

LUCIANA PIOVESAN NATHAN

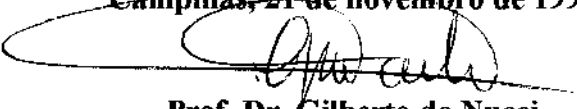
**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES E
DA ENDOTELINA NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
PELO BLOQUEIO CRÔNICO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
curso de Pós- Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de mestre em Ciências, na
área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Ca Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da
Bióloga Luciana Piovesan Nathan.

Campinas, 21 de novembro de 1997


Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CM-00107387-5

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



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

2. Prof. Dr. Dalton Valentim Vassalo

3. Profa. Dra. Dorothy Nigro

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

Data: 21/11/97

Sumário

O óxido nítrico, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por meio da enzima óxido nítrico sintase, é um importante fator de controle do tônus vascular. A inibição de sua síntese, por meio de compostos análogos à L-arginina, tais como N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), constitui um modelo de hipertensão arterial acompanhada de isquemia miocárdica.

Neste trabalho, investigou-se, em ratos, o efeito do diltiazem (bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependentes) e do A-127722.5 (antagonista seletivo dos receptores ET_A da endotelina) nas alterações cardiovasculares induzidas pela administração crônica (8 semanas) de L-NAME.

Para cada estudo, 8 grupos experimentais foram utilizados: 1- Controle (animais que receberam água de torneira); 2- L-NAME (20 mg/rato/dia); 3- L-NAME (20 mg/rato/dia) + droga de estudo (13.5 mg/rato/dia e 1.5 mg/rato/dia para diltiazem e A-127722.5, respectivamente) e 4- droga de estudo (13.5 mg/rato/dia e 1.5 mg/rato/dia para diltiazem e A-127722.5, respectivamente). O L-NAME, o diltiazem e o A-127722.5 foram dissolvidos em água de torneira diariamente. A pressão arterial de cauda e o peso corpóreo foram avaliados semanalmente. Ao final do estudo, os animais foram sacrificados e os corações removidos para avaliação dos pesos cardíacos e posterior análise histológica quantitativa.

A administração do diltiazem reduziu, significativamente, a hipertensão induzida por L-NAME, sem, no entanto, modificar as alterações miocárdicas (lesões isquêmicas, fibrose intersticial e fibrose perivascular) associadas a este modelo experimental.

O antagonista da endotelina, A-127722.5, reduziu significativamente a hipertensão arterial causada pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico, mas também não preveniu o desenvolvimento das lesões isquêmicas.

Em conjunto, estes resultados indicam que o A-127722.5, foi mais efetivo que o diltiazem, no tratamento da hipertensão decorrente de disfunção endotelial, indicando uma participação importante da endotelina neste modelo experimental. Por outro lado, verificou-se que nenhum dos compostos utilizados foi eficaz em prevenir ou atenuar o desenvolvimento das lesões isquêmicas induzidas pelo bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico, indicando que o efeito independe dos níveis pressóricos elevados. Considerando-se que os inibidores da síntese de óxido nítrico induzem vasoconstrição coronariana, pode-se assim supor que o efeito isquêmico decorra simplesmente da falta deste fator de relaxamento no leito coronariano do rato, com consequente redução da perfusão miocárdica e isquemia, a qual evolui para necrose e fibrose.

“Olha cada caminho com cuidado e atenção.

Tente-o tantas vezes quantas julgar necessárias. Então faça a si mesmo uma pergunta: possui este caminho um coração?

Em caso afirmativo, o caminho é bom. Caso contrário, esse caminho não possui importância alguma.”

Ensinamentos de Don Juan

Carlos Castañeda

Agradeço aos meus pais, Paulo e Yara, pela minha vida; pela paciência, carinho e apoio sempre presentes; pela minha formação tanto profissional quanto pessoal e, principalmente, pelo amor que jamais, e em momento algum, deixaram de me dar.

Amo vocês!!!!

Agradeço ao meu irmão Paulo, a minha cunhada Zonic e a minha sobrinha Tatiana que, mesmo tão longe, sempre estiveram torcendo e me apoiando nesta caminhada.

Agradeço às minhas tias Carmem, “in memoriam”, e Ana e a meus primos, André e Andréa, que, mesmo com pouco contato, sempre estiveram comigo.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, Doutor Gilberto de Nucci, pela paciência, oportunidade e confiança em meu trabalho e por meu crescimento não só científico, mas também pessoal.

“Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo” (Galileu).

Ao Doutor Edson Antunes, pela assessoria na parte científica e também pela sua amizade.

À Doutora Aldete Zappellini, pelo profissionalismo, dedicação, paciência, preocupação e amizade revelados durante o desenvolvimento desta tese.

“Cada pessoa é uma mina, escondendo preciosidades muito além de sua própria percepção” (Pedro Marodin).

Ao Doutor Heitor Moreno Júnior, por ter me incentivado e auxiliado no início de minha carreira científica.

Aos Professores Doutores, Konradin Metze, do departamento de anatomia patológica da Faculdade de Ciências Médicas, e Yara de Lucca, do departamento de histologia e embriologia do Instituto de Biologia, ambos da UNICAMP, pelo grande trabalho realizado nas avaliações histológicas desta tese.

Ao Doutor Roberto Zatz, por enriquecer, ainda mais, este trabalho.

Aos amigos, que não só me auxiliaram no desenvolvimento desta tese como também sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me dando forças para

continuar nesta caminhada: Antônio Carlos Bento, Cláudia F. de Oliveira e Soraia K. P. Costa.

Aos amigos, que fiz neste laboratório: Ana Sílvia Miguel, Cléber E. Teixeira, Dora M. G. Kassisse, Edmar T. Costa, Elen C. Landucci, Flávio R. A. Faro, Heloísa H. A. Ferreira, Jadson O. da Silva, Marcelo N. Muscará, Maura A. da Silva, Marli M. Perozin, Moacir S. Faria, Mônica, Pamela L. M. Gonzales, Renata Zanardo, Rodrigo A. B. L. Martins, Rogério C. Castro, Ronilson A. Moreno, Sisi Marcondes, Sócrates C. Penna, Wellington Ribeiro, dedico esta mensagem:

“Qualquer um pode simpatizar com as penas de um amigo.

Simpatizar com seus êxitos requer uma natureza delicadíssima”(Oscar Wilde).

Valeu a força!!!!

Aos colegas que me acompanharam e participaram tanto de minhas alegrias quanto tristezas: Alice Bricola, Ana Maria Trindade Grégio, Angelina Zanesco, Anicleto Poli, Antônio Condino Neto, Greice , Heidi B. Dias, Herick J. Stella, José L. Donato, José Eduardo Tanus dos Santos, Leonardo A. Moraes, Luciana Bizeto, Maria Lúcia Martins, Marta V. Medeiros, Marta Pitalli, Maurício H. Gomes, Micheli, Renata Pereira, Renato R. A. Faro, Simone Teixeira, Sônia R. Riado, Suzana R. P. Mariani, Vladimir M. Gordo.

À Maria das Dores Ponciano e Paulo Sérgio de Oliveira, pela sua inestimável e imprescindível colaboração para a realização deste trabalho.

Às secretárias do departamento, pela atenção, dedicação e carinho com que sempre me trataram: Gislaine E. Alípio, Maria Rita de Lima, Solange A. S. Basso.

Aos técnicos, pelo importante apoio e ajuda na realização desta tese: Adilson J. Thomás, Aguinaldo F. Azevedo, Airton F. de Paula, Antônio Tadeu dos Santos,

Evandro L. Miranda, Gildo B. Leite, Gisele Clotilde Ferreira, Guaracy S. Ribeiro, Ismael Venâncio, Luzia Aparecida M. R. Reis, Miguel B. da Silva, Vita M. A. Moraes.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia, da UNICAMP, pela amizade e companherismo: Albetiza L. Araújo, Gun B. B. Mendes, Marcos D. Fontana, Sthephen Hyslop.

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

ÍNDICE

Sumário	2
1. Introdução	12
1.1. Óxido nítrico	13
1.1.1 Considerações gerais	13
1.1.2 Síntese NO	14
1.1.3. Inibidores da síntese de NO	15
1.2 Endotelina	16
1.3 Cálcio e contração muscular	19
2. Objetivos	24
3. Materiais e métodos	26
3.1 Animais	27
3.2 Grupos experimentais	27
3.2.1 Tratamento com Diltiazem	27
3.2.2 Tratamento com A-127722.5	28
3.3 Avaliação da pressão arterial de cauda e do peso corpóreo	28
3.4 Avaliação dos pesos cardíacos	28
3.5 Análise estereológica	29
3.6 Análise estatística	30
3.7 Procedência dos reagentes	30
4. Resultados	31
4.1 Animais tratados com diltiazem	32
4.1.1 Evolução do peso corpóreo	32
4.1.2 Pressão arterial de cauda	32
4.1.3 Pesos cardíacos	34
4.1.4 Estereologia	34
4.1.5 Mortalidade	34
4.2 Animais tratados com A-127722.5	41
4.2.1 Evolução do peso corpóreo	41
4.2.2 Pressão arterial de cauda	41
4.2.3 Pesos cardíacos	43
4.2.4 Estereologia	44
4.2.5 Mortalidade	44
5. Discussão	51

5.1 Diltiazem	52
5.2 A-127722.5	55
6. Summary	57
7. Bibliografia	59
8. Apêndice	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido nítrico

1.1.1 Considerações gerais

Até o início da década de 80, acreditava-se que o endotélio era responsável por funções meramente físicas, como a de constituir uma barreira seletivamente permeável entre os meios intra e extracelular e a de manter o padrão de fluxo sanguíneo laminar nos vasos. Mais recentemente, a célula endotelial deixou de ser considerada como simples revestimento dos vasos sanguíneos, revelando-se como verdadeiro sensor de alterações físico-químicas do meio circulante e moduladora da reatividade vascular. Em 1976, Moncada et al. demonstraram ser a célula endotelial a principal fonte de prostaciclina, substância com potente ação antiagregante plaquetária e vasodilatadora. Em 1980, Furchgott e Zawadzki relataram que a presença do endotélio era fundamental na modulação da motricidade vascular, ao demonstrarem que a acetilcolina não acarretava relaxamento em preparações vasculares nas quais o endotélio não se encontrava íntegro e que a vasoconstrição podia ser observada com concentrações maiores de acetilcolina. A recuperação da resposta vasodilatadora à acetilcolina era possível quando tais preparações eram colocadas em contato com a camada íntima de uma artéria cujo endotélio encontrava-se preservado. Finalmente observou-se que o relaxamento induzido pela acetilcolina era bloqueado pela atropina, antagonista dos receptores muscarínicos. A partir destas observações, os autores propuseram que a acetilcolina interagindo com receptores muscarínicos, localizados no endotélio, liberava um fator que foi denominado EDRF (endothelium-derived relaxing factor), o qual se difundia para o músculo liso vascular subjacente, promovendo relaxamento deste tecido. Mais tarde, este composto foi identificado química e farmacologicamente como sendo o óxido nítrico (NO) (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). As pesquisas direcionaram-se, então, no sentido de se determinar como o endotélio produzia

este fator e culminaram com a proposição de Palmer et al. (1988) que postularam ser a L-arginina o substrato, para a síntese de NO, em uma reação catalizada pela NO sintase. A estas descobertas, seguiram-se outras, atribuindo-se ao endotélio a responsabilidade pela síntese de substâncias vasoativas, de substâncias moduladoras da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea, de fatores reguladores da trombogênese, da mitogênese e do metabolismo de lipoproteínas (Batlouni & Ramires, 1994).

1.1.2 Síntese de NO

NO é sintetizado a partir de um átomo de nitrogênio do terminal guanidina da L-arginina, a qual é convertida em L-citrulina por ação da NO sintase (NOS) (Palmer et al., 1988) em reação dependente da presença de diversos cofatores (NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopterina, calmodulina e heme) (Bredt & Snyder, 1990; Klatt et al., 1992). O NO produzido age estimulando a guanilatociclase solúvel nas células musculares lisas dos vasos, causando um aumento da concentração intracelular de 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), acarretando a redução do influxo de cálcio, através do sarcolema e da liberação do íon de seus depósitos intracelulares (Batlouni & Ramires, 1994). A conversão de L-arginina em NO pela NOS é específica desde que a D-arginina, enantiômero da L-arginina, não é substrato para esta reação.

Atualmente, três isoformas da NOS são conhecidas: tipo I (neuronal), tipo II (induzível) e tipo III (endotelial). As isoformas I e III são constitutivas, ou seja, estão normalmente presentes e dependem do complexo cálcio/calmodulina para sua ativação. Por outro lado, a isoforma II é induzível por ação de certas citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral e interferon- γ), bem como de lipopolissacarídeo bacteriano. Ao contrário das demais isoformas a ativação desta independe da concentração de cálcio.

1.1.3 Inibidores da síntese de NO

Substâncias análogas à L-arginina, como N^G-amino-arginina (L-NAA) (Gross et al., 1990), N^G - nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Moore et al., 1989) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Mülsch & Busse, 1990), inibem especificamente a síntese de NO. A diversidade de potência desses compostos, tanto *in vitro* como *in vivo*, parece ser devida a diferenças quanto à captação, distribuição e metabolismo dos mesmos (Moncada et al., 1991). Comparados aos demais inibidores, apenas o L-NMMA e o L-NAME são ativos por via oral (Gardiner et al., 1990).

Recentes estudos demonstraram que a administração oral de L-NAME, por 4-8 semanas, em ratos constitui um modelo de hipertensão arterial (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992). Da mesma forma, a administração aguda destes inibidores também promove aumento da resistência vascular sistêmica e conseqüente hipertensão arterial em ratos e cães (Gardiner et al., 1990; Zappellini et al., 1996), ao passo que a hipertensão, decorrente da administração crônica de L-NAME, é sensível aos inibidores da ECA, como o enalapril (Baylis et al., 1992; Moreno Jr et al., 1995) e aos antagonistas de receptores AT₁ da angiotensina II, como o losartan (Ribeiro et al., 1992), compostos estes que agudamente alteram a atividade do sistema renina-angiotensina não interferindo nas alterações cardiovasculares induzidas pelos inibidores de síntese de NO (Nafrialdi & Mimran, 1993; Zappellini et al., 1996). Os mecanismos responsáveis por essa discrepância não são ainda conhecidos, mas sugerem que o sistema renina angiotensina (SRA) participa na gênese da hipertensão induzida pela administração crônica de L-NAME. No entanto, não se observam alterações consistentes quando se avalia a atividade da renina (Dananberg et al., 1993; Deng et al., 1994; Hu et al., 1994; Navano et al., 1994), ou da enzima conversora de angiotensina (Teixeira et al., 1997), o que

demonstra que embora participante, este sistema não deve ser o único na regulação da pressão arterial neste modelo experimental.

Paralelamente aos efeitos pressóricos, observa-se que a administração crônica de L-NAME induz vasoconstrição e hipoperfusão renais (Baylis et al., 1990; Rees et al., 1990; Zatz et al., 1991; Baylis et al., 1992) associadas à queda na filtração glomerular e aumento na fração de filtração (Ribeiro et al., 1992). Do ponto de vista histológico, verifica-se estreitamento difuso nas arteríolas renais com obliteração focal difusa e necrose fibrinóide glomerular segmentar (Ribeiro et al., 1992). Certas alterações encontradas na microvasculatura renal, como a hipertrofia das arteríolas e a obliteração do lúmen das mesmas, são características da hipertensão arterial maligna (Mistry et al., 1990; Laragh & Pickering, 1991). É improvável que o dano renal seja decorrente de toxicidade direta do L-NAME, já que o desenvolvimento de microangiopatia é prevenido pela administração de losartan (Ribeiro et al., 1992). A prevenção das alterações morfológicas e a reversão parcial das alterações funcionais nos rins, pelo losartan, fortalecem a importância do SRA neste modelo de hipertensão arterial.

Finalmente, a nível cardíaco, observa-se que a inibição crônica da síntese de NO, na dose de 20 mg/rato/dia, acarreta fibrose intersticial e necrose subendocárdica (Moreno et al., 1996), e discreta hipertrofia ventricular esquerda. As lesões isquêmicas observadas no coração são alterações similares àsquelas encontradas nos rins neste mesmo modelo experimental (Moreno et al., 1996).

1.2. Endotelina

A primeira evidência de um peptídeo vasoconstritor derivado do endotélio veio com estudos de células endoteliais em cultura, cujo sobrenadante possuía propriedades contráteis em artéria bovina (O'Brien & McMurtry, 1984), artéria coronária de porco (Hickey et al., 1985) e artéria coronária de coelho (Gillespie

et al., 1986). A inibição da ciclooxigenase ou lipoxigenase, bem como o bloqueio de receptores beta adrenérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos ou colinérgicos não alteraram a atividade vasoconstritora do sobrenadante. No entanto, o efeito foi abolido utilizando-se procedimentos que afetavam a estrutura proteica e/ou conformacional, o que indicava que a nova substância apresentava natureza peptídica (Hickey et al., 1985; Gillespie et al., 1986). Em 1988, Yanagisawa et al., descreveram, a partir do sobrenadante de cultura de células endoteliais de porco, um novo fator derivado do endotélio, denominado endotelina-1 (ET-1). Posteriormente, foram ainda identificadas as ET- 2, no genoma de ratos, e ET- 3, exclusiva do genoma humano (Inoue et al., 1989). Saida et al. (1989) descreveram um novo peptídeo, denominado peptídio vasoativo intestinal (VIC), uma vez que o genoma responsável por sua síntese é encontrado exclusivamente no intestino de camundongos. Estes peptídeos apresentam estreita correlação estrutural com peptídeos neurotóxicos (sarafotoxinas) encontrados no veneno de certas serpentes do gênero *Atractaspis*. Estes peptídios contêm 21 aminoácidos com duas pontes de dissulfeto na estrutura. Interessante notar o elevado grau de homologia entre estes peptídeos; com relação à ET-1, ET-2, ET-3, VIC e sarafotoxina S6b que apresentam respectivamente, 2, 6, 3 e 7 resíduos de aminoácidos diferentes.

