

ADEMIR GAZZOTO FILHO

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS
HEMODINÂMICOS DA MIOCARDIOPATIA DIABÉTICA
E INDUZIDA POR L-NAME EM RATOS**

**Campinas
2009**

ADEMIR GAZZOTO FILHO

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS
HEMODINÂMICOS DA MIOCARDIOPATIA DIABÉTICA
E INDUZIDA POR L-NAME EM RATOS**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR

**Campinas
2009**

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

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

G258e Gazzoto Filho, Ademir
 Estudo comparativo dos efeitos hemodinâmicos da miocardiopatia
 diabética e induzida por L-name em ratos / Ademir Gazzoto Filho.
 Campinas, SP : [s.n.], 2009.

 Orientador : Heitor Moreno Junior
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Hipertensão. 2. Cardiomiopatias. 3. Hemodinâmica. I.
 Moreno Júnior, Heitor. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Hemodynamic effects of hypertensive-diabetic and L-name
induced cardiomyopathy in rats: a comparative study**

Keywords: • Hypertension
 • Cardiomyopathies
 • Hemodynamics

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

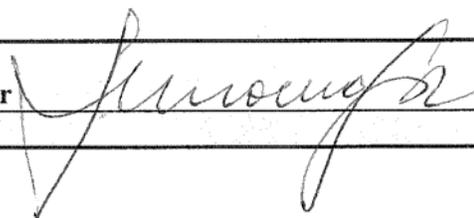
Prof. Dr. Heitor Moreno Junior
Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida
Profa. Dra. Alessandra Linardi

Data da defesa: 08-05-2009

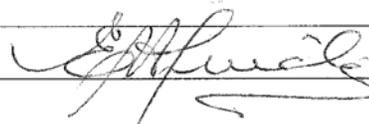
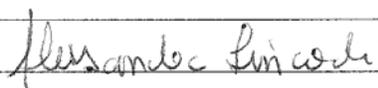
Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Ademir Gazzoto Filho

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Heitor Moreno Junior



Membros:
Professor (a) Doutor (a) Alessandra Linardi
Professor (a) Doutor (a) Eros Antonio De Almeida



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/05/2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Família. Meus Pais e Irmãs que me deram todo apoio, e incentivo. A minha esposa Andrea pela confiança, paciência e compreensão. Obrigado pelo seu amor e carinho!

Agradeço à minha família, pelo apoio e carinho. Minha mãe Sônia meu pai Ademir e minhas irmãs Juliana e Sara. Só eles têm idéia de todos os obstáculos ultrapassados para chegar até aqui.

Agradeço ao professor Heitor Moreno Júnior, pela confiança, pela grande amizade e orientação nos momentos mais delicados da minha vida acadêmica e pelos ensinamentos; "Coração de Leão, olho de Tigre".

Agradeço à doutora Silvia Elaine Mello pela amizade, e toda ajuda para conclusão deste trabalho, além da paciência.

Agradeço à doutora Maricene Sabha pela amizade, ajuda e conselhos nas horas difíceis.

Agradeço a todo corpo docente do Departamento de Farmacologia por contribuírem para minha formação.

Agradeço ao doutor Luis Claudio e Marcos pela amizade e apoio, nos momentos difíceis com seus conselhos.

Agradeço aos colegas de laboratório, Rafael, Valéria, Samanta, Daniel, Ricardo, Nayara, Leandro, Thiago e Rodrigo, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Agradeço a todos os funcionários da Farmacologia que me ajudaram em especial ao grande amigo Adilson Thomaz por todo apoio e orientação com todos os experimentos. Obrigado pela ajuda.

Agradeço a minha esposa Andrea por toda a compreensão, amor e carinho indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos do IB pelo companheirismo e amizade.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Óxido Nítrico	15
1.1.1 Síntese de Óxido Nítrico	15
1.1.2. Mecanismo de ação	17
1.1.3 Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico	19
1.1.4 Inibição Crônica da Síntese de Óxido Nítrico	20
1.2 Nucleotídeos Cíclicos	23
1.2.1 GMPc.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO.....	30
3.1 Grupos Experimentais	31
3.2 Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda	32
3.3 Hipertensão arterial – Técnica de Goldblatt.....	32
3.4 Indução do Diabetes	33
3.5 Determinação da massa miocárdica.....	33
3.6 Avaliação histológica	34
3.7 Determinação das áreas de fibrose e do diâmetro de cardiomiócitos.....	34
3.8 Coração isolado	34
3.9 Sistema de perfusão do coração isolado	35
3.10 Determinação do desenvolvimento de pressão intra-ventricular	35
3.11 Avaliação da resposta do coração isolado à administração de noradrenalina.....	36
3.12 Sondas ultrassônicas.....	36
3.13 Método ultrassônico de medida de fluxo.....	36
3.14 Procedimentos cirúrgicos.....	39
3.14.1 Implantação aguda de cateteres.....	39
3.14.2 Implantação de sonda ultrassônica aórtica para experimentos agudos	39

3.15 Registros Hemodinâmicos	39
3.15.1 Registro e análise da pressão arterial	39
3.15.2 Determinação do Glicogênio.....	40
3.16 Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Peso Corporal.....	43
4.2 Pressão arterial de cauda (PAC)	44
4.3 Desenvolvimento da massa miocárdica e áreas de fibrose	45
4.4 Pressão arterial média (PAM).....	46
4.5 Débito cardíaco (DC)	47
4.6 Resistência periférica total (RPT)	48
4.7 Frequência cardíaca (FC).....	49
4.8 Coração isolado	50
4.8.1 - dP/dT +	50
4.8.2 dP/dT –	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Tabela 1. Evolução do peso corporal (g), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média).	43
Tabela 2. Evolução da pressão arterial de cauda (mmHg), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média)	44
Tabela 3. Desenvolvimento do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT), do peso cardíaco relativo (PCRelat), do peso ventricular esquerdo (PVE), do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), do peso ventricular direito (PVD), e do peso ventricular direito relativo (PVD Relat), expressos em microgramas. Médias ± desvios padrão dos cinco grupos experimentais na 8 ^a . semana de estudo.	45
Tabela 4. Medida dos diâmetros dos miócitos das três regiões do ventrículo esquerdo (subendocárdica, médio-miocárdica e subepicárdica) em (µm), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média).	46
Tabela 5. Resultados das áreas de fibrose dos cinco grupos experimentais ao final do período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média).	46

