUSSION

The present study clearly demonstrated that eight-week-treatment with L-NAME caused marked increases in mean arterial blood pressure followed by increase HWI and LVWI indexes; left ventricle photomicrography also demonstrated an extensive area of repairing fibrosis. However, co-treatment with a specific activator of sGC (BAY 41-2272) markedly reduced the arterial hypertension, as well as, preventing cardiac and cardiomyocytes hypertrophy consequently reducing fibrosis area.

Congestive heart failure is a leading cause of cardiovascular mortality around the world, this syndrome is characterised by liquid retention and often left ventricular hypertrophy with inefficient systolic contractility (1). Hypertrophy can be viewed as an initial salutary compensatory response. However, an increase in left ventricular mass secondary to essential hypertension is frequently observed in experimental animals and patients. This has been associated with a high incidence of ventricular arrhythmia, reduced ventricular compliance, impaired coronary blood supply and diastolic function, and incremental risk of cardiovascular morbidity and mortality (26). In the experimental model of chronic NO inhibition, animals with arterial hypertension also exhibit coronary vasoconstriction, reduction of coronary blood flow, ventricular hypertrophy, increase in cardiomyocyte size and this can lead to cardiomyocyte death, necrosis and subsequent formation of repairing fibrosis (27), as in part, confirmed in the present study.

A morphological study indicated an increase in myocardial mass in the left ventricle, which is primarily related to an increase in myocyte size (38). However, a structural remodeling of the myocardial collagen matrix may also be involved, depending on the nature of hypertrophic stimulus. For example, in man, as well as in several experimental and genetic models of arterial hypertension (39), an interstitial and perivascular myocardial fibrosis has been observed. On the other hand, myocardial fibrosis was not seen in the hypertrophy associated with athletic training or that accompanying anemia (40), chronic overload volume (41, 42, 43), or hyperthyroidism (44). The findings suggest that the growth of cellular constituents of the various myocardial tissue compartments, namely cardiac myocytes and fibroblasts, which are responsible for myocardial collagen metabolism, may each have different regulatory mechanisms.

Differences in fibroblast growth and their synthesis of collagen, relative to myocyte hypertrophy, may lead to intercompartmental imbalance and thereby pathologic hypertrophy. (45)

Antihypertensive agents such minoxidil (46), α -methyldopa (47), hydrochlorothiazide (48, 49) and hydralazine (32) largely attenuate L-NAME-induced hypertension, but fail to show any significant effect on regression of myocardial fibrosis. In contrast, our present study showed independently of NOS inhibition, treatment of BAY prevented left ventricle hypertrophy and in most case abolished or markedly attenuated the lesion areas by the long-term L-NAME treatment.

The stimulation of sGC in a NO-independent manner by BAY would compensate for the systemic deficiency of NO and would explain the prevention of the mortality seen in the L-NAME-treated animals. Accordingly, ours results suggest that administration of sGC stimulator, such as BAY 41-2272, could be a new class of antihypertensive drug that may reduce the risk of vascular mortality in patients with acute myocardial infarction.

In summary, our present study performed in a rat model of chronic NO deficiency, demonstrated that vascular and myocardial structural changes are not attributable to arterial hypertension or to the inhibition of NO synthesis but to sGC activation.

Acknowledgements

Renato Faro thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410(6825):212-5.
2. Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Dücke B, Feurer A, Furstner C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(6):781-4
3. Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis - A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
4. Erley CM, Rebmann S, Strobel U, et al. Effects of antihypertensive therapy on blood pressure and renal function in rats with hypertension due to chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Exp Nephrol* 1995;3:293-9.
5. Navarro-Cid J, Maeso R, Rodrigo E, et al. Renal and vascular consequences of the chronic oxide synthase inhibition. Effects of antihypertensive drugs. *Am J Hypertens* 1996;9:1077-83.
6. K-Laflamme A, Foucart S, Moreau P, Lambert C, Cardinal R, de Champlain J. Sympathetic functions in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 1998;16:63-76.
7. Moreno-Jr H, Nathan LP, Costa SKP, et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischaemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol* 1995;287:93-6.
8. Akuzawa N, Nakamura T, Kurashina T, et al. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. *Am J Hypertens* 1998;11:697-707.