Para a síntese das endotelinas, sabe-se que a expressão do RNAm da preproendotelina é estimulada por hormônios vasopressores (adrenalina e vasopressina), por substâncias derivadas dos agregados plaquetários (TGF- β), por produtos da coagulação (trombina) e por citocinas (interleucina-1), entre outros (Lüscher et al., 1993). As preproendotelinas, específicas para cada endotelina, são proteínas com aproximadamente 200 aminoácidos, que após clivagem, transformam-se em pré-endotelinas, também conhecidas como "big endotelin". Estes peptídeos são clivados, entre os resíduos triptofano 21 e valina 22, por uma enzima conversora de endotelina, liberando as endotelinas na sua forma madura. A síntese da endotelina não é restrita às células

endoteliais, mas também ocorre em outros tecidos como, por exemplo, células epiteliais da traquéia (Black et al., 1989).

As ETs liberadas interagem com receptores específicos. Atualmente dois tipos de proteínas receptoras são conhecidas: ET_A (Arai et al., 1990) e ET_B (Sakura et al., 1990). Estes receptores apresentam estrutura semelhante à rodopsina, encontram-se acoplados a proteínas G, e estão presentes em sítios vasculares e não vasculares, tais como tecidos cardíaco e renal, glândulas suprarrenais, sistema nervoso central, pulmões, traquéia e trato gastrointestinal. Os receptores do tipo ET_A apresentam maior afinidade pela ET-1 do que pela ET-3, enquanto que os receptores ET_B não apresentam afinidade diferenciada para estes peptídeos (Miller et al., 1993). A dissociação dos peptídeos de seus sítios receptivos é extremamente lenta, o que poderia explicar a natureza prolongada dos efeitos biológicos das ETs (Hirata et al., 1988). A ET circulante é removida essencialmente pelos pulmões (cerca de 2/3 numa única passagem; de Nucci et al., 1988).

Após o acoplamento desses peptídios aos receptores, ocorre estimulação de uma proteína G, responsável pela hidrólise de GTP (Miller et al., 1993). A proteína G determina a ativação de fosfolipase C, iniciando assim a cascata do fosfatidil inositol, resultando na liberação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ atua em receptores específicos promovendo a liberação de cálcio dos estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático). O cálcio, normalmente associado à calmodulina, ativa ou modula processos de secreção e ativação enzimática, como a proteína quinase da cadeia leve da miosina, responsável pelos mecanismos contráteis celulares. As proteínas quinases são também ativadas pelo DAG. Sabe-se que a ativação do receptor ET_A promove a contração muscular e que, o acoplamento ao receptor ET_B promove ativação da fosfolipase A₂ de membrana e da NOS, com conseqüente liberação de prostaciclina e NO. No entanto, mais recentemente, com a descoberta de agonistas e antagonistas seletivos, foi possível verificar que a

ativação de receptores ET_B pode produzir contração também de músculos lisos vasculares (Sumner et al., 1992) e não vasculares como a traquéia (Cardell et al., 1993).

Atualmente, sabe-se que as ETs estão envolvidas em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos. Dentre os efeitos fisiológicos, podemos citar inotropismo e cronotropismo positivos (Ishikawa et al., 1988a,b), aumento da resistência vascular (Goetz et al., 1988), diminuição da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal (Miller et al., 1989), aumento do hematócrito e secreção de fator natriurético atrial (Tsuchiya et al., 1990). Além disso, sabe-se que as ETs alteram a função plaquetária de forma indireta (Thiemmerman et al., 1988; Battistini et al., 1990; Ohlstein et al., 1990). Estudos de agregação plaquetária *ex-vivo* de coelhos demonstraram que a ET-1 promove uma inibição da agregação induzida por ADP e que este efeito inibitório pode ser revertido pelo pré-tratamento dos animais com indometacina, sugerindo a participação de prostaciclina como mediador deste fenômeno (Thiemmerman et al., 1988).

A lista de patologias nas quais os níveis de ET encontram-se alterados inclui as mais variadas desordens, entre as quais podemos citar: diabetes, pré-eclâmpsia (Clark et al., 1992), hipertensão arterial, infarto do miocárdio, vasoespasma coronariano e cerebral, intoxicação induzida por ciclosporina, asma, desordens de comportamento, choque endotóxico, aterosclerose, entre outros (Nayler, 1990). No entanto, desconhece-se, até o momento, se as patologias ocasionam aumento dos níveis circulantes de endotelina, ou vice-versa.

1.3. Cálcio e contração muscular

Células da musculatura lisa vascular expressam canais de cálcio voltagem-dependente (tipo L) que representam uma importante via na transferência do cálcio extracelular para o meio intracelular. Além disso, este

cátion pode ser liberado do retículo sarcoplasmático pelo próprio cálcio ou por IP_3 proveniente da transdução do sinal de agonistas apropriados quando do acoplamento destes a seus receptores (Sato et al., 1988).

O aumento dos níveis intracelulares de cálcio livre culmina com a vasoconstrição por mecanismos bem conhecidos que envolvem a calmodulina com conseqüente deslizamento das fibras de actina sobre as de miosina.

A sinalização intracelular desencadeada por este cátion é determinada por mecanismos, que diminuem a concentração intracelular de cálcio, tais como: bombas de cálcio-ATP dependentes nas membranas plasmática, mitocondrial e do retículo sarcoplasmático, bem como através da troca cálcio/sódio (Figura 1). Neste último sistema, o efluxo de cálcio depende da concentração de intracelular de sódio, a qual é adequadamente mantida através da Na^+/K^+ ATPase (Mc Carron et al., 1994).

Devido à importância dos íons cálcio em diversos processos biológicos, a manutenção de sua homeostase pela célula muscular lisa vascular é de fundamental importância. Em princípio, este controle é exercido pelo potencial de membrana, duração e frequência dos potenciais de ação, estímulo de receptores por agonistas apropriados, níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos e atividade das bombas de cálcio (Fleckenstein, 1996). Além disso, H^+ e Mg^{++} constituem importantes antagonistas fisiológicos do cálcio ao nível da célula muscular lisa vascular (Fleckenstein 1996). Os íons hidrogênio diminuem a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (Nagesetty & Paul, 1994), o influxo de cálcio através dos canais voltagem-dependentes (Klöckner & Isenberg, 1994) e a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático por IP_3 (Bootman et al., 1995). Por outro lado, os íons Mg^{++} reduzem a probabilidade do estado aberto dos canais voltagem-dependentes (Langton & Standen, 1993) além de inibirem a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático impedindo o acoplamento do IP_3 ao seu receptor (Bootman et al., 1995).

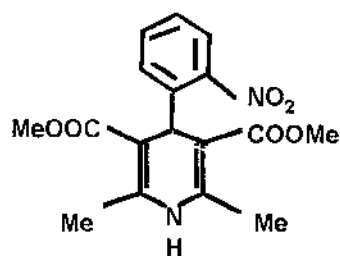
Do ponto de vista terapêutico, os bloqueadores de canais de cálcio dividem-se em três classes principais:

1) 1,4 Dihidropiridinas: Nifedipina

2) Fenilalquilqminas: Verapamil

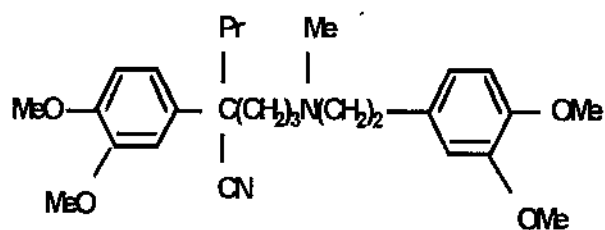
3) Benzodiazepinas: Diltiazem

1,4,5 Dihidropiridina



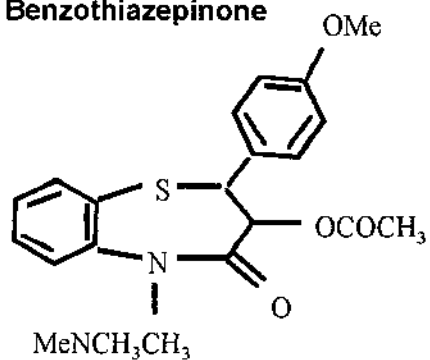
NIFEDIPINE

Phenylalkylamine



VERAPAMIL

Benzothiazepinone



DILTIAZEM

Os canais de cálcio voltagem-dependentes representam proteínas oligoméricas compostas por 5 sub-unidades. A sub-unidade α_1 (212 KDa) é o componente central e funcional do canal e forma um complexo com outras 4 subunidades: subunidade β intracelular (55 KDa), sub-unidade transmembrana glicosilada (30 Kda) e um complexo glicoproteico formado pelas sub-unidades α_2 (143 KDa) e δ (27 KDa) (Catterall & Striessing, 1992; De Waard et al., 1994).

Estudos bioquímicos indicam que as diferentes classes de bloqueadores de canais de cálcio ligam-se a sítios específicos da sub-unidade α_1 (Triggle, 1992; Schwartz, 1994), o que talvez explique a relativa seletividade destes compostos para o miocárdio, para as células do marca-passo e da musculatura lisa vascular. Com relação ao verapamil, sabe-se que este agente exerce efeitos quantitativamente comparáveis nos três diferentes tipos celulares. O diltiazem por sua vez, apresenta efeito vasodilatador mais pronunciado enquanto a nifedipina apresenta maior seletividade vasodilatador com discretos efeitos cardíacos (Flenckenstein, 1996).

Por causarem vasodilatação, através de inibição dose-dependente do influxo de cálcio para a célula muscular lisa vascular, os bloqueadores de canais de cálcio exercem pronunciado efeito antihipertensivo (Flenckenstein & Flenckenstein, 1990).

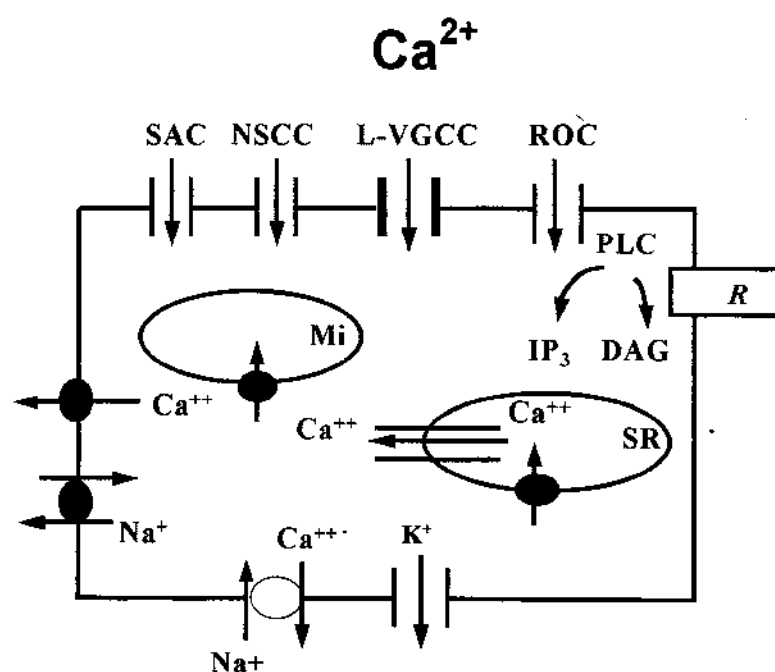


Figura 1. Esquema da homeostase do cálcio na célula da musculatura lisa vascular. SAC: canal ativado por estiramento; NSC: canal de cátion não seletivo; L-VGCC: canal de cálcio voltagem-dependente do tipo L; ROC: canal operado por receptor; Mi: mitocôndria; SR: retículo sarcoplasmático; R: receptor; PLC: fosfolipase C; DG: diacilglicerol; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; círculo em preto: bombas iônicas adenosina trifosfato.

2.OBJETIVOS

Considerando-se que a hipertensão arterial, os efeitos vasoconstritores são dependentes de cálcio, e que no modelo de hipertensão causado pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico é acompanhada por isquemia miocárdica, nosso primeiro objetivo foi avaliar o efeito do diltiazem na hipertensão e nas alterações cardiovasculares induzidas pelo bloqueio crônico da síntese de NO. Em uma segunda etapa, investigamos a participação da endotelina neste modelo experimental, através do composto A-127722.5, antagonista seletivo dos receptores ET_A, biodisponível por via oral.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização destes estudos, foram utilizados ratos machos Wistar fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, com peso inicial entre 150 a 200 g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo 12h claro/ 12h escuro) e alimentados com ração padrão (Nuvilab CR1, Nuvital, Brasil).

3.2. Grupos experimentais

3.2.1 Tratamento com diltiazem

Para este estudo, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- **CONTROLE** (n=15): animais que receberam ração padrão e água fresca;
- **L-NAME** (N^o-nitro-L-arginina-metil éster; n=20): animais que receberam ração padrão e L-NAME (20mg/rato/dia) dissolvido na água de beber.
- **L-NAME + DILTIAZEM** (n=20): animais que receberam ração padrão e L-NAME (20mg/rato/dia) + diltiazem (13.5 mg/rato/dia) dissolvidos na água de beber.
- **DILTIAZEM** (n=19): animais que receberam ração padrão e diltiazem (13.5 mg/rato/dia) dissolvido na água de beber.

Ambas as drogas foram dadas simultaneamente. A fim de se evitar a degradação do diltiazem, composto fotossensível, o composto foi pesado no escuro e os bebedouros foram pintados de preto.

3.2.2 Tratamento com A-127722.5

Para este estudo, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- CONTROLE (n=15): animais que receberam ração padrão e água fresca.
- L-NAME (n=15): animais que receberam ração padrão e L-NAME (20mg/rato/dia) na água ingerida.
- L-NAME + A-127722.5 (n=15): animais que receberam ração padrão e L-NAME (20 mg/rato/dia) + A-127722.5 (1.5 mg/rato/dia) na água ingerida.
- A-127722.5 (n=14): animais que receberam ração padrão e A-127722.5 (1.5 mg/rato/dia) na água ingerida.

Tanto o L-NAME quanto o A-127722.5, foram dadas simultaneamente.

3.3. Avaliação da pressão arterial e do peso corpóreo

A pressão arterial de cauda foi avaliada de acordo com o método descrito por Zatz (1990). Para tanto, os animais foram pré-aquecidos a fim de se promover dilatação da artéria caudal. Em seguida, os animais foram colocados em uma caixa de contenção e um manguito foi posicionado em torno da cauda do animal. Este manguito foi conectado a um microfone (sensor) que por sua vez foi acoplado ao osciloscópio (CS-405, Kenwood, Japão). A medida da pressão arterial foi realizada no mínimo em duplicata para cada animal. Paralelamente, avaliou-se o peso corpóreo dos animais. Estas determinações foram realizadas previamente o estudo e semanalmente, durante 8 semanas.

3.4. Avaliação dos pesos cardíacos

Ao final de 8 semanas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal[®], 30 mg/kg, i.p.) para a retirada dos corações. Estes foram lavados com salina (0.9%, p/v) para remoção de coágulos e imersos em formol-

álcool 10% por 24 h. Em seguida, os corações foram dissecados, os átrios removidos e os ventrículos pesados, obtendo-se desta forma o peso cardíaco total (PCT, mg). Após retirada do ventrículo direito, o tecido remanescente foi pesado e obteve-se o peso ventricular esquerdo (PVE, mg). Estes valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido na última semana e desta forma, foram finalmente expressos como: peso cardíaco relativo ($PCR = PCT/\text{peso corpóreo, mg/g}$) e índice do peso ventricular esquerdo ($IPVE = PVE/\text{peso corpóreo, mg/g}$).

3.5. Análise estereológica

Após a obtenção dos pesos cardíacos, os corações foram colocados em formalina 10% por 24 h e incluídos em parafina. Foram, então, cortados perpendicularmente ao seu maior eixo, em 5 níveis equidistantes, em secções de 5 μm e corados com tricrômico de Masson. A seguir, o grau de fibrose do miocárdio foi avaliado quantitativamente pelo método de volumetria de pontos, utilizando-se um sistema-teste, no caso, uma ocular com retículo de integração de 25 pontos. Em uma lâmina proveniente do coração de cada um dos animais, contou-se o número de vezes em que os pontos caíram sobre as fibras cardíacas, tecido conjuntivo ou vasos, em 40 campos microscópicos. A fim de se obter a fração de volume ocupada por cada um dos componentes cardíacos (Ppi), a seguinte fórmula foi utilizada:

$Ppi = p/P$, onde:

p= soma do número de pontos que caem sobre o tecido em questão;

P= número total de pontos que caem sobre o campo total da lâmina

3.6. Análise estatística

Os resultados são expressos como média e $\pm$ erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi aplicada para avaliar diferenças no peso corporal e na pressão arterial de cauda e ANOVA de uma via foi usada para comparar os pesos cardíacos. Quando os resultados da ANOVA eram significantes, o teste de Bonferroni foi aplicado. Nos estudos estereológicos, ANOVA foi seguida pelo teste de Tukey. Em todos os casos, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

3.7. Procedência dos reagentes

N^o-nitro-L-arginina metil éster foi obtido da Sigma (EUA). Pentobarbital sódico (Sagatal[®]) foi comprado da Rhône Mérieux (França). Diltiazem foi doado pela Boehringer de Angeli (Brasil). A-127722.5 foi doado pela Abbot (USA).