Figura 1 – Reação de síntese de óxido nítrico (NO)	16
Figura 2 – Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular	18
Figura 3 – Domínios estruturais das Guanilato Ciclases (GC)	26
Figura 4 – Clipagem da artéria renal esquerda	33
Figura 5 – Sonda ultrassônica aórtica de medida de fluxo	38
Figura 6 – Evolução do peso corporal durante 8 semanas dos grupos; Controle, DM, 2R1C+DM, 2R1C, L-NAME	43
Figura 7 – Evolução da pressão arterial de cauda durante 8 semanas dos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME, 2R1C+DM	45
Figura 8 – Avaliação da pressão arterial média depois de 8 semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME, 2R1C+DM	47
Figura 9 – Avaliação do fluxo aórtico depois de 8 semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME e 2R1C+DM	48
Figura 10 – Avaliação da resistência periférica total depois de 8 semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME e 2R1C+DM	49
Figura 11 – Avaliação da frequência cardíaca depois de 8 semanas, utilizando Noradrenalina nos seguintes grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME, 2R1C+DM	50
Figura 12 – Avaliação do coração isolado depois de 8 semanas na dP/dt positivo, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME e 2R1C+DM	51
Figura 13 – Avaliação do coração isolado depois de 8 semanas na dP/dt negativo, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-NAME e 2R1C+DM	52

LISTA DE ABREVIATURAS

NO	Óxido nítrico
L-NAME	N [□] - nitro-L-arginina-metil éster
HA	Hipertensão arterial
RVT	Resistência vascular total
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
2K-1C	Two-Kidneys-one clip, modelo de HA experimental
DOCA-SAL	Acetato de desoxicorticosterona-sal, modelo de HA experimental
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
Ach	Acetilcolina
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GCc	Guanilato ciclase cíclico
L-NMMA	N [□] -monometil-L-arginina
L-NNA	N [□] -nitro-L-arginina
L-NIO	N-iminoetil-L-omitina
SRA	Sistema renina angiotensina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
IGF-1	Insulina-like growth hormone-1
TXA₂	Tromboxano A ₂
EDTA	Ácido etilendinitrotetracético sal dissódico
PCTotal	Peso cardíaco total (peso cardíaco corrigido para o peso corporal)
PVE	Peso ventricular esquerdo
PCRelat	Peso cardíaco relativo
PVERelat	Peso ventricular esquerdo relativo (peso ventricular esquerdo corrigido para o peso corporal)
AchE	Acetilcolinesterase
Vv	Volume relativo
PAC	Pressão arterial de cauda
Pcorp	Peso corporal
PVD	Peso ventricular direito
PVDRelat	Peso ventricular direito relativo

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico que atua como molécula chave em muitos processos fisiopatológicos, como a regulação do tônus vascular, neurotransmissão, aprendizado, memória, dentre outros. Por causa de sua importância e envolvimento nos mecanismos fisiológicos e patológicos, a sua regulação e síntese têm sido extensivamente estudadas. A inibição crônica do NO por administração via oral do inibidor inespecífico da NO-sintase, a nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) resulta em cardiopatia hipertensiva em ratos. A hipertensão renovascular [dois rins e um clipe (2R1C)] e o diabetes melito (DM) associadas, induzem a anormalidades morfológicas semelhantes às descritas no modelo de cardiomiopatia induzida por L-NAME em ratos, mas seus efeitos hemodinâmicos ainda são controversos. O presente estudo avaliou a função cardíaca e vascular nestes dois modelos de cardiomiopatia após oito semanas de tratamento. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em 5 Grupos: Grupo Controle; Grupo L-NAME: 60mg/kg/dia de L-NAME; Grupo 2R1C: com estenose cirúrgica de artéria renal para indução de hipertensão arterial renovascular; Grupo DM: animais que receberam estreptozotocina (60 mg/kg intra-venoso), Grupo 2R1C+DM: animais submetidos à cirurgia para indução de hipertensão arterial renovascular e que receberam estreptozotocina. Foram avaliados os seguintes parâmetros: pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica total (RVPT), dP/dt positivo e dP/dt negativo em coração isolado. Em todos os grupos foram encontrados aumento na PAM, RVPT e redução do DC depois de oito semanas em relação ao Grupo Controle. Os grupos L-NAME e 2R1C+DM apresentaram aumento na PAM ($175,4 \pm 29,7$ e $158,7 \pm 16,7$ mmHg, respectivamente) e redução do DC após a oitava semana. A RVPT aumentou em ambos os grupos. Uma diminuição da dP/dt positiva foi observada no grupo 2R1C+DM (1895 ± 98 mmHg/s, $p < 0,05$) vs. Grupo Controle (2534 ± 120 mmHg/s, $p < 0,05$). A dP/dt negativa diminuiu nos grupos L-NAME e 2R1C+DM vs. Grupo Controle (1490 ± 104 e 1460 ± 94 mmHg/s, respectivamente vs. 2080 ± 92 mmHg/s, $p < 0,05$). O presente estudo demonstrou que, apesar das semelhanças morfológicas entre os grupos 2R1C+DM e L-NAME, este último não mimetiza as alterações hemodinâmicas dos modelos diabético-hipertenso renovascular associados em ratos.

Palavras chave: Hipertensão, Cardiomiopatias, Hemodinâmica.