9. Luvara G, Pueyo ME, Phillippe M, et al. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotension II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1408-16.
10. Verhagen AM, Hohbach J, Joles JA, et al. Unchanged cardiac angiotensin II levels accompany losartan-sensitive cardiac injury due to nitric oxide synthase inhibition. *Eur J Pharmacol* 2000;400:239-47.
11. Oliveira CF, Nathan LP, Metze K, et al. Effect of Ca^{2+} channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999;373:195-200.
12. van den Meiracker AH, Veld AJ, Boomsma F, Fischberg DJ, Molinoff PB, Schalekamp MADH. Hemodynamic and β -adrenoceptor adaptations during long-term β -adrenoceptor blockade. Studies with acebutolol, atenolol, pindolol and propranolol in hypertensive patients. *Circulation* 1989;80:903-14.
13. Kahönen M, Arvola P, Mäkynen H, Pörsti I. Antihypertensive therapy and arterial function in experimental hypertension. *Gen Pharmacol* 1996;27:221-8.
14. Weibel ER. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. Vol 1. Academic Press, London. 415pp.
15. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.
16. Mostaghim R, Maddox YT, Ramwell PW. Endothelial potentiation of relaxation response to beta adrenoceptor blocking agents. *J Pharmac Exp Ther* 1986;239:797-801.
17. Janczewski P, Boulanger C, Iqbal A, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent effects of carteolol. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;247:590-5.

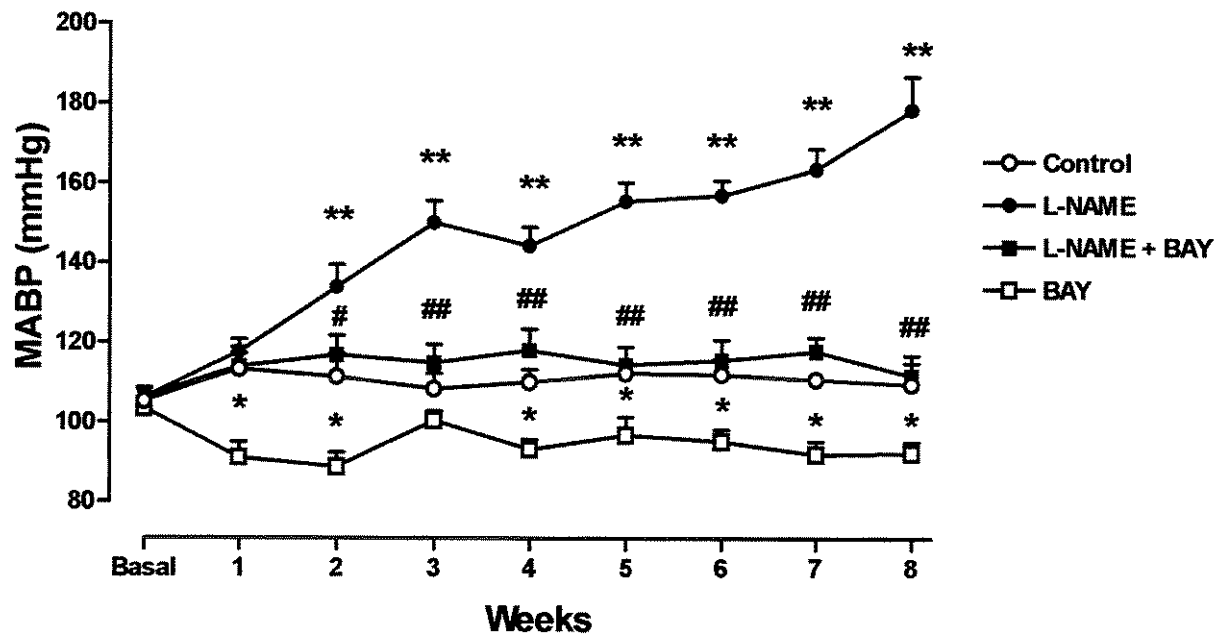
18. Gao Y, Nagao T, Bond R, Janssens WJ, Vanhoutte PM. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:964-9.
19. Broeders MA, Doevendans PA, Bekkers BC et al. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* 2000;102:677-84.
20. Kahönen M, Mäkynen H, Arbola P, Pörsti I. Enhancement of arterial relaxation by long-term atenolol treatment in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1994;112:925-33.
21. Kurosaki K, Ikeda U, Maeda Y, Shimada K. Carvedilol stimulates nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:333-9.
22. Mehta JL. Emerging options in the management of myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1994;73:18A-27A
23. Arumanayagam M, Chan S, Tong S, Sanderson JE. Antioxidant properties of carvedilol and metoprolol in heart failure: a double-blind randomized controlled trial. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;37:48-54.
24. Faria MS, Muscara MN, Moreno-Jr H, Teixeira SA, Dias HB, Oliveira B, Graeff FG, De Nucci G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1997;323:37-43.
25. Hirawa N, Uehura Y, Numabe A, et al. Stimulating effects of atenolol on vasodepressor prostaglandin generation in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1991;81:499-507.
26. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991;114:345-52.