4.RESULTADOS

4.1. Animais tratados com diltiazem

4.1.1 Evolução do peso corpóreo

Não se observou diferença significativa na evolução ponderal dos diferentes grupos experimentais. Os pesos iniciais foram: 157 ± 1.94 , 157 ± 1.22 , 156 ± 1.57 , 158 ± 1.64 , e ao final de 8 semanas os pesos foram: 399 ± 8.2 g, 314 ± 7.8 g, 330 ± 11.4 g e 348 ± 7.6 g respectivamente para os grupos Controle, L-NAME, L-NAME + Diltiazem e Diltiazem (Tabela 1).

4.1.2 Pressão arterial de cauda

A administração crônica de L-NAME induziu um aumento, dependente da dose, da pressão arterial. Após 2 semanas de tratamento, a pressão arterial dos animais tratados com L-NAME foi significativamente maior ($p < 0.01$) que aquela observada nos animais do grupo Controle. Nos animais nos quais o L-NAME foi co-administrado com diltiazem, a pressão arterial também estava elevada ($p < 0.01$ versus controle). Ao final do tratamento, o diltiazem reduziu significativamente a hipertensão induzida por L-NAME ($p < 0.1$). A administração de diltiazem não promoveu alterações significativas na pressão arterial (Figura 2).

	Controle	L-NAME	L-NAME+Dilt	Diltiazem
Basal	157 ± 1.94	157 ± 1.22	156 ± 1.57	158 ± 1.64
Semana 1	247 ± 10.38	234 ± 9.75	226 ± 9.88	234 ± 8.74
Semana 2	269 ± 10.39	253 ± 9.75	244 ± 9.83	252 ± 8.78
Semana 3	289 ± 9.62	269 ± 8.96	260 ± 8.63	269 ± 7.65
Semana 4	309 ± 11.73	285 ± 8.52	285 ± 8.78	286 ± 6.44
Semana 5	324 ± 10.54	302 ± 6.98	315 ± 9.26	306 ± 6.39
Semana 6	335 ± 9.87	311 ± 6.60	326 ± 9.28	316 ± 6.17
Semana 7	342 ± 7.88	319 ± 5.55	329 ± 9.91	328 ± 6.23
Semana 8	349 ± 8.16	314 ± 7.81	330 ± 11.37	348 ± 7.59

Tabela 1- Peso corpóreo dos animais dos grupos Controle, L-NAME, L-NAME + Diltiazem e Diltiazem durante 8 semanas de observação. Os resultados são expressos como média ± S.E.M.

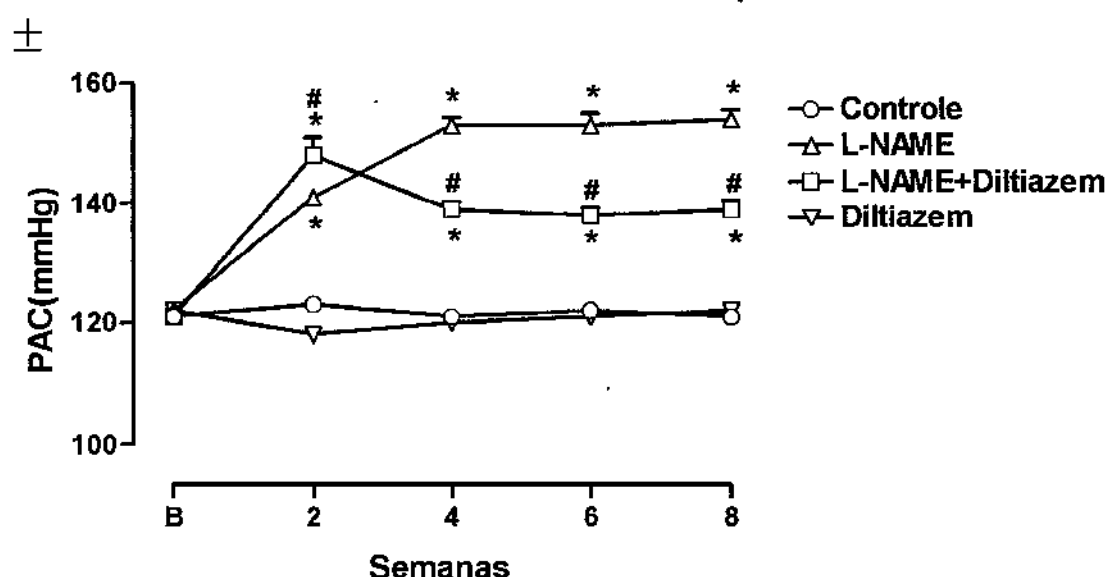


Figura 2- Efeito do diltiazem na hipertensão induzida pelo tratamento crônico de ratos com L-NAME. Os resultados são expressos como média ± S.E.M.

B representa os valores obtidos na semana que antecedeu o início do tratamento.

*p<0.01 L-NAME e L-NAME + Diltiazem versus Controle

$p < 0.01$ L-NAME + Diltiazem versus L-NAME

4.1.3 Pesos cardíacos

Após o tratamento de 8 semanas, os animais dos grupos Controle, L-NAME, L-NAME + Diltiazem e Diltiazem não apresentaram diferença significativa com relação ao PCT, PVE, PCRe, IPVE. (Figuras 3 e 4).

4.1.4 Estereologia

Neste estudo, observou-se maior quantidade de tecido conjuntivo (índice de fibrose) nos corações tratados com L-NAME ($p < 0.05$ versus Controle, figura 5). A administração de diltiazem não reverteu as lesões induzidas pelo L-NAME ($p < 0.05$ versus grupo Controle). Finalmente, não se observaram alterações estruturais nos animais tratados com diltiazem (Figura 5).

4.1.5 Mortalidade

Ao final de 8 semanas de tratamento, a mortalidade observada foi de 20% e 15%, respectivamente para os grupos L-NAME e L-NAME + Diltiazem. Todos os animais dos grupos Controle e Diltiazem sobreviveram ao longo do período experimental.

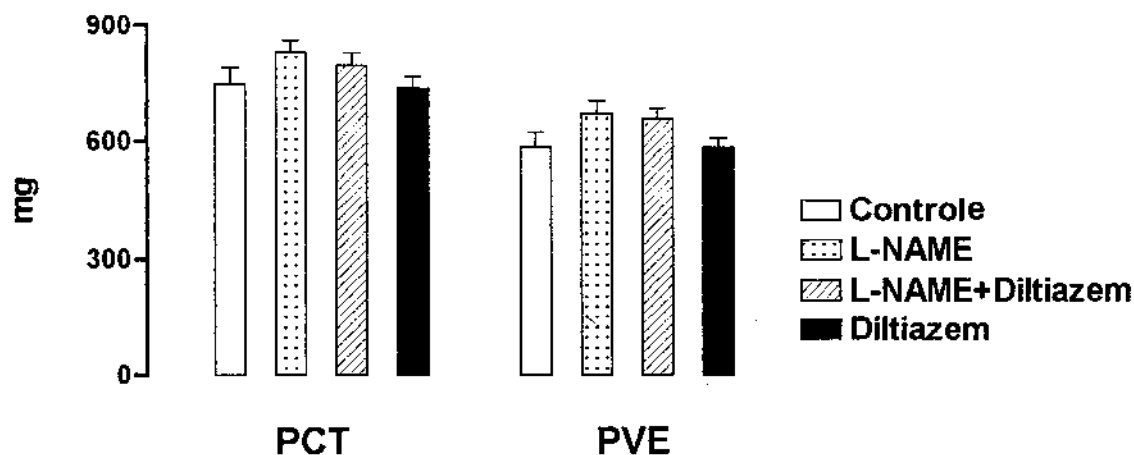


Figura 3- Efeito do tratamento crônico com L-NAME, na ausência ou presença de diltiazem no peso cardíaco (PCT) e no peso ventricular esquerdo (PVE) ao final de 8 semanas. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

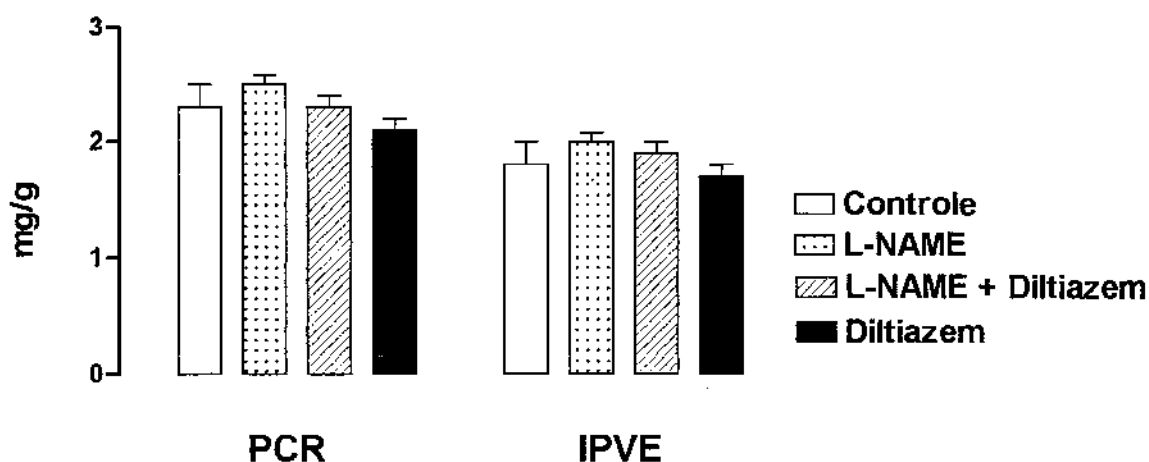


Figura 4- Efeito do tratamento crônico com L-NAME, na ausência ou na presença de diltiazem no peso cardíaco relativo (PCR) e índice do peso ventricular esquerdo (IPVE) ao final de 8 semanas. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

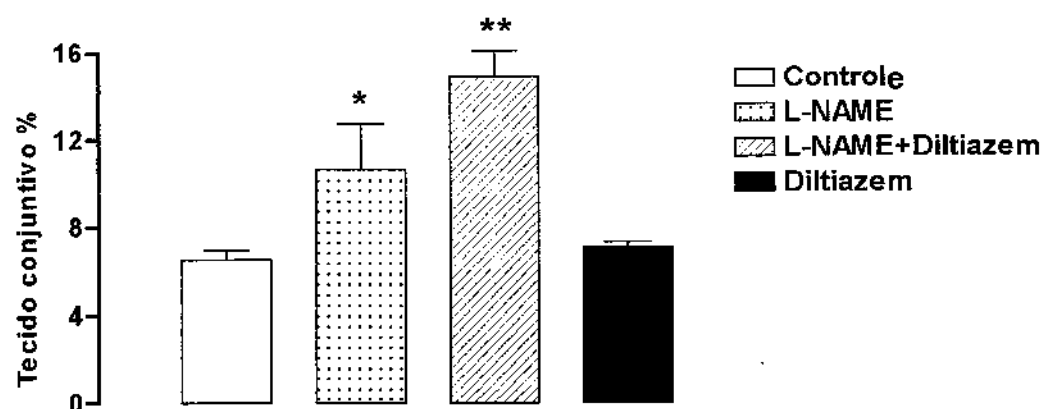


Figura 5- Análise estereológica do ventrículo esquerdo dos animais provenientes dos diferentes grupos experimentais. A figura mostra a porcentagem de fibras cardíacas que foram substituídas por tecido conjuntivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ L-NAME e L-NAME + Diltiazem versus Controle e Diltiazem



Figura 6: Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle. Na fotografia observam-se a luz ventricular (L) e fibras cardíacas (Fc) preservadas da parede ventricular esquerda.

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 65x

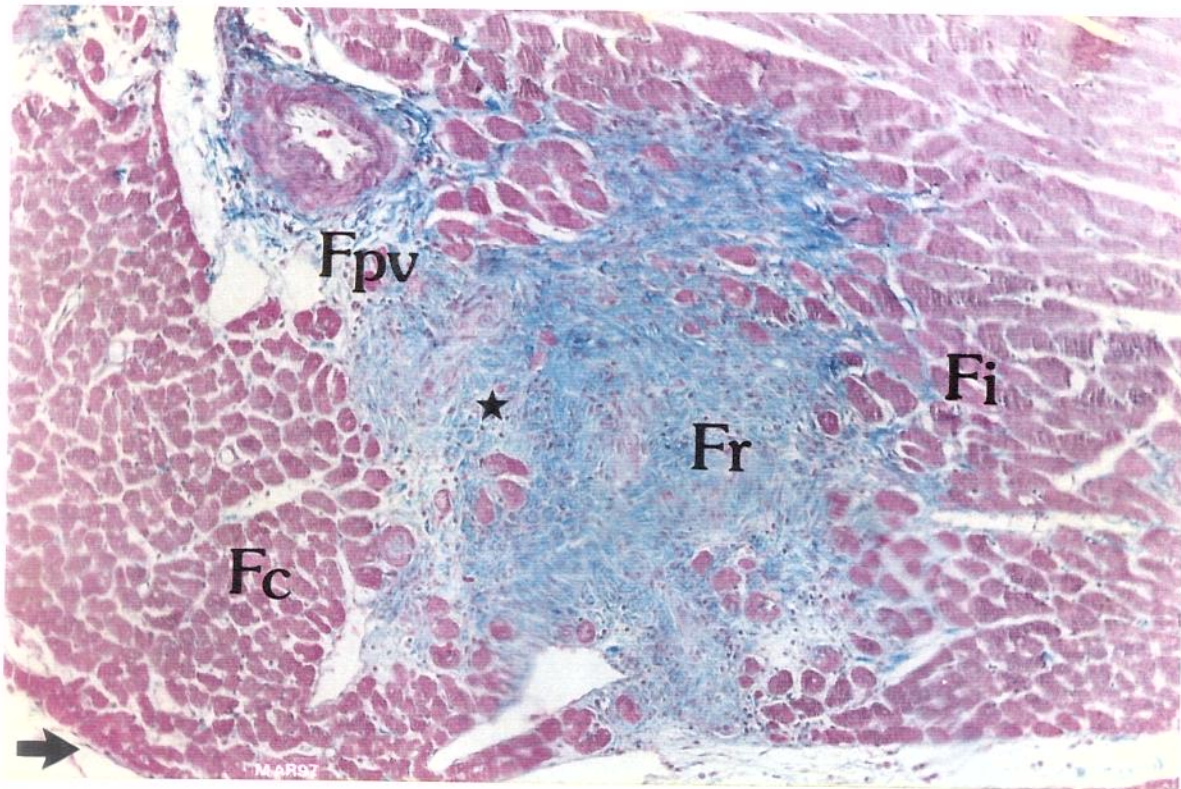


Figura 7: Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME. Na fotografia podem-se extensas área de fibrose reparadora (Fr), fibrose intersticial (Fi), fibrose perivascular (Fpv) além de fibras cardíacas (Fc). Notam-se também o epicárdio (seta) e discreto infiltrado linfocitário (★).

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 130x

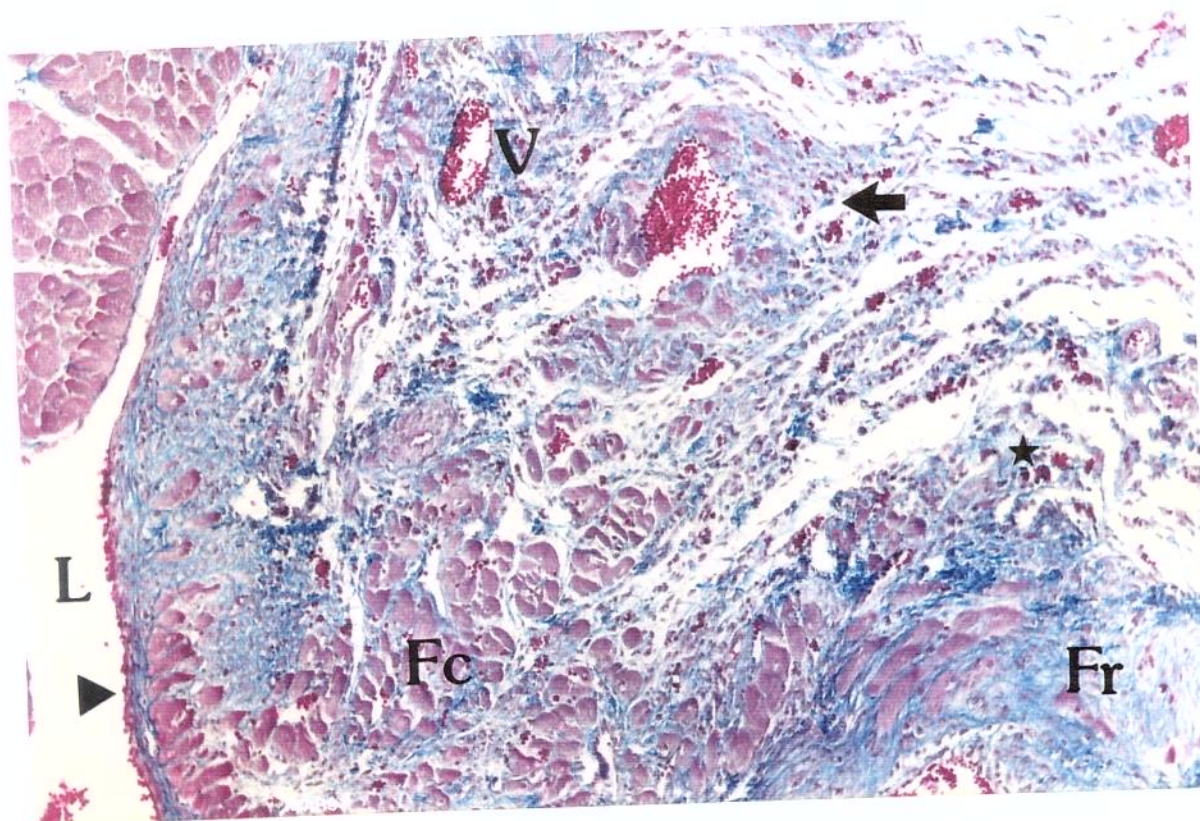


Figura 8: Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME+Diltiazem. Observam-se áreas de fibrose reparadora (Fr), vênulas dilatadas (V), intensa neovascularização (seta) e discreto infiltrado linfocitário (★). Notam-se ainda a luz ventricular (L), o endocárdio (cabeça de seta) e as fibras cardíacas (Fc) preservadas em pequeno número.