Nitric oxide (NO) is a biological mediator that acts as a key molecule in many pathophysiological processes such as regulation of vascular tone, neurotransmission, learning, memory, and others. Because of its importance and involvement in physiological and pathological mechanisms, its regulation and synthesis have been extensively studied. Inhibition of NO by chronic oral administration of the nonspecific inhibitor of NO-synthase, the nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) results in hypertensive cardiomyopathy in rats. The renovascular hypertension [two kidneys and clip (2K1C)] and diabetes mellitus (DM) associated induce morphological abnormalities similar to those described in the model of cardiomyopathy induced by L-NAME in rats, but its hemodynamic effects are still controversial. This study evaluated the cardiac and vascular function in these two models of cardiomyopathy after eight weeks of treatment. We evaluate the following parameters: mean arterial pressure (MAP), cardiac output (CO), total peripheral vascular resistance (TPVR), positive and negative dP/dt in isolated heart. In all groups were observed increased MAP, TPVR and reduced DC after eight weeks in the control group. Wistar rats were divided into the following groups: Control; L-NAME: 60mg/kg/day; 2K1C+DM: streptozotocin (60 mg/kg) and one renal artery clipped. The following parameters were measured: mean arterial pressure (MAP), heart rate, cardiac output (CO) and total peripheral vascular resistance (TPVR). Positive and negative dP/dt was also evaluated in an isolated heart. L-NAME and 2K1C+DM groups had increased MAP (175.4 ± 29.7 and 158.7 ± 16.7 mmHg, respectively) and reduced CO after the 8th week. TPVR was increased in both groups. A decrease in positive dP/dt was found in the 2K1C+DM (1895 ± 98 mmHg/s, $p < 0.05$) vs. Control group (2534 ± 120 mmHg/s, $p < 0.05$). Negative dP/dt was decreased in the L-NAME and 2K1C+DM groups vs. Control group (1490 ± 104 and 1460 ± 94 mmHg/s, respectively vs. 2080 ± 92 mmHg/s, $p < 0.05$). Decrease in positive dP/dt 2R1C+DM group compared to Control. The negative dP/dt decreased in L-NAME and 2R1C+DM groups. This study demonstrated that despite the morphological similarities between 2K1C+DM and L-NAME groups; the L-NAME group did not mimics the hemodynamic changes in hypertension-diabetic- renovascular model associated in rats.

Keywords: Hypertension; Cardiomyopathy; Hemodynamics

1. Introdução

1.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico multifuncional que serve como molécula chave em muitos processos fisiopatológicos, como a regulação do tônus vascular (Moncada *et al.*, 1991; Gross e Wolin, 1995; Corbin e Francis, 1999), neurotransmissão (Salt *et al.*, 2000), aprendizado e memória (Qiang *et al.*, 1997). Seu baixo peso molecular e rápida difusão são propriedades que eliminam a necessidade de receptor ou presença de enzimas proteolíticas para sua sinalização. Em altas concentrações, o NO é também um agente citotóxico, envolvido em diversas condições críticas, participando desde doenças agudas como choque séptico (Titheradge, 1999) e derrame cerebral (Iadecola, 1997) à transtornos degenerativos de longo prazo como esclerose múltipla (Kroncke *et al.*, 1998) e processos carcinogênicos (Tamir e Tannenbaum, 1996). Por causa de sua importância e envolvimento nos mecanismos fisiológicos e patológicos, sua regulação e síntese têm sido tão extensivamente estudados.

1.1.1 Síntese de Óxido Nítrico

A formação de NO ocorre em células endoteliais em resposta a agonistas tais como acetilcolina, histamina, ou bradicinina (Forstermann *et al.*, 1986). Sua síntese se dá a partir da clivagem do terminal nitrogênio-guanidina do aminoácido L-arginina (Palmer *et al.*, 1988), tendo também sua enzima arginase como regulador da síntese de NO (Willian *et al.*, 2007) onde o produto intermediário a N^G-hidroxi-L-arginina, é convertida em L-citrulina, em uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Hemmens e Mayer, 1998), com a presença de vários cofatores como oxigênio (O₂), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e cálcio (dependendo do tipo de NOS), com conseqüente liberação de NO (Moncada *et al.*, 1988) (**Figura 1**).

Há três isoformas de NOS: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS são isoformas expressas

constitutivamente nas células endoteliais vasculares e nas células neuronais, respectivamente. Estas isoformas dependem do complexo Ca^{++} /calmodulina para produzirem NO, liberando-o em baixas concentrações (ηM) e em condições fisiológicas. Já a iNOS é uma isoforma induzível, sua expressão é dependente de estímulo imunológico ou inflamatório (p.ex. TNF- α , LPS, Interleucina-2 e Interferon γ) podendo ser expressa em uma variedade de células incluindo macrófagos, hepatócitos, células do músculo liso vascular e miócito cardíaco. Produz NO em condições patológicas e em altas concentrações (μM), por longos períodos (Griffith e Stuehr, 1995).

Embora a iNOS esteja principalmente expressa em células inflamatórias após a indução por citocinas e outros mediadores inflamatórios, também está presente constitutivamente em alguns tecidos e sua atividade é independente de Ca^{++} (Andrew e Mayer, 1999; Hecker *et al.*, 1999).