27. Moreno-Jr H, Metze K, Bento AC, Antunes E, Zatz R, De Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol* 1996;91:248-55.
28. Numagachi K, Egashira K, Takemoto M, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension* 1995;26:957-62.
29. Devlin AM, Brosnan MJ, Graham D, et al. Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. *Am. J. Physiol.* 1998;274:H52-H59.
30. Gomes-Pessanha M, Mandarim de Lacerda CA, Dumas Hahn M. Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of the nitric oxide synthesis. *Pathobiology* 1999;67:26-33.
31. Dominiczak AF, Devlin AM, Brosnan MJ, et al. Left ventricular hypertrophy and arterial blood pressure in experimental models of hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997;432:23-33.
32. Takemoto M, Egashira K, Usui M, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J. Clin. Invest.* 1997;99:278-287.
33. Cruickshank J, Lewis J, Moore V, Dodd C. Reversibility of left ventricular hypertrophy by different types of antihypertensive therapy. *J. Hum. Hypertens.* 1992;6:85-90.
34. Schmieder R, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: A meta-analysis of randomised double-blind studies. *JAMA* 1996;275:1507-13.

35. Hoglund C, Cifkova R, Minran A, et al. A comparison of the effects of mibefranil and atenolol on regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Cardiology* 1998;89:263-70.
36. Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, et al. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol* 1992;456:681-7.
37. Yusuf S, Pedro R, Lewis J, Collins R, Sleight P. Beta blockade during and after myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 1985;27:335-71.
38. Pacca SR, de Azevedo AP, de Oliveira CF, De Luca IM, et. al., Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39(2):201-7.
39. Swynghedauw B, Chevalier B, Medigue C, Maisonblanche P, Besse S. Molecular basis of the regression of cardiac hypertrophy. *J Card Fail.* 1996; 2 (4 Suppl):S21-7.
40. Kooman JP, Leunissen KM. Cardiovascular aspects in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993; 2(5):791-7.
41. London GM. Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17 Suppl 1:29-36.
42. Swynghedauw B, Chevalier B, Medigue C, Maisonblanche P, Besse S. Molecular basis of the regression of cardiac hypertrophy. *J Card Fail.* 1996; 2(4 Suppl):S21-7.
43. Guerin AP, Adda H, London GM, Marchais SJ. Cardiovascular disease in renal failure. *Minerva Urol Nefrol.* 2004; 56(3):279-88.
44. Rodriguez-Gomez I, Sainz J, Wangenstein R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, Vargas F. Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension.* 2003; 42 (2):220-5.

45. Kiefer FN, Neysari S, Humar R, Li W, Munk VC, Battegay EJ. Hypertension and angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(21):1733-44.
46. Pees C, Unger T, Gohlke P. Effect of angiotensin AT2 receptor stimulation on vascular cyclic GMP production in normotensive Wistar Kyoto rats. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35(6):963-72.
47. Podjarny E, Benchetrit S, Katz B, Green J, Bernheim J. Effect of methyldopa on renal function in rats with L-NAME-induced hypertension in pregnancy. *Nephron.* 2001; 88(4):354-9.
48. Ono Y, Ono H, Frohlich ED. Hydrochlorothiazide exacerbates nitric oxide-blockade nephrosclerosis with glomerular hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1996; 14(7):823-8.
49. van der Linde NA, van den Meiracker AH, Boomsma F. Role of angiotensin II in L-NAME-induced systemic and renal hemodynamic effects in hydrochlorothiazide-pretreated hypertensive subjects. *J Hypertens.* 2003; 21(2):345-51.

Figure 1 – Effect of BAY on N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-induced hypertension in rats. Mean Arterial Blood Pressure (MABP; mmHg) was measured by radiotelemetry device twice a week in Control (○; n=8), L-NAME (●; n=12), L-NAME + BAY (■; n=12) and BAY (□; n=12) groups. Results are expressed as mean ± SEM. **p*<0.05 and ** *p*<0.01 compared to Control group, ^{##}*p*<0.01 compared to L-NAME group.