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 130x

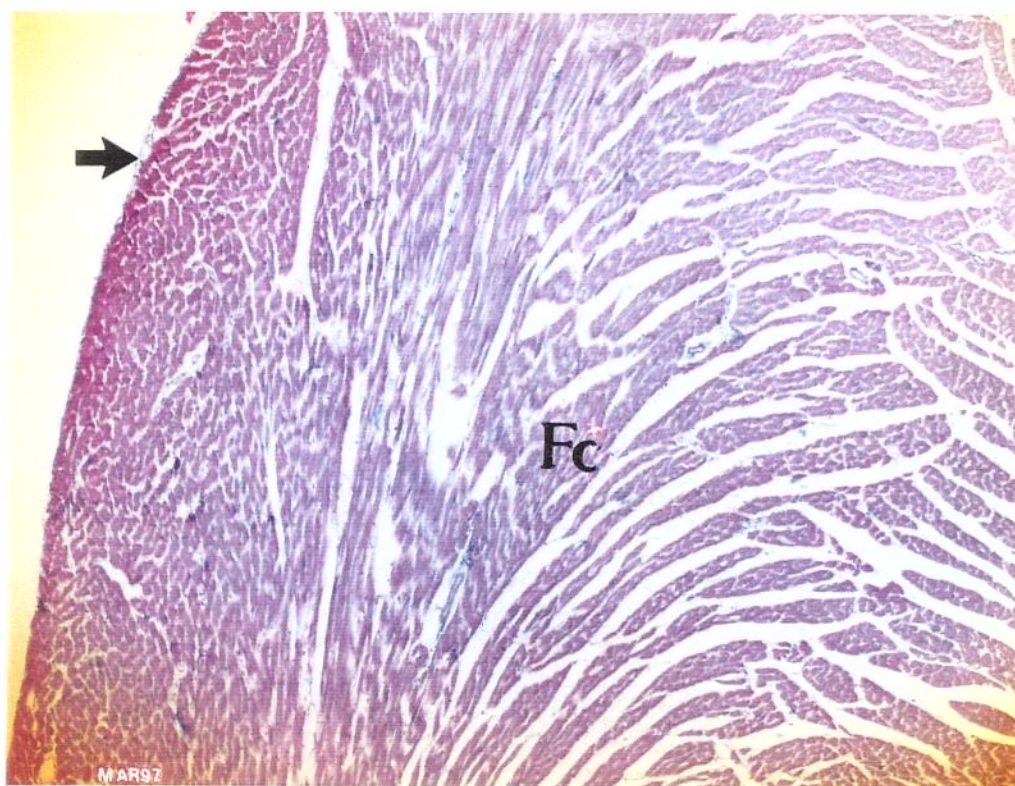


Figura 9: Corte histológico de um coração representativo do grupo Diltiazem. Observam-se o epicárdio (seta) e as fibras cardíacas (Fc) sem alterações morfológicas.

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 65x.

4.2. Animais tratados com antagonista de endotelina (A-127722.5)

4.2.1 Evolução do peso corpóreo

A partir da segunda semana, os animais do grupo L-NAME apresentaram um menor ganho ponderal em relação ao grupo Controle, sendo esta diferença não observada na última semana de tratamento. Os animais do grupo L-NAME + A-127722.5 também apresentaram um menor ganho ponderal em relação aos animais do grupo Controle a partir da terceira semana de tratamento. Ao final do tratamento, não se observaram diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais (Tabela 2).

4.2.2 Pressão arterial de cauda

Tanto os animais do grupo L-NAME quanto os do grupo L-NAME + A-127722.5 apresentaram aumento significativo da pressão arterial após uma semana de tratamento ($p < 0.01$) versus grupo Controle. A partir da segunda semana, o antagonista de endotelina, A-127722.5, atenuou significativamente o desenvolvimento da hipertensão arterial induzida por L-NAME. Ao final do tratamento, os animais do grupo L-NAME + A-127722.5 apresentaram valores pressóricos significativamente menores em relação aos animais do grupo L-NAME ($p < 0.01$). Finalmente, os animais dos grupos Controle e A-127722.5 não apresentaram variações significativas da pressão arterial durante o período de tratamento (Figura 10).

	Controle	L-NAME	L-NAME+A-12	A-12
Basal	155±1.1	155±0.9	155±1.2	156±1.2
Semana 1	238±3.3	237±6.9	232±1.9	237±3.1
Semana 2	259±3.4	246±2.4**	249±1.9	255±3
Semana 3	279±3.6	262±2.2**	265±2.9**	271±3.1
Semana 4	300±3.4	284±2.3**	289±2.9*	289±2.9
Semana 5	316±3.1	302±1.1**	303±1.5*	306±2.6*
Semana 6	331±2.5	315±1.5**	319±1.2**	322±2.5*
Semana 7	344±2.3	335±1.7*	335±1.7*	336±2.1
Semana 8	347±6.4	328±7.6	349±6.3	351±7.8

Tabela 2- Evolução ponderal nos animais dos grupos: Controle (n=15); L-NAME (n=14); L-NAME + A-127722.5 (n=14) e A-127722.5 (n=14) durante as 8 semanas de tratamento. Os pesos corpóreos (g) são expressos como média ± S.E.M.

*p<0.05 e ** p<0.01 L-NAME, L-NAME + A-127722.5 e A-127722.5 versus Controle

Basal: valores obtidos na semana que antecedeu o início do experimento.

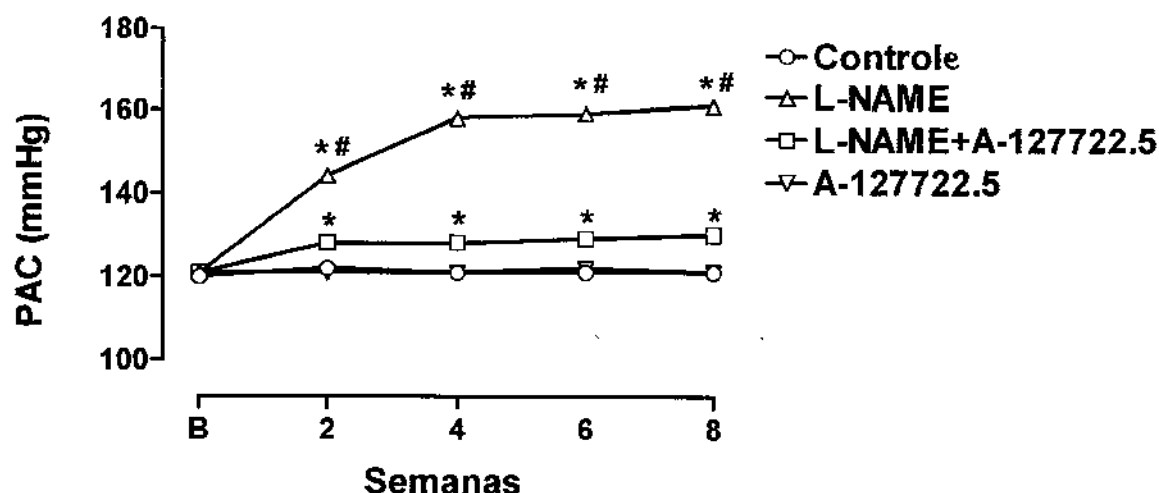


Figura 10- Efeito do A-127722.5 na hipertensão induzida pela inibição crônica da síntese de NO. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

B representa os valores obtidos na semana que antecedeu o início do tratamento.

* $p < 0.01$ L-NAME e L-NAME + A-127722.5 versus Controle

$p < 0.01$ L-NAME versus L-NAME + A-127722.5

4.2.3 Pesos cardíacos

Após 8 semanas de tratamento, tanto os animais do grupo L-NAME + A-127722.5 quanto aqueles do grupo A-127722.5 apresentaram um aumento significativo do PCT e PVE quando comparado aos valores observados no grupo Controle ($p < 0.01$, Figura 11). Não se observou diferença significativa quando os animais do grupo L-NAME foram comparados àqueles do grupo Controle. Quando os pesos cardíacos foram corrigidos pelo peso corpóreo, os animais do grupo L-NAME apresentaram aumento significativo do IPVE em relação ao grupo Controle ($p < 0.05$). O mesmo ocorreu com os animais do grupo A-127722.5 onde os valores de PCR foram significativamente maiores que aqueles observados no grupo Controle ($p < 0.05$, Figura 12).

4.2.4 Estereologia

Neste estudo, observou-se maior quantidade de tecido conjuntivo (índice de fibrose) nos corações tratados com L-NAME ($p < 0.05$ versus Controle, figura 13). A administração do antagonista de endotelina não reverteu as lesões induzidas pelo L-NAME ($p < 0.001$ versus grupo Controle). Finalmente, não se observaram alterações estruturais nos animais tratados com o antagonista de endotelina (Figura 13).

4.2.5 Mortalidade

Nos animais dos grupos L-NAME e L-NAME + A-127722.5, a taxa de mortalidade foi de 7%. Todos os animais dos grupos A-127722.5 e Controle sobreviveram ao longo do período observado (8 semanas).

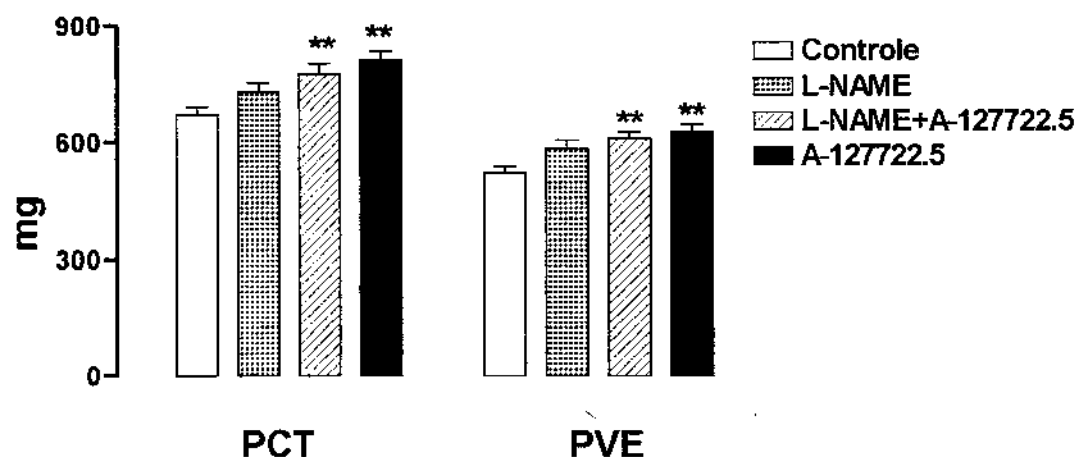


Figura 11- Efeito do tratamento crônico com L-NAME, na ausência ou presença de A-127722.5, no peso cardíaco (PCT) e no peso ventricular esquerdo (PVE) ao final de 8 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

** $p < 0.01$ L-NAME + A-127722.5 e A-127722.5 versus Controle

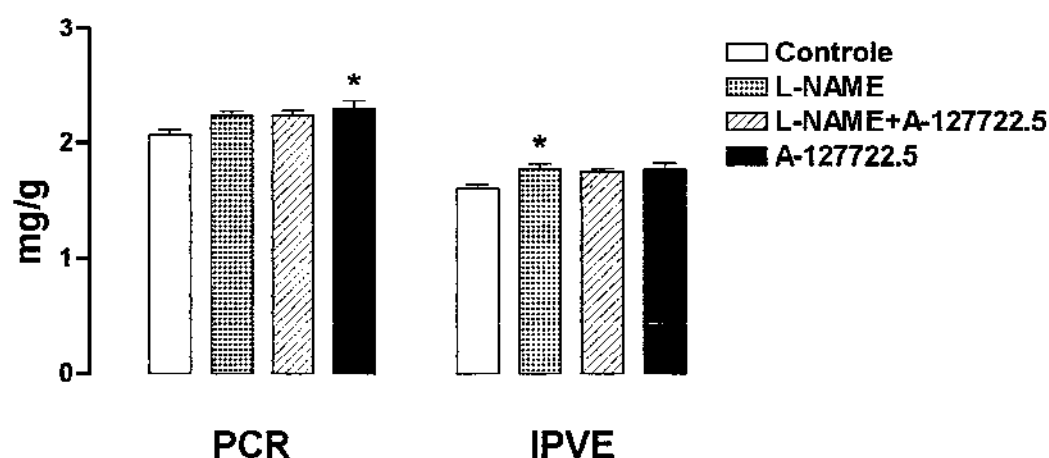


Figura 12- Efeito do tratamento crônico com L-NAME, na ausência ou presença de A-127722.5, no peso cardíaco relativo (PCR) e no índice do peso ventricular esquerdo (IPVE) ao final de 8 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

* $p < 0.05$ A-127722.5 e L-NAME versus Controle

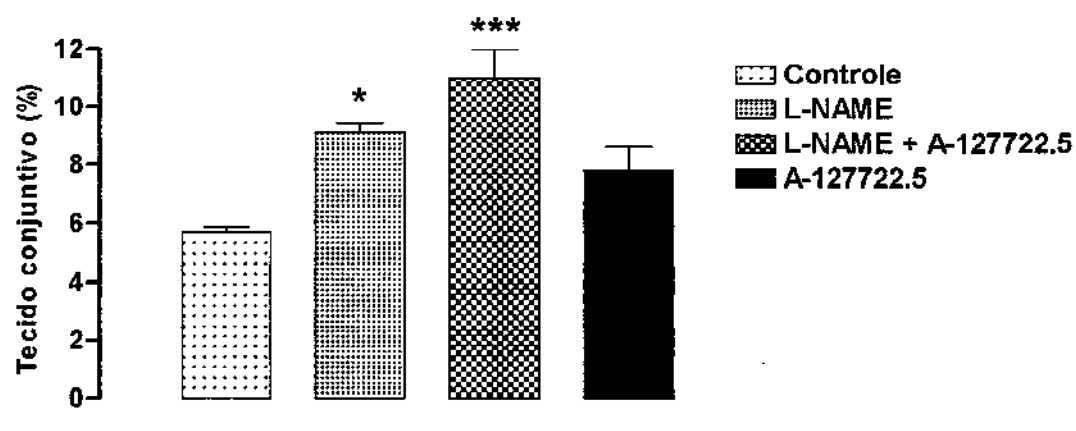


Figura 13- Análise estereológica do ventrículo esquerdo dos animais provenientes dos diferentes grupos experimentais. A figura mostra a porcentagem de fibras cardíacas que foram substituídas por tecido conjuntivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ S.E.M.

* $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ versus Controle

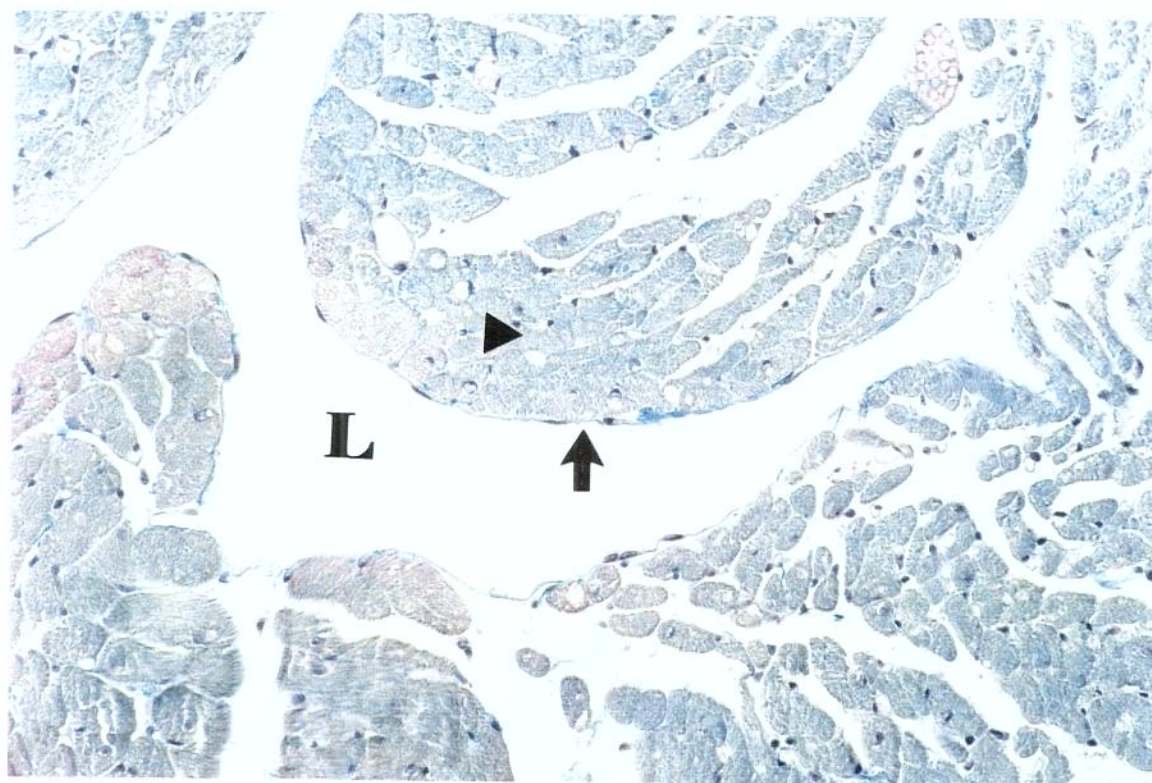


Figura 14- Corte histológico de um coração representativo do grupo Controle. Observa-se luz ventricular (L), o endocárdio (seta) e fibras musculares cardíacas cortadas transversalmente (cabeça de seta).
Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 512x