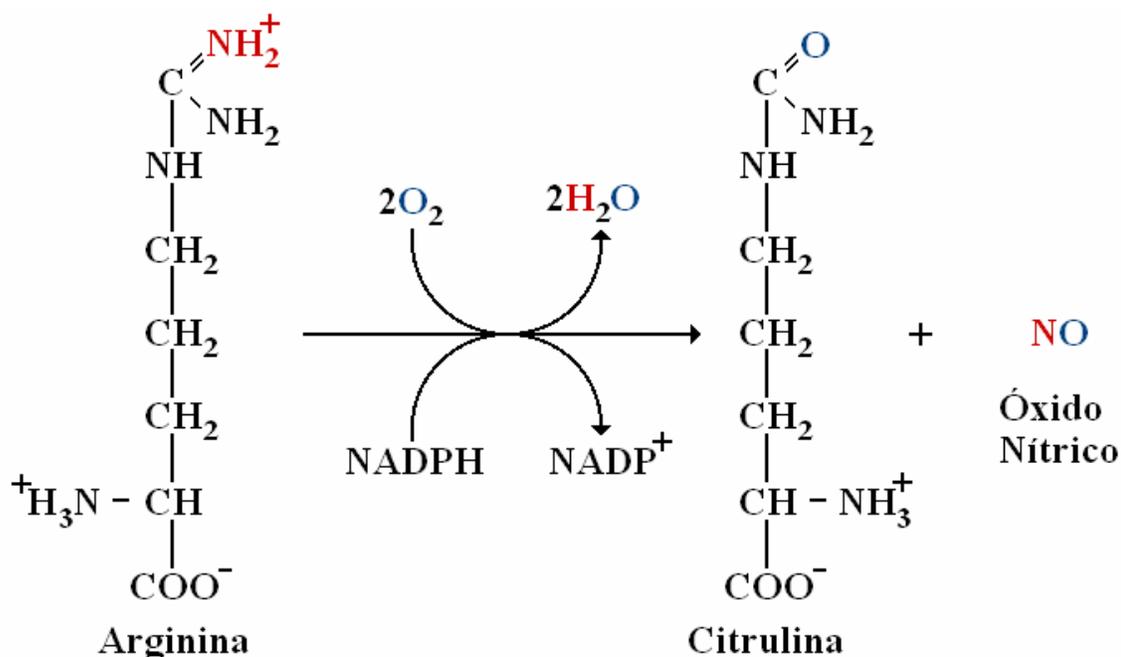


Figura 1. Reação de síntese de óxido nítrico (NO).

1.1.2. Mecanismo de ação

Após sua síntese no endotélio vascular, o NO, por ser uma molécula de pequena dimensão e altamente lipossolúvel, difunde-se para as células do músculo liso vascular ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Ignarro, 1991; Denninger e Marletta, 1999).

Uma vez ativada, a GCs converte guanosina-tri-fostato (GTP) em guanosina-3',5'-monofostato cíclica (GMPc), um segundo mensageiro para seus diversos efeitos biológicos, dentre os quais o relaxamento da musculatura lisa vascular (Waldman e Murad, 1987). **(Figura 2)** Sua meia-vida é extremamente curta, de um a cinco segundos (Clancy *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Kilo *et al.*, 2000). *In vivo*, o NO é rapidamente oxidado a nitrito (NO^-_2) e, posteriormente, a nitrato (NO^-_3), o qual é eliminado na urina (Buga *et al.*, 1991).

Muitas células são capazes de sintetizar o NO, e dependendo do local de síntese, da quantidade produzida, do tipo de isoenzima envolvida na sua liberação e do microambiente onde vai atuar, o NO exerce diferentes ações. Quando pequenas quantidades são liberadas nos terminais nervosos, o NO atua como neurotransmissor, regulando desde o relaxamento de esfíncteres no sistema gastrointestinal até a transmissão de estímulos no sistema nervoso central, em áreas como a memória (Fin *et al.*, 1995) ou o olfato (Okere *et al.*, 1996).

Quantidades similares, porém, se liberadas pelas células endoteliais, regulam o relaxamento da musculatura lisa adjacente, explicando a vasodilatação. As quantidades maiores produzidas, conseqüentes a uma cadeia de estímulos, envolvendo sistema enzimático iNOS, podem ocasionar ou ampliar processos inflamatórios em vários órgãos.

O NO exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo*, que são em parte dependentes do GMPc (Forstermann *et al.*, 1986; Moncada *et al.*, 1991). Pode atuar diretamente em canais de potássio dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio nos vasos, que resulta em vasodilatação (Bolotina *et al.*, 1994). Além de regular o tônus vascular, o NO modula a adesão

leucocitária no endotélio (Kubes *et al.*, 1991), inibe a proliferação celular no músculo liso (Garg e Hassid, 1989; Scott-Burden *et al.*, 1992) e a agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1987), regula a formação de massa óssea (Armour, *et al.*, 2001), o consumo de oxigênio renal (Laycock *et al.*, 1998) e a angiogênese (Lee *et al.*, 1999; Ziche e Morbidelli, 2000).