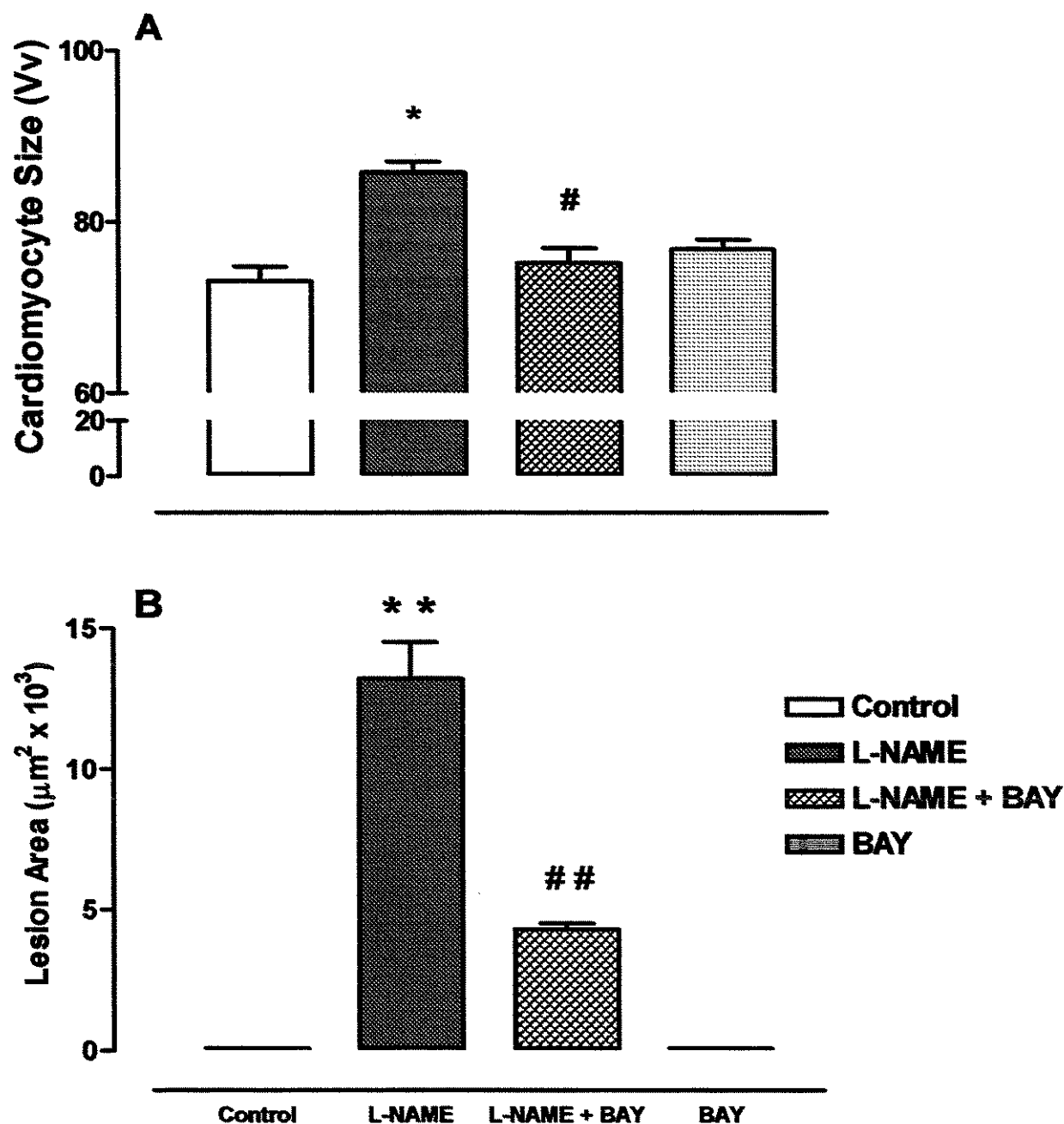


Figure 2 - Cardiomyocyte size (Vv, panel A) and Area of Fibrosis (panel B) in control rats ($\square$), treated chronically with L-NAME ($\blacksquare$; 20 mg/rat/ per day for 8 weeks) in association to BAY ($\boxtimes$; 10 mg/kg per day) or treated with BAY alone ($\boxminus$). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to Control group, # p <0.05 and ## p <0.01 compared to L-NAME group.

Figure 3 – The panels A, B, C e D show an animal left ventricle photomicrography from each studied group (Control, L-NAME, L-ANME + BAY and BAY, respectively). Animals subjected to L-NAME treatment presented an area of repairing fibrosis (*).