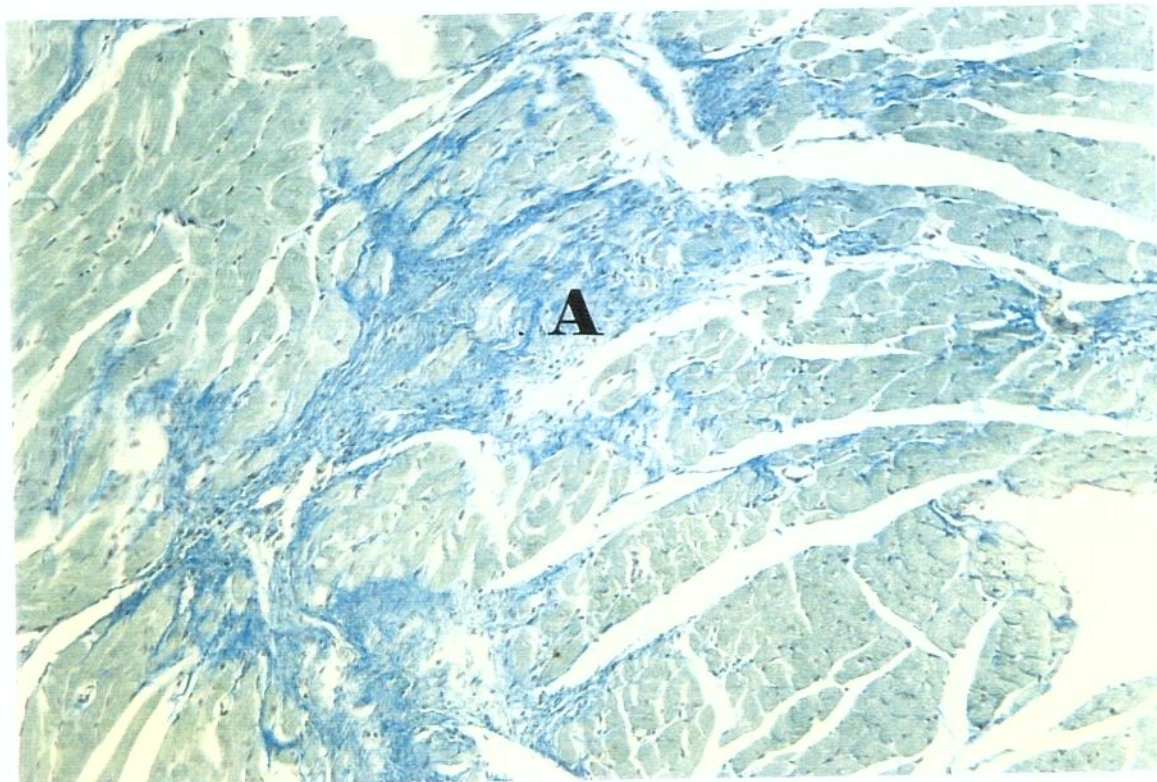


Figura 15- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME. Observa-se áreas de fibrose (A) decorrentes da substituição de miocardiócitos destruídos.

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 256x

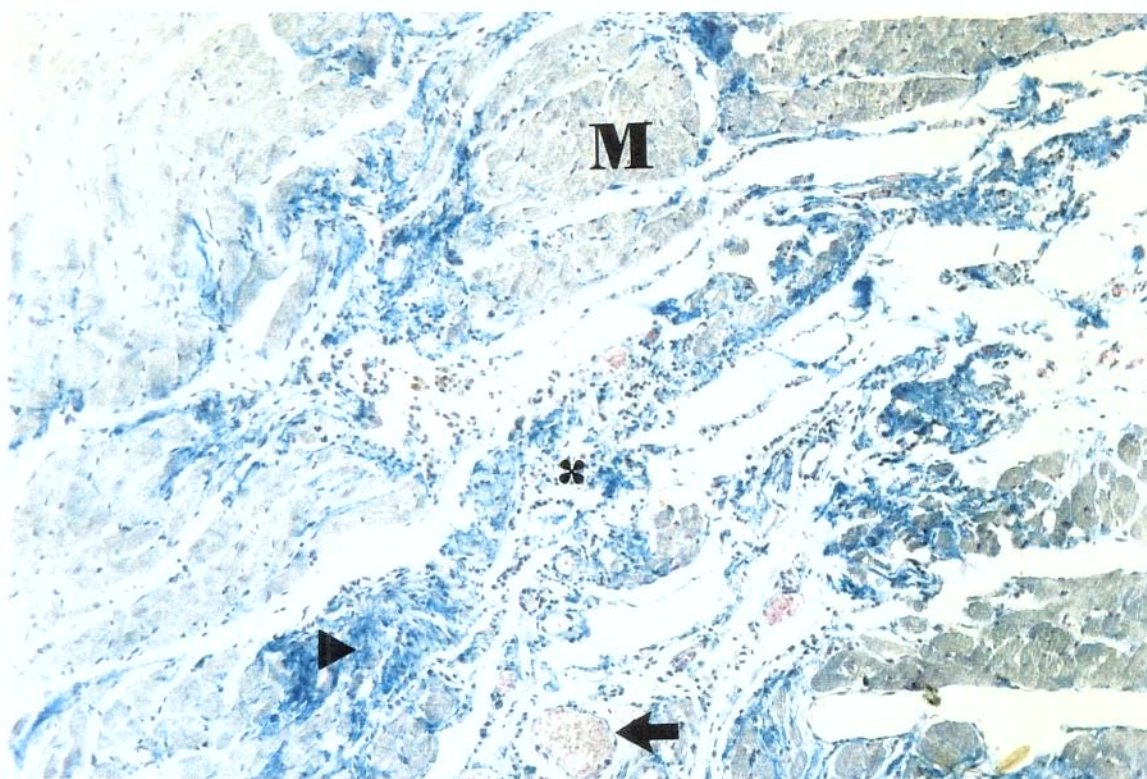


Figura 16- Corte histológico de um coração representativo do grupo L-NAME + A-127722.5. Observa-se uma grande área de tecido de reparação (tecido fibrótico) apresentando ainda focos de miocardiócitos necróticos (cabeça de seta), focos de fibras colágenas com maior número de células mononucleares (*). Nota-se ainda, vasos dilatados cuja luz encontra-se preenchida por hemácia (seta). O tecido de reparação é mais jovem comparado com o grupo L-NAME. Nota-se áreas de moicardiócitos íntegros (m).

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 256x

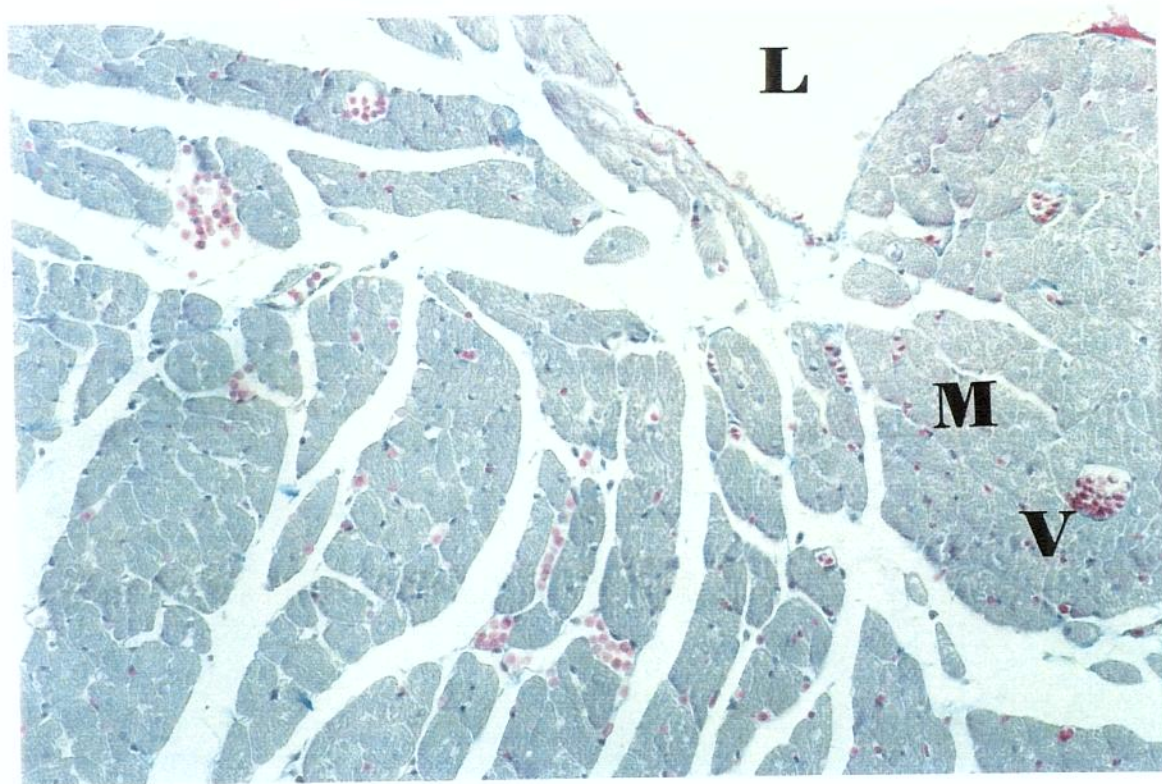


Figura 17- Corte histológico de um coração representativo do grupo A-217722.5. Observa-se a luz ventricular (L), os miocardiócitos sem alterações (m), cortados transversalmente e obliquamente, e vasos dilatados (V).

Coloração: Tricrômico de Masson, aumento 512x

5.DISSCUSSÃO

5.1. Diltiazem

Esses resultados demonstraram que a hipertensão induzida pelo bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico foi atenuado, mas não houve prevenção pelo diltiazem. Resultados similares foram observados com nifedipina (Ribeiro et al., 1995) e verapamil (Takase et al., 1996) que reduziu, mas não normalizou a hipertensão induzida por L-NAME. Interessante notar que em outros modelos de hipertensão, tanto em ratos espontaneamente hipertensos (Obata et al., 1990) quanto em ratos renovascular hipertensos (Baxter, 1992), a administração crônica de diltiazem não reduziu significativamente a pressão arterial.

A razão pela qual o diltiazem não preveniu o aumento arterial não está clara. Estudos anteriores mostraram que a hipertensão induzida por L-NAME pode ser prevenida por inibição do sistema renina-angiotensina, sugerindo assim uma grande importância do papel da angiotensina II na mediação desse efeito (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992; Moreno Jr. et al., 1997). A angiotensina II age no receptor do subtipo AT1 para ativar a fosfolipase C com formação subsequente de inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O inositol trifosfato mobiliza cálcio dos estoques intracelulares e acarreta, posteriormente, fosforilação e consequente abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente. Deste modo, nas condições em que os vasoconstritores são marcadamente ativados, como na hipertensão induzida por L-NAME, os bloqueadores de canais de cálcio não são tão eficazes quanto um antagonista de receptor porque não preveniriam o aumento de cálcio intracelular a partir dos estoques intracelulares. Uma outra possibilidade para explicar a pouca eficácia dos antagonistas de cálcio no controle da hipertensão arterial causada pela inibição crônica de NO pode ser de origem farmacocinética. O diltiazem é um antagonista de cálcio de meia-vida de poucas horas; assim sendo, é possível que seu efeito no controle da pressão arterial não seja constante, visto que apesar de estar sendo administrado na água de beber, é sabido que o rato obedece um ciclo noite-dia, ingerindo alimentos e água principalmente à noite.

água principalmente à noite. Interessante notar que estudos realizados em nosso grupo com outro bloqueador de cálcio de meia-vida curta, nifedipina, apresentou resultados semelhantes ao observado com o diltiazem.

Nós, como outros grupos, também demonstramos anteriormente que o bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico induz a uma hipertrofia ventricular esquerda (Moreno Jr. et al., 1996; Takase et al., 1996; Takemoto, 1997). Neste estudo observamos uma tendência à hipertrofia cardíaca, que não alcançou significância estatística. Esta inconsistência em relação às observações anteriores pode ser devido à baixa sensibilidade da técnica por nós utilizada (pesagem cardíaca). Conforme demonstrado anteriormente, este modelo de hipertensão arterial é acompanhado de necrose/fibrose cardíaca (Moreno-Jr et al., 1996); assim sendo, o índice do peso cardíaco varia de acordo com a presença de fibrose, com aumento da quantidade de colágeno e consequente redução da quantidade de fibra muscular, afetando deste modo a interpretação dos resultados obtidos com índices cardíacos. Atualmente estamos avaliando por morfometria a presença de hipertrofia neste modelo.

A inibição da síntese do óxido nítrico causa vasoconstrição coronariana (Humphires et al., 1991; Huckstorf et al., 1994) e redução do fluxo coronariano (Amrani et al., 1992; Moreno Jr., 1996) levando ao desenvolvimento de isquemia e fibrose nesse modelo de hipertensão arterial. Nossos resultados mostraram que o diltiazem não protegeu o coração contra as lesões isquêmicas induzidas por L-NAME. Interessante notar que, apesar de não ser estatisticamente significativo, o tratamento com diltiazem aumentou a fibrose no miocárdio. O mecanismo envolvido nesse efeito não é conhecido, mas é improvável que reflita a persistência do aumento da pressão arterial, uma vez que o enalapril foi efetivo na prevenção da hipertensão, mas não nos danos miocárdicos associados ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico (Moreno Jr. et al., 1995). Outra possibilidade para explicar esse efeito é a resposta inotrópica negativa dos bloqueadores de canais de cálcio. Em humanos, o diltiazem pode piorar os sintomas pré-existentes na falha congestiva cardíaca (Moss et al.,

1988). Por outro lado, descreve-se um efeito direto do óxido nítrico na contratilidade do miócito (Brady et al., 1993), a habilidade dos inibidores da síntese do óxido nítrico na diminuição do débito cardíaco é bem estabelecida (Gardiner et al., 1990; Zappellini et al., 1997). Portanto é possível que o diltiazem e L-NAME apresentem um efeito cumulativo em relação ao efeito inotrópico negativo, que atingiu muito mais áreas extensas de lesões no miocárdio dos ratos tratados com ambos os componentes.

Além da hipertensão e alterações miocárdicas, o bloqueio crônico da formação de óxido nítrico em ratos induz lesões renais isquêmicas (Ribeiro et al., 1992) que se assemelham com as observadas no coração. Curiosamente, foi demonstrado que a nifedipina previne lesões estruturais nos rins de ratos tratados com L-NAME (Ribeiro et al., 1995), enquanto o diltiazem não protegeu as alterações isquêmicas miocárdicas. Essa aparente discrepância poderia refletir uma seletividade vascular dos bloqueadores de canais de cálcio da nifedipina. Entretanto, - experimentos pilotos conduzidos com nifedipina demonstraram a mesma ausência de efeito protetor sobre as lesões isquêmicas miocárdicas. É possível que uso de bloqueadores de cálcio com meia-vida farmacocinética maior ajude a esclarecer esta aparente dissociação entre a ausência de efeito observado na isquemia miocárdica em ratos e o extenso uso clínico desta classe de fármacos para doença coronariana em humanos.

O bloqueador de cálcio, diltiazem, é utilizado clinicamente no tratamento da hipertensão arterial, da angina de peito (*angor pectoris*) e de arritmias supraventriculares. Este antagonista foi estudado em vários modelos experimentais de isquemia do miocárdio, sendo que a maioria dos estudos apontam para um efeito protetor nestas circunstâncias. O mecanismo proposto para este efeito protetor seria redução da queda da concentração de ATP e do aumento do ácido láctico (Weishaar et al., 1979). O diltiazem melhora a circulação colateral para áreas isquêmicas, aumentando a razão de fluxo endocárdio/epicárdio nas áreas de isquemia (Clozel et al., 1983).

5.2. A-127722.5

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a inibição dos receptores ET_A da endotelina pelo composto A-127722.5 reduziu marcadamente o desenvolvimento de hipertensão arterial induzido pelo bloqueio crônico da síntese de NO. Estes resultados assemelham-se àqueles obtidos quando os animais são tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina, como enalapril ou trandolapril ou com antagonistas dos receptores AT₁ da angiotensina II, como o losartan (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992; Moreno Jr et al., 1995; Takase et al., 1996).

É sabido que a angiotensina II induz a liberação de endotelina (Kanaide, 1996), o que explicaria a semelhança de nossos achados. Desta forma, a inibição da enzima conversora de angiotensina ou dos receptores AT₁ da angiotensina II estaria evitando, em última análise, a liberação de endotelina, a qual seria responsável pela hipertensão decorrente da inibição crônica da síntese de NO por L-NAME. De fato, o pré-tratamento de ratos espontaneamente hipertensos com bosentan, um antagonista não seletivo dos receptores da endotelina, atenuou os efeitos hemodinâmicos induzidos por baixas doses de angiotensina (Balakrishnan et al., 1996). Contrariamente, a administração de bosentan a ratos 2K-1C ou 1K-1C não altera a hipertensão neste modelo experimental (Li et al., 1996).