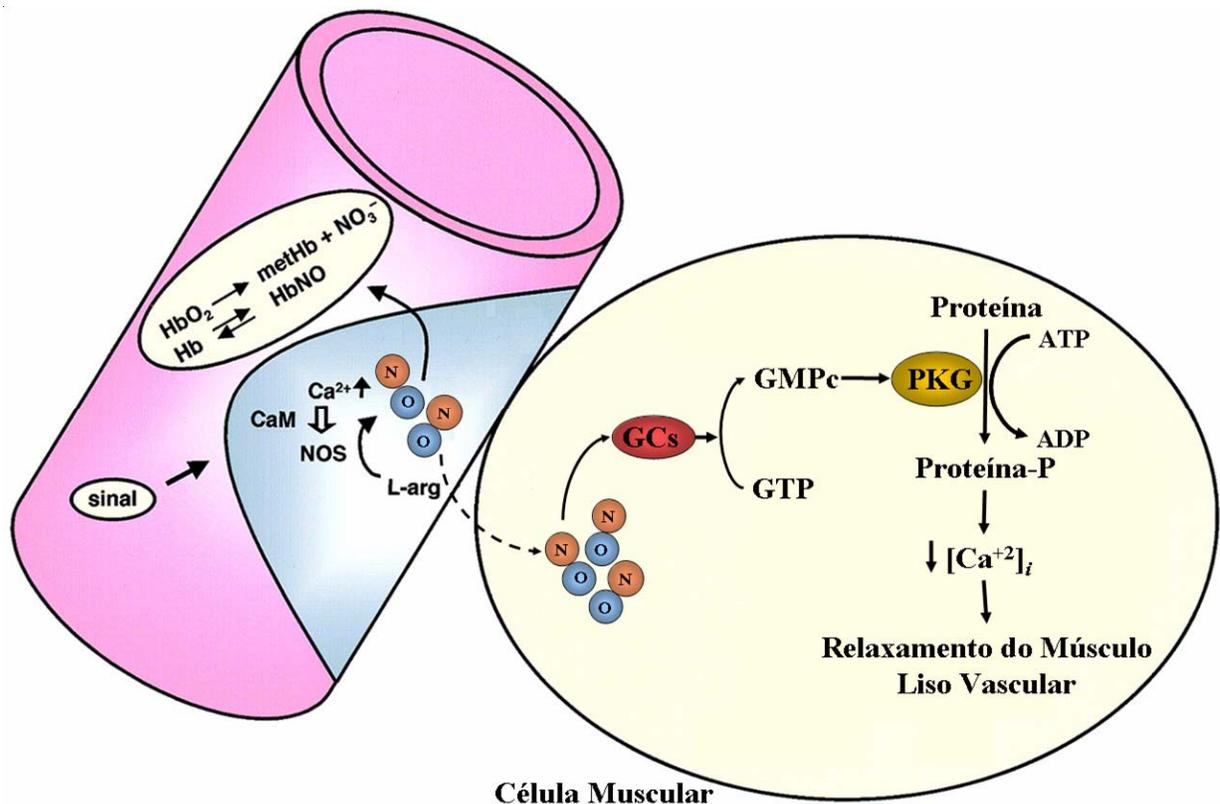


Figura 2. Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular. NO é sintetizado no endotélio vascular, através da ação da NOS que é regulada pela formação do complexo Ca/CaM. A difusão do NO para o tecido muscular ativa GCs e uma vez ativado cataliza a formação de GMPc e cascata de sinalização que resulta em relaxamento do músculo vascular liso (vasodilatação) (Zhao *et al.*, 1998).

Além dos efeitos do NO mediados pela formação de GMPc, como o controle do tônus vascular (Moncada e Higgs, 1993), o NO exerce diversas outras funções independentes da formação deste nucleotídeo cíclico (Pfeilschifter *et al.*, 2001).

Tais funções incluem: **1-** modulação da síntese protéica (Curran *et al.*, 1991); **2-** controle de atividade enzimática (Troy *et al.*, 1996); **3-** regulação da expressão (ativação ou repressão) de genes para: **a)** α -actina (Kawada *et al.*, 1996);

b) citocinas (Remick e Villarete, 1996); **c)** fatores de crescimento (Guo *et al.*, 1998; Tsurumi *et al.*, 1997); **d)** moléculas de adesão (Biffi *et al.*, 1996; Kupatt *et al.*, 1997; Lefer e Lefer, 1996); **e)** proteínas envolvidas em apoptose (Brune *et al.*, 1998; Brune *et al.*, 1998); **f)** receptores (Ichiki *et al.*, 1998; Keh *et al.*, 1996; Michelson *et al.*, 1996; Redmond *et al.*, 1996; Usui *et al.*, 1998; Wallace e Booze, 1997); **g)** enzimas, tais como a ciclooxigenase-2 (COX-2) (Amin *et al.*, 1997), citocromo P-450 (Khatsenko, 1998), metaloproteases de matriz (Lala *et al.*, 1997), superóxido dismutase (Brady *et al.*, 1997) e a própria NOS (Chen e Mehta, 1997).

Alterações atribuídas à atividade ou expressão das NOS e, conseqüentemente, na biodisponibilidade de NO têm sido correlacionadas com processos patológicos como a hipercolesterolemia e aterosclerose (Blair *et al.*, 1999; Kuhlencordt *et al.*, 2001), diabetes (Stockklauser-Farber *et al.*, 2000), insuficiência cardíaca (Watanabe *et al.*, 2000), má cicatrização (Lee *et al.*, 1999), hipertensão (Panza, 1997), hipertensão pulmonar (Kanno *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001) e miocardiopatia hipertensiva (Arnal *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1996).

A utilização de análogos da L-arginina em estudos experimentais (Moreno *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1997; Moreno Junior *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1992; Zappellini *et al.*, 1997) e clínicos (Bedaria *et al.*, 1994; Dachman *et al.*, 1993), promovendo a inibição da produção de NO, constitui importante ferramenta para o melhor conhecimento da importância fisiopatológica do NO.

1.1.3 Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico

Vários compostos análogos à L-arginina, como a N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Rees *et al.*, 1990), a N^ω-amino-arginina (L-NAA) (Gross *et al.*, 1990), a N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (Moore *et al.*, 1990) e a N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Mulsch e Busse, 1990) inibem a síntese de NO de forma dose-dependente através da formação de enantiômeros ópticos. Esses compostos são hidrolisados em nitroarginina e competem com a L-arginina pelo sítio enzimático da NOS e conseqüentemente inibindo a formação de NO (Pfeiffer *et al.*, 1996). Embora

a L-NIO seja aproximadamente cinco vezes mais potente que os demais inibidores, do ponto de vista qualitativo não há diferenças entre eles quando avaliados os efeitos cardiovasculares. A diversidade de potência desses compostos sobre o tecido vascular *in vitro* e *in vivo* (Rees *et al.*, 1990) parece ser devida a diferenças quanto à captação, distribuição e metabolismo dos mesmos (Moncada *et al.*, 1991).