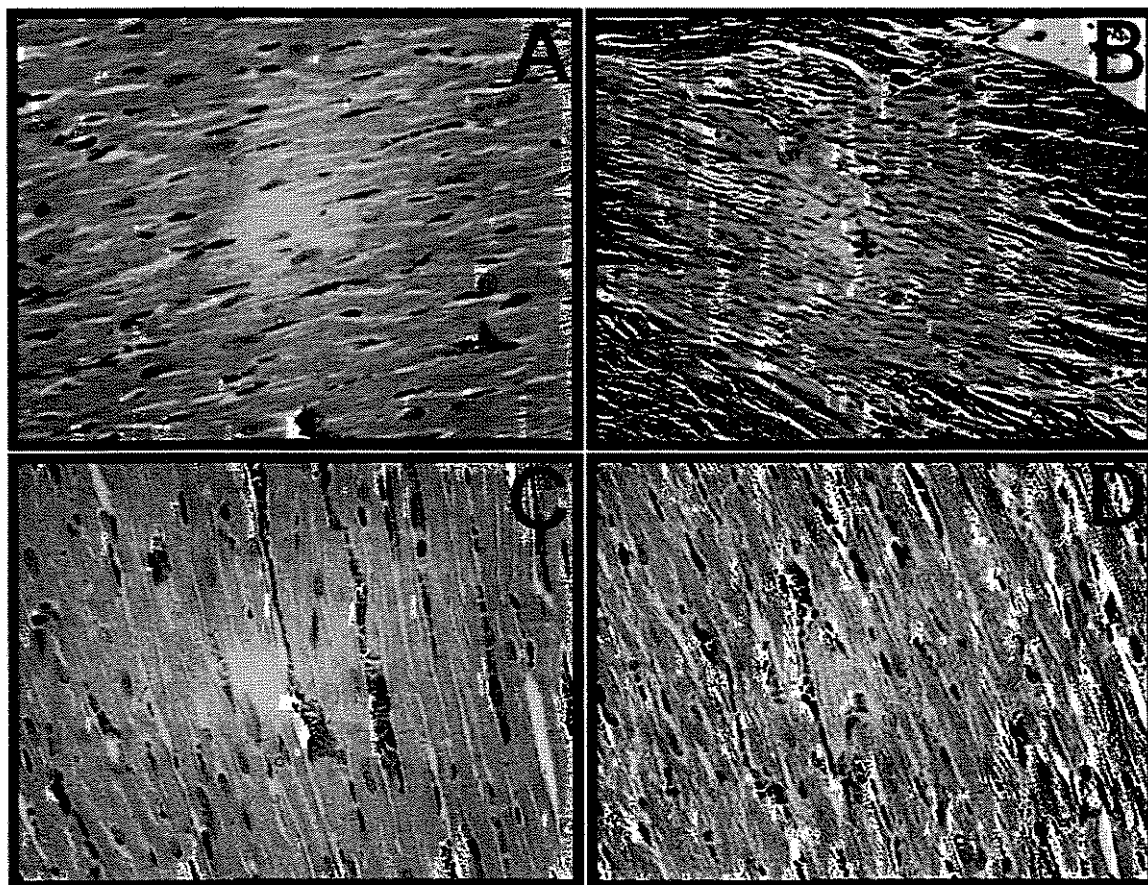


Table 1 – Heart rate, body weight, Heart Weight (HWI) and Left Ventricle (LVWI) Indexes in animals treated for eight weeks with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 20 mg/rat per day) in association to BAY (10 mg/kg per day). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. * p <0.05 compared to Control group, [#] p <0.05 compared to L-NAME group.

	Control	L-NAME	L-NAME+BAY	BAY
Body Weight (g)	339 $\pm$ 14	301 $\pm$ 9*	324 $\pm$ 15	296 $\pm$ 16*
Heart Rate (bmp)	377 $\pm$ 12	342 $\pm$ 8*	401 $\pm$ 5 [#]	431 $\pm$ 25*
Heart Weight				
Index (HWI ; mg/g)	2.39 $\pm$ 0.18	2.81 $\pm$ 0.13*	2.46 $\pm$ 0.21 [#]	2.48 $\pm$ 0.26
Left Ventricle Weight Index				
(LVWI ; mg/g)	1.12 $\pm$ 0.15	2.08 $\pm$ 0.19*	1.22 $\pm$ 0.59 [#]	1.23 $\pm$ 0.48