Se é correta a suposição de que a angiotensina estimula a liberação de endotelina, há de se considerar que a hipertensão arterial associada a este modelo experimental não reflete, necessariamente, a ativação do sistema renina angiotensina. Os efeitos do NO, ou de inibidores de sua síntese, sobre a secreção de renina são contraditórios (Dananberg et al., 1993; Deng et al., 1994; Hu et al., 1994; Navano et al., 1994) e a administração crônica de L-NAME a ratos não altera a atividade da enzima conversora de angiotensina (Teixeira et al., 1997). Considerando-se que os agentes pressóricos, dentre eles a angiotensina II, têm seu efeito vasoconstritor modulado pela liberação de NO,

é plausível supor, que na ausência deste fator, os efeitos da angiotensina II sejam potenciados o que explicaria a eficácia dos inibidores da enzima conversora de angiotensina ou dos antagonistas dos receptores AT_1 deste peptídeo. De fato, a realização de curva dose-resposta à angiotensina II em ratos tratados com L-NAME e enalapril (nos quais tanto a NOS quanto a enzima conversora de angiotensina foram inibidas), ou enalapril (nos quais somente a enzima conversora de angiotensina encontrava-se inibida), mostrou uma responsividade maior dos animais do primeiro grupo a doses baixas de angiotensina II (Teixeira et al., 1997).

Finalmente, cumpre lembrar que o efeito pressórico da endotelina também é modulado pela liberação de NO a partir da interação deste peptídeo com receptores ET_B localizados na célula endotelial. Nos animais tratados com L-NAME, esta modulação estaria prejudicada e agora, a modulação do efeito pressórico da angiotensina, como também da endotelina estariam potencializados no modelo de hipertensão arterial decorrente da inibição crônica da síntese de NO em ratos.

6.Summary

Nitric oxide (NO) synthesised from L-arginine by the enzyme NO synthase (NOS) is responsible for controlling vascular tone. Analogous of L-arginine, such as N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) are competitive inhibitors of NOS and the administration of these compounds *in vivo* provides, a model of arterial hypertension accompanied by myocardial ischaemia.

In this work, we have investigated the effects of diltiazem (an inhibitor of a L-type voltage-gated calcium channel blocker) and A-127722.5 (an ET_A receptor antagonist) on the cardiovascular changes induced by the chronic administration (8 weeks) of L-NAME in rats.

Eight experimental groups were used: (1) Control (rats that received tap water alone), (2) rats that received L-NAME (20 mg/rat/day), (3) rats that received L-NAME + drug of interest (13.5 mg/rat/day and 1.5 mg/rat/day for diltiazem and A-127722.5, respectively) and (4) rats that received the drug of interest alone at the doses indicate in (3). L-NAME, diltiazem and A-127722.5 were dissolved daily in tap water. The tail-cuff pressure and body weight were measured weekly. At the end of the study, the animals were sacrificed and their hearts removed for weighing.

Diltiazem significantly inhibited L-NAME-induced hypertension, without altering the myocardial changes such as the ischemic lesions and interstitial and perivascular fibrosis normally found in this experimental model.

The endothelin receptor antagonist, A-127722.5 significantly inhibited the arterial hypertension caused by the chronic inhibition NO biosynthesis, but there were no beneficial effects on the ischemic myocardial changes involved.

These results indicate that A-127722.5, but not diltiazem, was effective in preventing the hypertension associated with endothelial dysfunction, and suggest that endothelin may play an important role in this experimental model of arterial hypertension. Neither diltiazem nor A-127722.5 prevented the ischemic

lesions associated with this model, thus supporting the idea that myocardial damage does not depend on an increased blood pressure. Considering that inhibitions of NOS induce coronary vasoconstriction and impair myocardial perfusion it is likely that the ischemic lesions and the consequent necrosis and fibrosis reflect the lack of the normally provide vasodilator tone provided by NO.

7. BIBLIOGRAFIA

- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMOI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**: 730-732, 1990.
- ARMANI M.; O'SHEA J.; ALLEN N.J.; HARDING S.E.; JAYAKUMAL J.; PEPPER J.R.; MONCADA S.; YACOUB M.H.. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J. Physiol. (Lond)*, **456**: 681-687, 1992.
- BALAKRISHNAN S.M.; WANG H.D.; GOPALAKRISHNAN V.; WILSON T.W.; MCNEILL J.R. Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension*, **28(5)**: 806-809, 1996
- BATLOUNI M. & RAMIRES J.A.F. Importância do endotélio na doença arterial e na aterogênese. *Arq Bras Cardiol*, **62(4)**: 255-270, 1994
- BATTISTINI B.; FILEP J.G.; HERMÁN; SIROIS P. Endothelin-1 does not affect human platelet aggregation in whole blood and platelet rich plasma. *Thrombosis Research*, **60**: 105-1089, 1990.
- BAXTER G.F. Inhibition by diltiazem of left ventricle collagen proliferation during renovascular hypertension development in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**: 277-278, 1992.
- BAYLIS C.; HARTON P.; ENGELS K. Endothelium-derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat Kidney. *J Am Soc Nephrol*, **1**: 875-881, 1990.

- BAYLIS C.; MITRUKA B.; DENG A. Chronic blockade of nitric oxide in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, **90**: 278-281, 1992.
- BLACK P. N.; GHATEI M.A.; TAKAHASHI K.; BRETHERTON-WATT D.; KRAUSZ T.; DOLLERY C.T.; BLOOM S.R. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS lett.*, **255**: 129-132, 1989.
- BOOTMAN M.D.; MISSIONEN L.; PARYS J.B.; SMEDT H de; CASTEETS R. Control of inositol 1.4.5.-triphosphate-induced Ca^{2+} release by cytosolic Ca^{2+} . *Biochem. J.*, **306**:445-451, 1995.
- BRANDY A.J.B.; WARREN J.B.; POOLE-WILSON P.A.; WILLIAMS T.J.; HARDING S.E. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol.*, **265**: 300-310, 1993.
- BREDT D.S. & SNYDER S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 682-5, 1990.
- BRUCE ET A.L. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapies. *JAMA*, **278(8)**: 620-625., 1995.
- CARDELL L.O.; UDDMAN R.; EDVINSSON L. A novel ETA-receptor antagonist, FR 139317, inhibits endothelin-induced contractions of guinea-pig pulmonary artery, but not trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 448-452, 1993.
- CATTERALL W.A. & STRIESSNING J. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonist. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**:256-262, 1992.

- CLOZEL J. P.; THEROUX P.; BRASSA M. G. Effect of diltiazem on experimental myocardial ischaemia and left ventricular performance. *Circulat. Res.*, **52**: 120-128, 1983
- DANAMBERG J.; SIDER R.S.; GREKIN R.J. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. *Hypertension*, **21**: 359-363, 1993.
- DE NUCCI G.; THOMAS R.; D'ORLEANS-JUSTE P.; ANTUNES E.; WALDER C.; WARNER T. D.; VANE J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**: 9797-9800, 1988.
- DE WAARD M.; PRAGNELL M.; CAMPBELL K.P. Ca^{2+} channel regulation by a conserved β -subunit domain. *Neuron*, **13**:1-9, 1994
- DENG XL; WELCH WJ; WILCOX CS. Renal vasoconstriction during inhibition of NO synthase. Effect of dietary salt. *Kidney Int.*, **46**: 639-646, 1994.
- FACTOR S.M.; BHAN R.; MINASE T.; WOLINSKY H.; SNNENBLICK E. Hypertensive-diabetic cardiopathy in the rat. *Am. J. Pathol.*, **102**: 219, 1981.
- FLECKENSTEIN G. & GRÜN P. Calcium antagonism in vascular smooth muscle cells. *Arch. Eur.J. Physiol.*, **432**: R53-R60, 1996.
- FLECKENSTEIN-GRÜN G. & FLECKENSTEIN A. Scope of vasodilatory effects of calcium antagonist. *Blood Vessels*, **27**:319-332, 1990.
- FURBERG C.D.; PTSATY B.M.; MEYER J.V. Nifedipine. Dose-Related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation* **92(5)**: 1326-1331, 1995.

- FURCHGOTT R.F. & ZAWADSKI J.V. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; **228**: 373-6, 1980.
- GARDINER S.M.; COMPTON A.M.; KEMP P.A.; BENNETT T. Regional and hemodynamic effects of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 625-31, 1990.
- GILLESAPIE M.N.; OWASOYO J.O.; MCMURTRY I.F.; O'BRIEN R.F. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**: 339-343, 1986.
- GOETZ K.L.; WANG B.C.; MADWED J.B.; ZHU J.L.; LEADLEY R.J. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am J. Physiol.*, **255**: R1064-R1068, 1988.
- GROSS S.S.; STUEHR D.J.; AISAKA K.; JAFFE E.A.; LEVI R.; GRIFFIT O.W. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine. *Biochem Biophys Commun*, **170**: 96-103, 1990.
- HICKEY K.A.; RUBANYI G. M.; PAUL R.J.; HIGHSMITH R.F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**: C550-C556, 1985.
- HIRATA Y.; YOSHIMI H.; TAKAICHI S.; YANAGISAWA M.; MASAKI T. Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstriction endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cell. *FEBS lett.*, **239**: 13-17, 1988.

- HIROOTA Y.; IMAIZUMI T.; MASAKI H.; ANDO S.; HARADA S.; MOMOHARA N.; TAKESHITA A. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilatation in hypertensive patients. *Hypertension*, **20**: 175, 1992.
- HU L.; MANNING R.D.J.R.; BRANDS M.W. Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. *Hypertension*, **23**: 185-194, 1994.
- HUCKSTORF C.; ZANZIGER J.; FINK B.; BASSENGE E. Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **349**: 367-373, 1994.
- HUMPHRIES R.G.; CARR R.D.; NICOL A.K.; TOMLISON W.; O'CONNOR S.E. Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N^G-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 565-566, 1991.
- IGNARRO L.; BUGA G.; WOOD K.; BYRNS R.; CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 9265-9269, 1987.
- INOUE A.; YANAGISAWA M.; KIMURA S.; KASUYA Y.; MIYAUCHI T.; GOTO K.; MASAKI T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 2863-2871, 1989.
- ISHIKAWA T.; YANAGISAWA M.; KIMURA S.; GOTO K.; MASAKI T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.*, **255**: H970-H937, 1988a.

- ISHIKAWA T.; YANAGISAWA M.; KIMURA S.; GOTO K; MASAKI T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelin-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Archiv.*, **413**: 108-110, 1988b.
- KANAIDE H. Endothelin regulation of vascular tone. *Gen. Pharmac.*, **27(4)**: 559-563, 1996.
- KLATT P.; SCHMIDT K.; MAYER B. Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *Biochem. J.*, **288**: 15-17, 1992.
- KLÖCKNER U. & ISENBERG G. Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single conductance. *J. Gen. Physiol.* **103**:665-678, 1994.
- LANGTON P.D. & STANDEN N.B. Calcium currents elicited by voltage steps and steady voltages in myocytes isolated from the rat basilar artery. *J. Physiol.*, **469**:535-548, 1993.
- LARAGH J.H. & PICKERING T.G. Essential hypertension, in Brenner BM, Rector FC (eds): *The Kidney. Philadelphia, WB saunders*, 1909-1967, 1991.
- LEENEM F.H.; FOURNEY A.; NOTMAN G.; TANNER J. Persistence of antihypertensive effect after "missed doses" of calcium antagonist with long (amlodipine) vs (diltiazem) elimination half-life. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **41**: 83, 1996.
- LI J.; KNAFO L.; TURGEON A.; GARCIA R.; SCHIFFRIN E.L. Effect of endothelin antagonist on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats 1996.

- McCARRON J.C.; WALSH J.V.Jr.; FAY F.S. Sodium/calcium exchange regulates cytoplasmic calcium in smooth muscle. *Pflügers Arch.*, **426**:199-205, 1994.
- MILLER R. C.; PELTON J. T.; HUGGINS J. P. Endothelins - from receptors to medicine. *TIPS*, **14**: 54-60, 1993.
- MISTRY M.; MUIRHEAD E.E.; YAMAAGUCHI Y.; NASJLETTI A. Renal function in rats with angiotensin-II-salt-induced hypertension: Effect of Tromboxane synthesis inhibition and receptor blockade. *J Hypertens*, **8**: 75-83, 1990.
- MONCADA S.; PALMER R.M.J.; HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*; **43(2)**: 109-141, 1991
- MONCADA S.; GRYGLEWISKI R.; VANE J.R.. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**: 663-5, 1976.
- MOORE P.K.; SWAYEH O.A.; CHONG N.W.S.; EVANS R.; MIRZAZADEH S.; GIBSON A. L-N^G-nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. *Br J Pharmacol*, **176**: 219-223, 1989.
- MORENO JR. H.; METZE K.; ANTUNES E.; ZATZ R.; DE NUCCI G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy. *J Cardiovasc. Pharmacol* 1994;
- MORENO JR. H.; NATHAN L.P.; COSTA S.K.P.; METZE K.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the

chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Eur. J. Pharmacol.*, **287**: 93-6, 1995.

MORENO JR. H.; METZE K.; BENTO A.C.; ANTUNES E.; ZATZ R.; DE NUCCI G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic. Res. Cardiol.*, **91**: 248, 1996

MOSS ET. AL. The effect of diltiazem on mortality and reinfarction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **319 (7)**: 385-392, 1988.

MÜLSCH A. & BUSSE R. N^G-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 Arch Pharmacol*, **341**:143-147, 1990.

NAFRIALDI & MIMRAN. Renin-angiotensin system in the pressor effect of acute N-omega-nitro-L-arginine methyl éster. *J. Hypertension*, **11 (Suppl. 5)**: S324-S325, 1993.

NAGESSETY R. & PAUL R.J. Effects of pH_i on isometric force and (Ca²⁺)_i in porcine coronary artery smooth muscle. *Circ. Res.* **75**:990-998, 1994.

NAVARRO J.; SANCHES A.; SAIZ J.; RUILOPE L.M.; GARCIAESTAN J.; ROMERO J.C.; MONCADA S.; LAHERA V. Hormonal, renal and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am. J. Physiol.*, **36**: R1516-1521, 1994.

NAYLER W.G. Endothelin: isoforms, binding sites and possible implications in pathology. *TIPS*, **11**: 96-99, 1993.

- O'BRIEN R. F. & MCMURTRY I.F. Endothelial cell sapernates contract bovine pulmonary artery rings. *Am. Rev. Respir.*, **129**: A337, 1984.
- OBATA H.; TANAKA H.; HANEDA T. Response of isolatade perfused heart to ischemia after long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with diltiazem. *Jap. Circul. J.* **54**: 89-99, 1990.
- OHLSTEIN E. H.; STORER B.; NAMBI P.; GIVEN M.; LIPPTON H. Endothelin and platelet function. *Thrombosis Research*, **57**: 967-9745, 1990.
- PALMER R.; ASHTON D.S.; MONCADA S. Vascvular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginina. *Nature*, **333**: 664-666, 1988.
- PALMER R.; FERRIGE A.; MONCADA S. Nitric Oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*, **327**: 524-526, 1987.
- REES D.D.; PALMER R.M.J.; SCHUULZ R.; HODSON H.F.; MONCADA S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthetase in vivo. *Br J Pharmacol*, **101**: 146-752, 1990.
- RIBEIRO M.O.; ANTUNES E.; DE NUCCI G.; LOVISOLO S.M.; ZATZ R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, **20**:298-303, 1992.
- RIBEIRO M.O.; ANTUNES E.; MUSCARÁ M.N.; DE NUCCI G.; ZATZ R. Nifedipine prevents renal injury in rats with chronic nitric oxide inhibition. *Hypertension*, **20**: 298, 1995.

- SAIDA K.; MITSUI Y.; ISHIDA N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. *J Biol. Chem.*, **264**: 14613-14616, 1989.
- SAKURA T.; YANAGISAWA M.; TAKUWA Y.; MYAZAKY H.; KIMUR S.; GOTO K.; MASAKI T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**: 732-735, 1990.
- SATO K.; OZAKI H.; KARAKI H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strips measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura 2. *J. Pharmacol Exp Ther.*, **246**:294-300, 1988.
- SCHWARTZ A. Recent new studies on localization of the calcium antagonist binding receptor on the calcium channels. *High Blood Press*, **3**:291-294, 1994.
- SUMMER M.J.; CANNON T.R.; MUNDIN J.W.; WHITE D.G; WATTS I. S. Endothelin ET-a and ET-b receptors mediate vascular smooth muscle contraction, *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 858-860, 1992.
- TAKASE H.; MOREAU P.; KUNG C.F.; NAVA E.; LÜSCHER T.F. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in nitric oxide deficiency. *Hypertension*, **27(1)**: 25-31, 1996.
- TEIXEIRA S.A.; NATHAN L.P.; ZAPPELLINI A.; ZATZ R.; ANTUNES E.; MUSCARÁ M.N.; DE NUCCI G. Chronic nitric oxide synthesis inhibition does not change tissular angiotensin converting enzyme activity but seems to modulate the pressor effects of angiotensin II in the rat, *XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, Caxambu, MG, 1996.

THIEMERMANN C.; LIDBURY P.; THOMAS R.; VANE J. Endothelin inhibits ex vivo aggregation in the rabbit. *Eur. J. Pharmacol.*, **158**: 181-182, 1988.

TRIGGLE D.J. Calcium-channel antagonist: mechanisms of action, vascular selectives, and clinical relevance. *Cleve Clin. J. Med.*, **59**: 617-627, 1992.

TSUCHIYA H.; OTSUKA A.; MIKAMI H.; KATAHIRA K.; TSUNETOSHI T.; KOHARA K.; HIGAKI J.; NUGENT C.A.; OGIHARA T. Increased atrial natriuretic factor secretion after endothelin injection in dogs. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **12**: 379-383, 1990.

YANAGISAWA M.; KURIHARA S.; TOMOBE Y.; KOBAYASHI M.; MITSUI Y.; YASAKI Y.; GOTO K.; MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411-415, 1988.

WEISHAAR R.; ASHIKAWA K.; BING R. J. Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on myocardial ischaemia. *Am. Journ. Cardiol.*, **43**: 113-1143, 1979.