Comparadas aos demais inibidores, apenas a L-NMMA e a L-NAME são ativas por via oral (Gardiner *et al.*, 1990). L-NAME é uma pró-droga, rapidamente e totalmente, hidrolisada em N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), o inibidor ativo da NOS vivo (Avontuur *et al.*, 1998; Brouillet *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1990; Schwarzacher e Raberger, 1992; Tabrizi-Fard e Fung, 1994), que tem uma longa meia-vida plasmática de vinte horas (Krejcy *et al.*, 1993). L-NOARG induz a uma inibição potente, específica e reversível, da eNOS e nNOS *in vivo* e *in vitro* (Gardiner *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1991; Rees *et al.*, 1990). L-NAME é degradado em L-NOARG por um mecanismo que aparentemente não requer metabolismo por enzimas microsossomais (CYP450), uma vez que essa degradação também ocorre no plasma *in vitro*. Não há outros processos de metabolização, pois L-NOARG é o único metabólito detectado na urina. (Brouillet *et al.*, 1995; Tabrizi-Fard e Fung, 1994).

1.1.4 Inibição Crônica da Síntese de Óxido Nítrico

Por motivos éticos, desconhecem-se os efeitos tardios dos inibidores da síntese de NO em humanos. Em ratos, tem sido demonstrado que a inibição crônica da síntese de óxido nítrico pela administração crônica de L-NAME (Palmer *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1987; Rees *et al.*, 1989), por 4-6 semanas é um modelo complexo e bem estabelecido de hipertensão arterial (Baylis *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 1992) e miocardiopatia hipertensiva (Arnal *et al.*, 1993; Moreno Junior *et al.*, 1994; Pechanova *et al.*, 1999).

É caracterizado por elevação da pressão arterial (PA) de forma severa, progressiva e sustentada (Baylis *et al.*, 1992), e pode ser revertida de forma apenas parcial pela infusão de L-arginina. Essa hipertensão apresenta-se associada à redução na frequência cardíaca (FC) (Arnal *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 1992), no fluxo

coronário (Moreno *et al.*, 1997) e débito cardíaco (DC) (Amrani *et al.*, 1992; Jover *et al.*, 1993; Kassab *et al.*, 1998), aumento da resistência vascular periférica total (RVPT) (Herity *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995), diminuição do relaxamento vascular (Holecyova *et al.*, 1996) e alterações na contratilidade cardíaca (Lewis *et al.*, 1990). Além disso, esse modelo experimental apresenta hipertrofia miocárdica (Moreno *et al.*, 1996), aumento do tamanho cardiomiócito (Numaguchi *et al.*, 1995), remodelamento miocárdico e microvascular com fibrose perivascular (Huang *et al.*, 1995; Li e Schiffrin, 1994), sendo que o índice peso cardíaco/peso corporal e peso ventricular esquerdo/peso corporal estão usualmente aumentados (Boger *et al.*, 1994; Delacretaz *et al.*, 1994; Pechanova e Bernatova, 1996). Alterações histológicas consistem em extensas áreas de fibrose e necrose miocárdica, especialmente nas regiões do subendocárdio (Moreno *et al.*, 1996) e aumento de colágeno no coração (Pechanova *et al.*, 1997). A concentração do GMPc, segundo mensageiro do NO, apresenta-se reduzida (Deng *et al.*, 1993). A administração crônica de L-NAME também prejudica a função endotelial e aumenta o dano isquêmico em corações de camundongos com aterosclerose (Tokuno *et al.*, 2001). Nos rins, o L-NAME, causa alterações na hemodinâmica renal e função tubular com necrose fibrinóide segmentar nos glomérulos e conseqüente diminuição na filtração glomerular (Adler *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 1992). Além disso, o tratamento crônico com L-NAME resulta em significativa redução no fluxo sanguíneo periférico no coração, pulmão, fígado, diafragma, músculo esquelético e rins (Huang *et al.*, 1995).

Além das alterações hemodinâmicas e estruturais, o tratamento de ratos com L-NAME durante duas semanas aumenta a expressão de cininogênio e calicreína em diversos tecidos (cérebro, coração, fígado e rins) (Chao *et al.*, 1996). De modo similar, o tratamento crônico de cães com L-NNA aumenta a expressão da enzima ciclooxigenase-1 (COX-1) e, conseqüentemente, a produção de prostaglandinas (Beverelli *et al.*, 1997). Quanto a receptores, (Usui *et al.*, 1998) relataram a inibição da síntese de NO pelo L-NAME em ratos, aumentando a expressão de RNAm para receptores do tipo I de angiotensina II (AT_{1A} e AT_{1B}).

As investigações em animais sustentam a hipótese da complexidade deste modelo que envolve diversos processos fisiopatológicos, como a ativação do sistema

renina angiotensina aldosterona (Ribeiro *et al.*, 1992; Takemoto, Egashira *et al.*, 1997), participação de fatores relacionados ao processo inflamatório (Kelm e Schrader, 1990; Koyanagi *et al.*, 2000), regulação da proliferação celular (miócitos, colágeno e fibroblastos) e hipertrofia do miocárdio (Moreno *et al.*, 1995), além dos próprios níveis de pressão arterial elevados que mimetiza, em parte, a miocardiopatia diabética-hipertensiva em ratos (Sampaio *et al.*, 2002).

Os mecanismos pelos qual a deficiência de insulina pode alterar a resposta vascular não são bem definidos. É possível que a própria deficiência de insulina influencie por si só a reatividade vascular. Desde a década de 40 sabe-se que doses suprafisiológicas de insulina promovem um aumento no fluxo sanguíneo periférico. O óxido nítrico (NO) parece ser um importante mediador da vasodilatação induzida pela insulina. Observaram que o aumento do fluxo sanguíneo do músculo esquelético durante hiperinsulinemia e euglicemia (clamp hiperrinsulinêmico) é dependente do NO. O mecanismo pelo qual a insulina estimula a liberação de NO ainda não é bem definido. É possível, no entanto que a deficiência de insulina por um período prolongado contribua para a vasoconstrição basal encontrada.