ZAPPELLINI A.; TEIXEIRA S.A.; MUSCARÁ M.N.; ZATZ R.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. In vivo inhibition of nitric oxide synthesis does not depend on renin-angiotensin system activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **317**: 285-291, 1996.

ZAPPELLINI A.; MORENO JR. H.; ANTUNES A.; DE NUCCI G. Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs. *Braz. J. Biol.Res.*, **29(1)**: 33-39, 1996.

8. APÊNDICES

NON-SPECIFIC INHIBITORS OF NITRIC OXIDE SYNTHASE CAUSE MYOCARDIAL NECROSIS IN THE RAT

Heitor Moreno Jr, Luciana P Nathan, Konradin Metze,* Soraia KP Costa, Edson Antunes, Stephen Hyslop, Roberto Zatz[†] and Gilberto de Nucci

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

SUMMARY

1. To study the effect of acute nitric oxide (NO) inhibition on the rat heart both *in vitro* and *in vivo*, male Wistar rats received a single bolus injection of saline, *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 0.5, 1.5, 5.0, 15.0 and 45.0 mg/kg) and D-NAME (5.0 mg/kg).

2. Animals were killed 72 h after the bolus injection of L-NAME and the hearts were removed and studied under light microscopy. In other groups of animals, saline, L-NAME and D-NAME were administered as above and the mean arterial blood pressure (MABP; carotid) was recorded. Furthermore, L-NAME was also administered in the drinking water (20 mg/kg per day) for 72 h. All animals were then killed and their hearts evaluated as described above. Hearts of control animals were perfused *in vitro* and coronary flow was measured following saline, L-NAME (5 µg/heart) and D-NAME (45 µg/heart).

3. Areas of necrosis were observed in the left ventricle of animals that had received L-NAME at 5.0, 15.0 and 45.0 mg/kg. Also, only doses higher than 1.5 mg/kg caused an important increase in MABP. The frequency and extent of the lesions paralleled the dose of L-NAME administered and no lesions were observed in D-NAME- and saline-treated animals.

4. The oral administration of L-NAME also caused myocardial lesions similar to those described above, but the frequency and extent of these lesions were more discrete compared with those observed following 5.0 mg/kg, i.v., L-NAME.

5. Bolus injection of L-NAME into control rat hearts *in vitro* resulted in a small and transient fall in coronary flow (17.2 ± 1.4 and 12.2 ± 1.2 mL/min before and after L-NAME administration, respectively) within 30 s and this was followed 4.5 min later by a further (11.5 ± 1.6 mL/min) decrease. The administration of D-NAME to control hearts caused no change in coronary flow.

6. In conclusion, the acute inhibition of NO biosynthesis by L-NAME causes myocardial necrosis. Both high levels of MABP and a small but significant reduction in coronary flow (associated or not) can be responsible for the lesions we found.

Key words: arterial hypertension, coronary flow, ischaemic cardiopathy, myocardial infarctions, *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester, syndrome X.

INTRODUCTION

There is some evidence of endothelial dysfunction in coronary resistance vessels in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms.¹ Patients with atherosclerosis, arterial hypertension, hypercholesterolaemia, diabetes and other coronary risk factors, but still with 'normal coronary arteries', are believed to suffer from endothelial dysfunction^{2–3} with an abnormal responsiveness to administration of low doses of acetylcholine.⁴ In contrast, approximately 4% of all patients with acute myocardial infarction do not have coronary atherosclerosis demonstrated by coronary arteriography.^{5,6} Although these clinical data indicate that endothelial dysfunction is responsible for myocardial ischaemic lesions in some patients with 'normal' coronary arteries, the underlying mechanisms are still uncertain. In rats, an important role of basal release of nitric oxide (NO) on coronary flow of the isolated heart was observed.⁷ We have previously observed that chronic inhibition of NO causes myocardial lesions in rats; mainly fibrosis and a few necrotic foci associated with high levels of blood pressure (BP) and left ventricular hypertrophy (LVH).⁸ So, it was unclear whether the origin of this fibrosis was due to ischaemia and necrosis (reparative) or to hypertension and LVH (proliferative). The present study was designed to assess in rats whether the effect of acute inhibition of NO could promote myocardial necrosis.

METHODS

Arterial blood pressure measurement

Male Wistar rats (250–300 g) provided by the Biology Institute Laboratory Animal Center (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP) were anaesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal[®]; 40 mg/kg, i.p.; May & Baker, Essex, UK) and their tracheas cannulated. The right carotid artery and left femoral vein were cannulated (Intramedic polyethylene tube PE10; Clay Adams Inc., New York, NY, USA) for the measurement of arterial BP and for drug administration, respectively. The arterial pressure was measured via a pressure transducer (model 7016; Ugo Basile, Varese, Italy) connected to a two channel polygraph (model Gemini 7070; Ugo Basile). Experiments were initiated after at least 15 min of stabilization, at which point the arterial pressure was generally 80–100 mmHg. Animals were divided in the following groups according to the single bolus administration of saline or different doses of *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or *N*^ω-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME) as a single bolus: (i) the control group ($n = 8$) received saline (0.1 mL); (ii) the L-NAME 0.5 mg/kg group ($n = 6$); (iii) the L-NAME 1.5 mg/kg group ($n = 6$); (iv) the L-NAME 5.0 mg/kg group ($n = 7$); (v) the L-NAME 15.0 mg/kg group ($n = 7$); (vi) the L-NAME 45.0 mg/kg group ($n = 9$); and (vii) the D-NAME 45.0 mg/kg group ($n = 4$). The L-NAME and D-NAME doses were dissolved in 0.1 mL saline. We recorded arterial BP and the pulse rate at 10 and 300 mm/min before and immediately after drug administration.

Correspondence: Dr Heitor Moreno Júnior, Division of Clinical Pharmacology, Stanford University Medical School, S-169, Stanford, CA 94305-5113, USA. Email: <moreno@stanclinpharm.stanford.edu>

Received 2 October 1996; revision 15 December 1996; accepted 4 January 1997.

Intravenous administration

Male Wistar rats (270–300 g) were anaesthetized with ether and saline, L-NAME (0.5, 1.5, 5.0, 15.0 and 45.0 mg/kg) and D-NAME (45.0 mg/kg), each in a single injection, were administered into the tail vein. After 72 h animals were killed and their hearts were removed and fixed in 10% formalin for 24 h. Subsequently, atria were removed and the right and left ventricles were then cut into five rings perpendicular to the long axis of the heart. All the rings were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with haematoxylin-eosin. For each rat, one section of each of the five ventricular rings was studied by light microscopy. Myocardial necrosis was evaluated by two blinded observers. For semi-quantitative analysis, we adopted the following classification:⁹ (–), negative, indicating no necrotic foci; (+), weakly positive, indicating one or two small foci of myocardial necrosis or fibrosis, with a diameter <500 µm in one dimension; (++) moderately positive, indicating more than two non-confluent areas of small foci of myocardial necrosis or fibrosis with a diameter <500 µm in one dimension; (+++), strongly positive, indicating confluent foci of myocardial necrosis or fibrosis with a diameter >500 µm in one dimension, or the presence of large infarcts.⁹

Long-term oral administration

Male Wistar rats (150–200 g; $n = 10$) received L-NAME in their drinking water for 72 h. The L-NAME was dissolved to a final concentration of 0.2 mmol/L to give a daily intake of approximately 20 mg/kg per day.¹⁰ The average daily intake of both water and food did not differ significantly between the L-NAME-treated and control rats ($n = 10$).

Langendorff preparation

Male Wistar rats (270–300 g) were anaesthetized with sodium pentobarbitone (Sagatal[®]; 30 mg/kg, i.p.) and were heparinized (500 IU/100 g, i.p.). The hearts were rapidly removed and perfused at 37°C under constant pressure (65 mmHg) according to the method of Langendorff¹¹ and later modifications.¹² The Krebs'-Henseleit solution used had the following composition (mmol/L): NaCl 115; KCl 5.4; CaCl₂ 1.25; NaH₂PO₄ 1.15; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; glucose 11. The solution was gassed with a mixture of 95% O₂–5% CO₂ to give a final pH of 7.4. Experiments were initiated after at least 15 min of stabilization, at which time a single bolus injection of saline (0.1 mL), L-NAME or D-NAME (45 µg/heart) was administered. A latex balloon inserted into the left ventricle was inflated to give a baseline diastolic pressure of approximately 10 mmHg. Coronary flow (CF; mL/min) was measured by manually collecting the effluent over set intervals and recording the resulting volume. Electrical pacing was not used.

The investigation was performed in accordance with the NIH Guide for Care and use of Laboratory Animals.

Drugs

Nitro-L-arginine methyl ester and D-NAME were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) and Bachem (Bubendorf, Switzerland), respectively. Sodium pentobarbital (Sagatal[®]) was purchased from May & Baker (UK).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Student's *t*-test was used to compare changes in heart rate in intact animals before (basal) and after (maximum effect) drug administration and to also compare the CF between L-NAME- and D-NAME-treated hearts. ANOVA was used to compare the effects of L-NAME (at different concentrations) on mean arterial blood pressure (MABP). For comparison of myocardial damage, a Spearman rank order correlation was calculated (MINISTAT 3.1; Kalmia Co. Inc., Cambridge, MA, USA). In all of the above tests, $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Myocardial alterations

At L-NAME doses higher than 1.5 mg/kg, areas of necrosis were observed (Fig. 1). The frequency and extent of these areas increased

with the dose of L-NAME administered (Table 1) and, in three cases (L-NAME 45 mg/kg), up to 80% of the circumference of the left ventricular subendocardial region was involved. None of the hearts treated with D-NAME (45.0 mg/kg) showed any necrosis.

The oral administration of L-NAME (20 mg/kg per day) for 72 h also resulted in myocardial lesions similar to those described above, although they were less frequent and less extensive. In this group of animals, five hearts showed no lesions, three had a score of (+) and two had a score of (++). There were no myocardial alterations in control animals that received tap water alone.

Arterial BP measured by the tail-cuff method¹³ did not change significantly during oral L-NAME administration.

Mean arterial blood pressure

The MABP was evaluated directly (carotid artery) and showed a high increase immediately after the intravenous administration (bolus) of L-NAME at 5.0, 15.0 and 45.0 mg/kg (Fig. 2).

The oral administration of L-NAME for 48 h did not significantly change the MABP (108 $\pm$ 9, 114 $\pm$ 12 and 120 $\pm$ 10 mmHg for basal MABP and MABP at 24 and 48 h, respectively; $P > 0.05$). Neither oral administration nor i.v. infusion of D-NAME caused any alterations in the MABP.

Coronary flow

The bolus injection of L-NAME (45.0 µg/heart) produced a transient fall in CF within 30 s, followed 4.5 min later by a more prolonged decrease. No such effect was seen following D-NAME (Fig. 3).

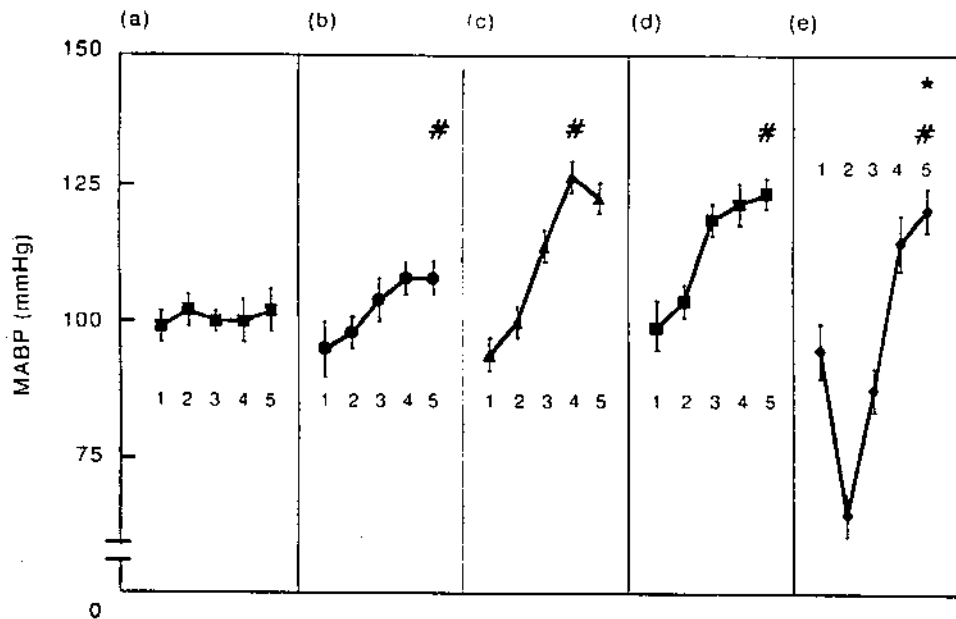
Table 1. Histological findings in rat hearts 72 h after i.v. administration of different doses of L-NAME

Histological classification	Control		L-NAME (mg/kg, i.v.)				
	Saline (n = 18)	0.5 (n = 18)	1.5 (n = 19)	5.0 (n = 18)	15.0 (n = 19)	45.0 (n = 18)	
-	18	18	19	13	3	0	
+	0	0	0	1	4	3	
++	0	0	0	3	7	6	
+++	0	0	0	1	5	9	

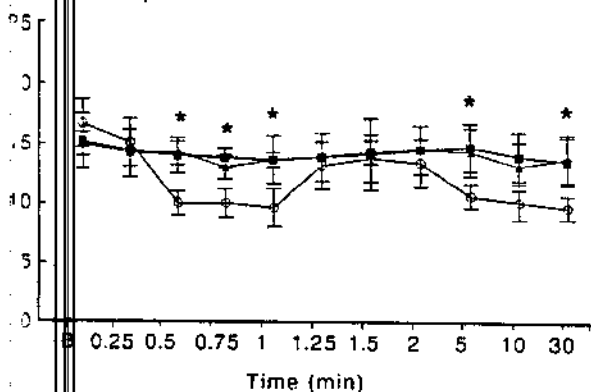
Degree of necrosis: (–), negative; (+), weakly positive; (++) moderately positive; (+++), strongly positive. Spearman $\delta = 0.80$; $P < 0.00001$.



Fig. 1. Recent subendocardial infarct, 72 h after i.v. injection of L-NAME (15 mg/kg). (Haematoxylin and eosin.)



2. Mean arterial blood pressure (MABP) in control rats before (1) and 15 s (2), 30 s (3), 1 min (4) and 5 min (5) after intravenous (i.v.) L-NAME at 0.5 (a), 1.5 (b), 15.0 (d) and 45.0 mg/kg (e). Saline (c) and L-NAME (45.0 mg/kg) infusions did not cause any significant change in MABP.



3. Coronary flow (CF) in rat isolated hearts (Langendorff method) during injection of saline (▲), 45 µg/heart L-NAME (○) and 45 µg/heart D-NAME (□).

4. The increased BP and reduced CF showed similar time course after the i.v. infusion of L-NAME (Fig. 2).

DISCUSSION

Our results clearly show that the acute inhibition of NO biosynthesis leads to results in myocardial necrosis. This finding can be explained by decreased CF or an increased arterial BP or an association between both haemodynamic alterations. However, the design of the present study does not allow us to assess the role of these alterations in the genesis of the observed myocardial lesions. At 45 mg/kg, L-NAME did not cause a decrease in CF or cause hypertension. Also, other vasoconstrictors can cause myocardial lesions through different mechanisms, the importance of the present findings is the demonstration that L-NAME, but not D-NAME, caused myocardial necrosis. Thus, this cannot be explained by any other mechanisms,

such as stimulation of adrenoceptors, activation of the ACE system or direct toxicity, and must be due to the inhibition of NO synthase (NOS; a stereo-specific enzyme). The short-term oral administration of L-NAME corroborates the idea that the fibrosis observed in the chronic model is a later process of myocardium reparation.

A previous study in the rat isolated heart demonstrated that the acute administration of *N*^ω-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), another NOS inhibitor, induces myocardial ischaemia by reducing basal CF.⁷ Furthermore, in dogs, the intracoronary infusion of L-NAME reduces cardiac perfusion as a result of a decrease in artery diameter and blood flow.¹⁴ For the first time, our data extend these observations by demonstrating an association between acute NO inhibition and the presence of myocardial necrosis, suggesting that the lesions observed may have an ischaemic origin (decreased CF). Myocardial lesions only observed in rat heart that had a high MABP level suggest that systemic vasoconstriction can be another factor for the development of myocardial ischaemia.¹⁵ Also, the acute inhibition of NO biosynthesis induced by L-NAME causes, preferentially, subendocardial necrosis similar to that seen in patients suffering from chronic arterial hypertension. We have already studied this relationship between hypertension and myocardial damage in rats in which NO was chronically inhibited by L-NAME and enalapril.¹⁶ The results showed that although enalapril prevented hypertension and left ventricular hypertrophy, it did not prevent the development of myocardial lesions. So, for us, the relative importance of decreased CF and hypertension as major contributors to the development of myocardial damage remains unclear. However, we cannot entirely exclude the possibility of a direct, toxic action of L-NAME on the myocardium: the lack of any effect by D-NAME on CF strengthens the hypothesis of an ischaemic origin for these lesions.