A presença de hiperglicemia pode causar também uma disfunção das células endoteliais, embora o efeito do diabetes sobre a função endotelial, medida pela produção de NO, seja dificilmente dissociável do efeito da própria hipoinsulinemia. Evidências da disfunção endotelial no diabetes foram obtidas por, que demonstraram que a vasodilatação dependente do endotélio está diminuída em ratos diabéticos.

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia levaria a uma disfunção endotelial não estão claros, podendo incluir um aumento da atividade da via dos polióis com acúmulo de aldose redutase, um aumento na produção de radicais livres, um aumento na síntese de diacilglicerol e da atividade da proteína quinase C e um acúmulo dos produtos enzimáticos (Poston e Taylor, 1995; Cohen *et al.*, 1993).

Além da ausência de insulina e da hiperglicemia, outros fatores podem contribuir para a extrema heterogeneidade dos estudos de reatividade vascular.

A atividade da renina plasmática encontra-se aumentada durante a administração crônica de L-NAME (Ribeiro *et al.*, 1992), sugerindo a participação do sistema renina - angiotensina (SRA) neste modelo de hipertensão arterial (HÁ). No entanto, a inibição do SRA através da administração crônica de enalapril (Moreno *et al.*, 1995), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), ou losartan, antagonista específico para receptores de Angiotensina II, não é acompanhada de normalização completa da PA. Estudos *in vitro*, com arteríolas aferentes (Tharaux *et al.*, 1997) e rim (Gardes *et al.*, 1994), sugerem que o NO estimula a síntese e/ou a secreção de renina. Por outro lado, vários autores relatam um decréscimo de renina circulante (Knoblich *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1996) e um aumento na atividade da ECA em ratos tratados cronicamente com L-NAME (Gonzales *et al.*, 2000; Takemoto *et al.*, 1997).

Além do SRA, um aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) após tratamento crônico com L-NAME tem sido descrito (Matsuoka *et al.*, 1994; Zanchi *et al.*, 1995), evidenciando seu envolvimento na regulação do tônus vascular neste modelo de HA.

De modo complementar, foi observada queda da PA após bloqueio ganglionar e queda na PA e FC após bloqueio de receptores β -adrenérgico (Cunha *et al.*, 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que a administração de antagonista de AT_1 (candesartan) no trato do núcleo solitário (NTS) produz alterações hemodinâmicas em ratos tratados com L-NAME (Eshima *et al.*, 2000).

1.2 Nucleotídeos Cíclicos

Os nucleotídeos cíclicos, 3',5'guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e 3',5'adenosina monofosfato cíclico (AMPc), são importantes segundos mensageiros, envolvidos na sinalização celular de diversos mecanismos e em diferentes tecidos (Beavo, 1995). Estão envolvidos nos processos de visão (Mclaughlin *et al.*, 1993), olfato (Yan *et al.*, 1995), agregação plaquetária (Dickinson *et al.*, 1997) síntese de aldosterona secreção de insulina (Zhao *et al.*, 1998), relaxamento do músculo liso, proliferação celular (Abell *et al.*, 1989; Assender *et al.*, 1992) e controle da função

cardíaca (Lohmann *et al.*, 1991; Mohan *et al.*, 1995; Vila-Petroff *et al.*, 1999). As concentrações intracelulares de AMPc e GMPc são controladas pelo equilíbrio entre sua síntese em resposta a sinais extracelulares e sua hidrólise pelas fosfodiesterases. Embora muitos dos efeitos do GMPc e AMPc sejam mediados através da ativação de proteínas quinases (PKs) dependentes destes nucleotídeos cíclicos (Lincoln *et al.*, 1995), diversos outros efeitos já são conhecidos.

As vias de sinalização do AMPc e GMPc são organizadas de uma forma não linear (Hunter, 2000). A compartimentalização dos diferentes componentes dessas cascatas de sinalização é um importante determinante do resultado do sinal (Scott *et al.*, 2000) já que praticamente todos os passos das vias de sinalização destes nucleotídeos cíclicos são controlados por mecanismos de feedback. Quando um estímulo extracelular chega à membrana plasmática, ele é transmitido para dentro envolvendo muitos dos sistemas de transdução presentes na célula, e cada componente da cascata é um ponto de conexão entre diferentes vias de sinalização. Sinalização combinada, detecção coincidente, *cross-talk* e condução de sinal são palavras-chaves utilizadas para descrever esta rede de comunicação intracelular. Neste contexto, algumas etapas nas cascatas de sinalização podem ter funções novas e inesperadas.

1.2.1 GMPc

O GMPc regula diversas respostas fisiológicas tais como vasodilatação, secreção intestinal e fototransdução retiniana e exerce seus efeitos através da ativação de diferentes efetores, tais como canais iônicos dependentes de GMPc (Biel *et al.*, 1999), PKs mediadas por GMPc (Lohmann *et al.*, 1997) e fosfodiesterases (PDEs) (Francis *et al.*, 2001; Juilfs *et al.*, 1999). O início da sua cascata de sinalização pelo GMPc ocorre com a ativação da guanilato ciclase (GC) e conversão de GTP em GMPc. **(Figura 2)** A elevação da concentração de GMPc vai então modular as diversas respostas fisiológicas e/ou patológicas de células e tecidos.