We have demonstrated that the development of ischaemic myocardial necrosis may follow the administration of L-NAME. This observation reinforces the current suggestion that endothelial dysfunction may be involved in clinical conditions such as myocardial infarcts with 'normal' coronary arteries, which have a poorly defined aetiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

During the course of this work H Moreno Jr was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). K Metzke, R Zatz and G de Nucci thank the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for financial support. We are grateful to Mr Airton F Paula, Mr Ismael Vêncio and Mr Guaracy da Silva Ribeiro for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Motz W, Vogt M, Rabenau O, Scheler S, Lückhoff A, Strauer BE. Evidence of endothelial dysfunction in coronary resistance vessels in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *Am. J. Cardiol.* 1991; **68**: 996-1003.
2. Dean JD, Jones CJH, Hutchison SJ, Peters JR, Henderson AH. Hyperinsulinaemia and microvascular angina ('syndrome X'). *Lancet* 1991; **337**: 456-7.
3. Mealy B. Endothelial cell dysfunction: An emerging endocrinopathy linked to coronary disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1990; **16**: 357-8.
4. Vrints CJM, Builth H, Hitter E, Herman AG, Snoeck JP. Impaired endothelium-dependent cholinergic coronary vasodilation in patients with angina and normal coronary arteriograms. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992; **19**: 21-31.
5. Roseblatt A, Selzer A. The nature and clinical features of myocardial infarction with normal coronary arteriograms. *Circulation* 1977; **55**: 578-80.
6. Ciraulo DA, Bresnahan GF, Frankel PS, Isely PE, Zimmerman W, Chesne RB. Transmural myocardial infarction with normal coronary angiograms and with single vessel coronary obstruction. Clinical-angiographic features and five-year follow-up. *Chest* 1983; **83**: 137-41.
7. 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.
8. Moreno H Jr, Metzke 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.
9. Factor SM, Bhan R, Minase T, Wolinsky H, Sonnenblick E. Hypertensive-diabetic cardiopathy in the rat. *Am. J. Pathol.* 1981; **102**: 219-28.
10. Ribeiro MO, Antunes E, Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; **20**: 298-304.
11. Langendorff O. Untersuchungen an überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* 1895; **16**: 291-382.
12. Neely JR, Leibermeister H, Battersby E, Morgan HE. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat hearts. *Am. J. Physiol.* 1967; **212**: 804-14.
13. Zatz R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Anim. Sci.* 1990; **40**: 198-201.
14. Huckstorf C, Zanzinger J, Fink B, Bassenge E. Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. *Arch. Pharmacol.* 1994; **349**: 367-73.
15. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Signals for the remodeling of the cardiac interstitium in systemic hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; **17** (Suppl. 2): 14.
16. Moreno H Jr, Nathan LP, Costa SKP *et al.* Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; **287**: 93-6.

European Journal of Pharmacology

The EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY publishes manuscripts on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems.

Manuscripts submitted to the journal are only accepted on the understanding that: (1) they are subject to editorial review; (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal; (3) the recommendations from the declaration of Helsinki and the internationally accepted principles in the care and use of experimental animals have been adhered to.

In addition to full length papers, the journal publishes short communications and rapid communications. Acceptability of rapid communications will be decided by the editors of the journal, who will be advised by an external referee. Full length manuscripts and short communications are generally submitted to 2 referees who are chosen for their ability to evaluate the work. Authors may request that certain referees should not be chosen. Members of the editorial board will usually be called upon for advice when there is disagreement among the referees or between referees and authors, or when the editors believe that the manuscript has not received adequate consideration from the referees. In order to reduce mailing cost, manuscripts will not be returned. Only the decision of the editorial office, together with the advice of the referees will be sent to the author(s). Referees will be requested to keep the copy of the manuscript which they have received for evaluation, and to destroy it once they have been notified of the final decision concerning the manuscript. When authors submit a revised manuscript, they should reply to the comments of the referees, indicating which comments have been incorporated and the reasons for disregarding any suggestions considered unacceptable. Revised manuscripts should be returned in duplicate to the editors. A revised manuscript should be received by the editorial office not later than 5 weeks (in case of minor revision) or 10 weeks (in case of extensive revision) after the editorial decision was sent to the author(s); otherwise it will be processed as a new manuscript. Handwritten additions or corrections will not be accepted. Only complete retyping of the pages affected by revision is acceptable.

For further information please refer to the 'General instructions' at the end of this issue, and the 'Notice to authors' published in Vol. 272, No. 1, p. v.

Founded in 1967. Founding editors: David de Wied and Jacques van Rossum.

Editors: W.H. GISPEN, Utrecht (chairman) J. BRUINVELS, Utrecht F.P. NIJKAMP, Utrecht D.H.G. VERSTEEG, Utrecht

Honorary editor: D. DE WIED

Editorial board:

C. ADVENIER, Paris
J. ARNT, Valby
P.J. BARNES, London
L. BARTHÓ, Pécs
G. BIGGIO, Cagliari
J. BORRELL, Madrid
O.E. BRODDE, Halle
T.F. BURKS, Houston
E. COSTA, Orangeburg
L.X. CUBEDDU, Caracas
S. ELLIS, Washington
M. ENDOH, Yamagata
J.P.M. FINBERG, Haifa
J.A. GARCÍA-SÁINZ, Mexico
G.F. GEBHART, Iowa City
Y. IGNATOV, Leningrad

D.A. KHARKEVICH, Moscow
Z. KLEINROK, Lublin
R. KVETNANSKY, Bratislava
G. LAMBRECHT, Frankfurt/M
M. LAZDUNSKI, Valbonne
R. LEFEBVRE, Gent
X.Y. LI, Shanghai
W. LÖSCHER, Hannover
J.M. LUNDBERG, Stockholm
G.S. MARKS, Kingston
T. MASAKI, Kyoto
J. McCULLOCH, Glasgow
D.N. MIDDLEMISS, Harlow
H. MÖHLER, Zurich
E.E. MÜLLER, Milan
H.R. OLPE, Basel

J.A. RIBEIRO, Oeiras
M.R. ROSEN, New York
H.J. RUSKOHO, Oulu
A. SARIA, Innsbruck
P.R. SAXENA, Rotterdam
R. SCHULZ, München
P.L. SHARMA, Chandigarh
P.F. SPANO, Brescia
J.C. STOCLET, Strasbourg
N.A. TERRAGNO, Buenos Aires
P.B.M.W.M. TIMMERMAN, Wilmington
T. TOMITA, Nagoya
D.J. TRIGGLE, Buffalo
B.J.R. WHITTLE, Beckenham
R.J. WINQUIST, Ridgefield

Consultants:

B. AHRÉN, Malmö; E. BEUBLER, Graz; G. BURNSTOCK, London; R. BUSSE, Frankfurt/M; A.G. CHAPMAN, London; S.J. COOPER, Durham; R. COUTURE, Montreal; J.M. CRAWLEY, Bethesda; S.E. DAHLÉN, Stockholm; W. DE JONG, Strasbourg; A. DEN HERTOEG, Groningen; G. DI CHIARA, Cagliari; H.N. DOODS, Biberach; G.J. DUSTING, Parkville; S.H. FERREIRA, Ribeirão Preto; A.W. FORD-HUTCHINSON, Dorval; J.R. FOZARD, Basel; D. GANTEN, Berlin-Buch; J.F. GIUDICELLI, Le Kremlin-Bicêtre; A.R. GREEN, London; R.J. GRYGLEWSKI, Kraków; H. HAMON, Paris; A. HERMAN, Antwerpen; P. HOLZER, Graz; D. HOYER, Basel; J.P. HUIDOBRO-TORO, Santiago; L.J. IGNARRO, Los Angeles; S.D. IVERSEN, Oxford; H. KARAKI, Tokyo; S.J. KONTUREK, Kraków; G. KUNOS, Richmond; R. LAVERTY, Dunedin; B.E. LEONARD, Galway; B.R. LUCCHESI, Ann Arbor; C.A. MAGGI, Florence; I.G. MARSHALL, Glasgow; M.J. MILLAN, Croissy-sur-Seine (Paris); A.H. MULDER, Amsterdam; T. NABESHIMA, Nagoya; R.J. NAYLOR, Bradford; D.J. NUTT, Bristol; M. OTSUKA, Hyogo-ken; J.M. PALACIOS, Barcelona; J.R. PARRATT, Glasgow; J.N. PENNEFATHER, Clayton; R. QUIRION, Verdun; M. RAITERI, Genova; U. RAVENS, Essen; D. REGOLI, Sherbrooke; B.P. ROQUES, Paris; H. SCHOEMAKER, Bagneux; K. SCHRÖR, Düsseldorf; E. SEIFEN, Little Rock; K.F. SEWING, Hannover; P. SKOLNICK, Bethesda; P. SNEDDON, Glasgow; S.H. SNYDER, Baltimore; N. SPERELAKIS, Cincinnati; K. STARKE, Freiburg; H.A.J. STRUYKER BOUDIER, Maastricht; R.K. TÜRKER, Ankara; P.A. VAN ZWIETEN, Amsterdam; B.B. VARGAFTIG, Paris; J.R. WALTERS, Bethesda; J. ZAAGSMA, Groningen

Short communication

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

Heitor Moreno, Jr.^{a,*}, Luciana Piovesan Nathan^a, Soraia Kátia Pereira Costa^a,
Konradin Metze^b, Edson Antunes^a, Roberto Zatz^c, Gilberto De Nucci^a

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Department of Pathology and Center of Experimental Medicine and Surgery, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Department of Nephrology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

Received 28 August 1995; accepted 29 September 1995

Abstract

In rats, chronic administration of the nitric oxide (NO) inhibitor *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes arterial hypertension, cardiac hypertrophy and myocardial ischemic alterations such as necrosis and fibrosis. In this study, we evaluated the effect of 8 weeks of treatment with enalapril maleate on cardiac weight and on the development of the histological alterations induced by L-NAME. Enalapril significantly inhibited the development of both arterial hypertension (117.2 ± 5.8 , 161.8 ± 8.8 and 122.0 ± 10.6 mm Hg, for control, L-NAME- and L-NAME + enalapril-treated animals, respectively) and left ventricular hypertrophy (1.36 ± 0.13 , 1.60 ± 0.04 and 1.48 ± 0.05 mg/g, for control, L-NAME- and L-NAME + enalapril-treated animals, respectively), but had no effect on the myocardial lesions. These findings demonstrate that although the renin-angiotensin system plays a major role in the development of arterial hypertension and cardiac hypertrophy, it does not modulate the ischemia-induced myocardial alterations observed in this model.

Keywords: Nitric oxide (NO); Hypertension; Enalapril; Renin-angiotensin system; Myocardial ischemia

1. Introduction

The chronic administration of the nitric oxide (NO) inhibitor *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), Moore et al., 1989) to rats causes arterial hypertension accompanied by functional alterations and structural lesions in the kidneys (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992) and heart (Moreno et al., 1994). Since inhibition of the renin-angiotensin system prevents the alterations induced by L-NAME in the kidney (Ribeiro et al., 1992), we have evaluated whether the renin-angiotensin system is also involved in the L-NAME-induced cardiac alterations in rats.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

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

2.2. Blood pressure measurements

Mean arterial pressure was measured twice a week by a tail-cuff method (Zatz, 1990) and the mean of

*Corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, P.O. Box 6111, UNICAMP 13081-970, Campinas, Brazil. Tel.: 55 192 39 7185; fax: 55 192 52 1516.

these two determinations was considered to be the mean for that week. The same procedure was applied to the weight gain.

2.3. Cardiac weight indexes and histological analysis

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

2.4. Drugs

N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) was purchased from Sigma (USA). Enalapril maleate was provided by Biosintética (Brazil).

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Analysis of variance (ANOVA) was applied to repeated measurements in order to assess the differences in body weight and tail-cuff pressure. When the ANOVA results were significant, Duncan's test was applied to determine the level of significance and a *P* value < 0.05 was considered to be significant. For compari-

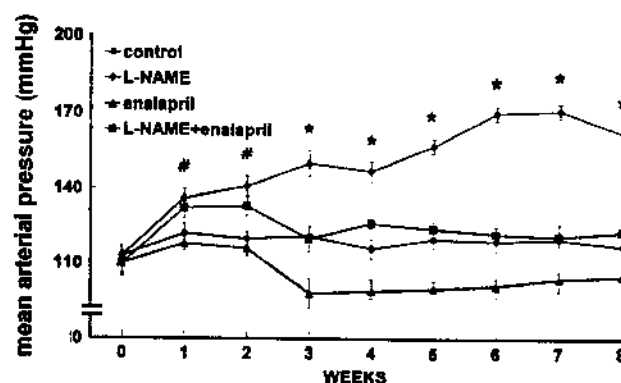


Fig. 1. Mean arterial pressure (mm Hg) during the 8 weeks of study. (●) control (*n* = 15), (◆) L-NAME (*n* = 8), (▲) enalapril (*n* = 9), (■) L-NAME + enalapril (*n* = 9). Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. **P* < 0.05 (ANOVA); Duncan test: L-NAME > control = enalapril = L-NAME + enalapril; #*P* < 0.05 (ANOVA); Duncan test: L-NAME = L-NAME + enalapril > control = enalapril.

son of the myocardial damage in the different study groups, the Kruskal-Wallis and Dunn tests (Primer of Statistics, from software Stanton Glanz) were used.

3. Results

3.1. Body weight and tail-cuff pressure

The body weight of control, L-NAME, enalapril and L-NAME + enalapril rats did not differ significantly from each other. L-NAME treatment induced a time-dependent increase in the blood pressure up to the sixth week of treatment after which the levels stabilized (Fig. 1). Enalapril prevented the hypertension in the L-NAME + enalapril rats after the second week of treatment (Fig. 1). Enalapril alone significantly reduced the blood pressure after the second week of treatment (*P* < 0.05; Fig. 1).

3.2. Cardiac weights

Chronic treatment with L-NAME significantly elevated the heart weight index (1.90 ± 0.18 and 2.12 ± 0.05 mg/g for control and L-NAME-treated animals, respectively; *P* < 0.05). This increase was abolished by enalapril (1.84 ± 0.06 mg/g; *P* < 0.05). Similarly, L-NAME caused a significant increase in the left ventricular weight index (1.36 ± 0.13 and 1.60 ± 0.04 mg/g, for control and L-NAME-treated animals, respectively; *P* < 0.05) which was also prevented by enalapril (1.48 ± 0.05 mg/g; *P* < 0.05). In the animals receiving enalapril alone, there were no significant alterations in the heart weight index (1.89 ± 0.07 mg/g) and left ventricular weight index (1.50 ± 0.08 mg/g) when compared with the control group.

Table 1
Myocardial alterations at the end of the study (week 8)

Groups	Myocardial alterations			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
Control (n = 15)	15	0	0	0
L-NAME (n = 8)	4	2	0	2
Enalapril (n = 9)	9	0	0	0
L-NAME + enalapril (n = 9)	5	2	0	2

Alterations: (-) none; (+) grade one; (++) grade two; (+++) grade three. Kruskal-Wallis: $P < 0.05$; $H = 8.920$. Dunn test: control + enalapril $\neq$ L-NAME = L-NAME + enalapril.

3.3. Histological alterations

In both the control and enalapril groups, no heart was classified as positive. L-NAME-treated animals developed myocardial alterations which were not prevented by enalapril (Table 1). The lesions observed consisted mainly of areas of dense interstitial and replacement fibrosis consistent with organized myocytic necrosis. Fresh myocardial necrosis was also encountered. Subendocardial infarcts were common, sometimes occupying up to 80% of the circumference of the left ventricle. In the L-NAME-treated rats, thickened arterial walls with perivascular fibrosis could be found (Moreno et al., 1994).

4. Discussion

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

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

Previous studies (Lund and Tomanek, 1978; Buttrick et al., 1986) have demonstrated that left ventricular hypertrophy due to arterial hypertension is associated with a limited coronary vasodilator reserve and that this situation is a predisposing factor for the development of myocardial ischemia. Interestingly, the activation of the renin angiotensin system leads to the development of left ventricular hypertrophy (Weber et al., 1991) and angiotensin II causes myocyte acute injury in vivo (Tan et al., 1991). Although the above findings indicate a close relationship between renin angiotensin

system activation and myocardial ischemia, the failure of enalapril to prevent the development of ischemic lesions indicates a clear dissociation between left ventricular hypertrophy and the ischemic process in this model of chronic NO synthesis blockade. Indeed, renovascular hypertensive rats are known to develop left ventricular hypertrophy, yet no ischemic lesions are observed in the hearts of these animals (Moreno et al., 1994), thus supporting the concept that the ischemic process may be unrelated to the development of cardiac hypertrophy (Brush et al., 1988).

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

Acknowledgements

H.M.Jr. is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). K.M., R.Z. and G.D.N. thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We acknowledge the excellent technical assistance of Mr. Airton F. Paula, Mr. Ismael Vêncio and Mr. Guaracy da Silva Ribeiro.

References

- Baylis, C., B. Mitruka and A. Deng, 1992, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage, *J. Clin. Invest.* 90, 278.
- Brush, J.E., R.O. Cannon III, W.H. Schenke, R.O. Bonow, M.B. Leon, B.J. Maron and S.E. Epstein, 1988, Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy, *New Engl. J. Med.* 319, 1302.
- Buttrick, P.M., A. Malhotra, L. McDermott, L. Lam and R. Brodman, 1986, Isomyosin distribution on overloaded human atrial myocardium, *J. Am. Coll. Cardiol.* 7(2), 86A.
- Childs, T.J., M.A. Adams and A.S. Mak, 1990, Regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by enalapril and the expression of contractile proteins, *Hypertension* 16, 662-668.
- Dunn, F.G., W. Oigman, H.O. Ventura, F.H. Messerli, I. Kobrin and E.D. Frohlich, 1984, Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension, *Am. J. Cardiol.* 53, 105.
- Factor, S.M., R. Bhan, T. Minase, H. Wolinsky and E. Sonnenblick, 1981, Hypertensive-diabetic cardiopathy in the rat, *Am. J. Pathol.* 102, 219.
- Jover, B., A. Herizi, F. Ventre, M. Dupont and A. Mimran, 1993, Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade, *Hypertension* 21, 944.
- Lund, D.D. and R.J. Tomanek, 1978, Myocardial morphology in spontaneously hypertensive and aortic-constricted rats, *Am. J. Anat.* 152, 141.

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