A GC está presente, em diversos tipos de células e tecido, em duas formas: guanilato ciclase particulada (GC_p) e guanilato ciclase solúvel (GC_s)

(Hardman e Sutherland, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969; Schultz *et al.*, 1969; White e Aurbach, 1969), que diferem na estrutura e regulação. **(Figura 3)**

A GC ρ é uma enzima ligada à membrana celular (MC) e pertence ao grupo das enzimas ligadas a receptores (Garbers, 1992). Sua estrutura pode ser dividida em três: (1) domínio extracelular amino-terminal que funciona como “receptor”, (2) domínio protéico intracelular “*kinase-like*” e (3) domínio catalítico COOH-terminal (Wedel *et al.*, 1995). Já a GCs, ao contrário das enzimas ligadas à proteínas que são estruturas homodímeras, é uma enzima heterodímera, consistindo de: (1) duas subunidades designadas α e β , ambas necessárias para atividade catalítica (Koesling *et al.*, 1991), (2) domínio *heme*, fundamental para ativação da enzima (Ignarro *et al.*, 1986) e (3) domínio catalítico COOH-terminal, que apresenta constituição bastante homóloga à da GC ρ . O domínio catalítico compreende cerca de 250 aminoácidos responsáveis pela síntese de GMPc (Thompson e Garbers, 1995; Thorpe e Morkin, 1990). **(Figura 3)**

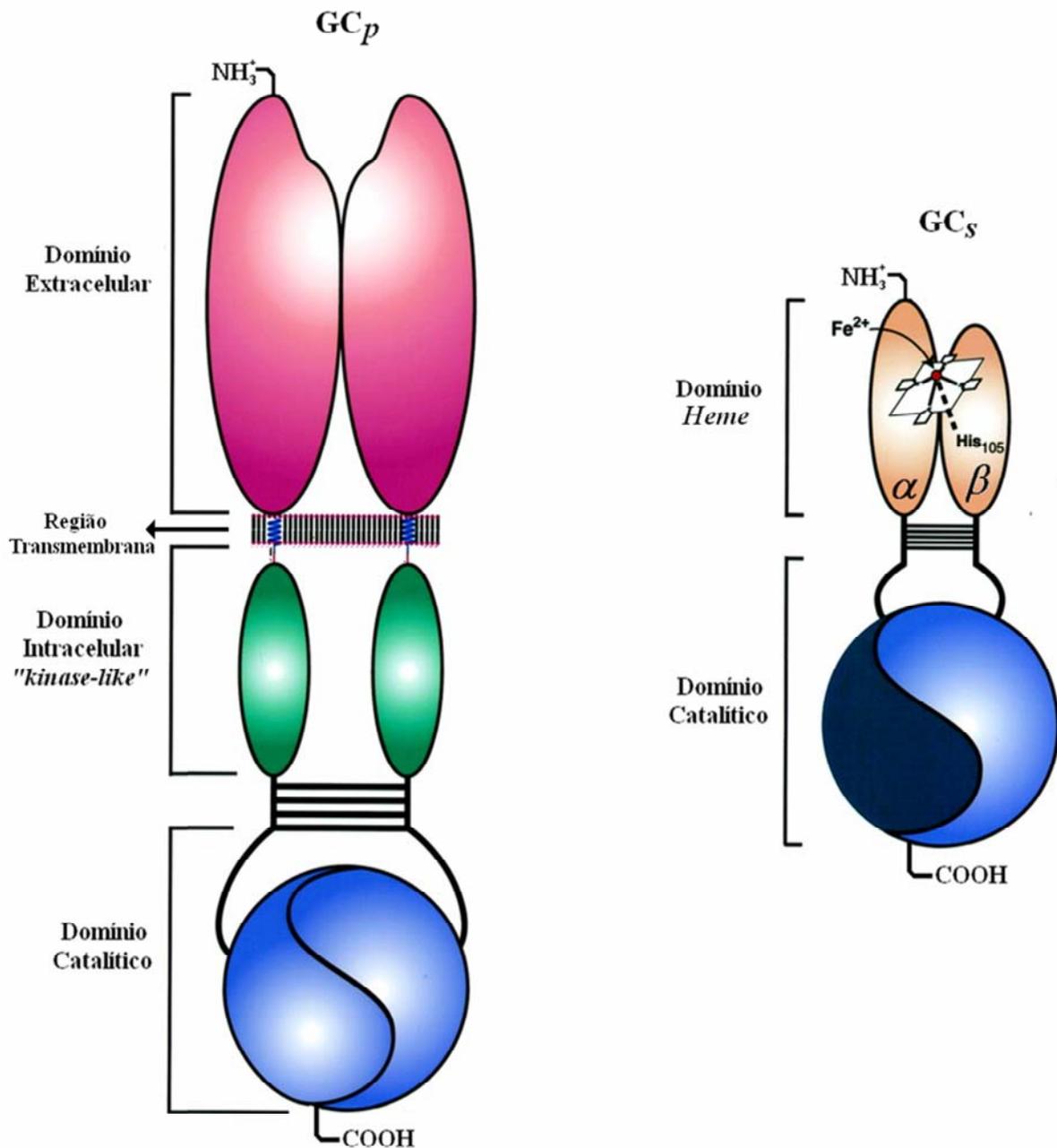


Figura 3. Domínios estruturais das Guanilato Ciclasas (GC). A GC_p é homodímera e apresenta sítio ligante formado por dois domínios extracelulares amino-terminais. GC_s é heterodímera contendo um grupamento heme indispensável a sua ativação. As cores identificam regiões homólogas.

A GC_s é ativada pela molécula de NO que se liga diretamente ao domínio *heme* formando o complexo NO-Fe⁺²-heme (Hille *et al.*, 1979). A GC_p não responde ao NO por não possuir o domínio *heme* em sua estrutura e este domínio é essencial para ativação da enzima pelo NO (Craven e Derubertis, 1978; Ignarro, 1990). Desse

modo, a GCp é ativada através da ligação de peptídeos específicos ao seu domínio extracelular, tais como peptídeo atrial natriurético (ANP) (Chinkers e Garbers, 1989). O ANP é secretado dos miócitos atriais para corrente sangüínea em resposta a distensão ou estiramento da parede dos átrios (Ruskoaho, 1992). Também é conhecida a atividade do peptídeo cerebral natriurético (BNP) (Garbers e Lowe, 1994) e peptídeo natriurético tipo C (CNP) (Hamad *et al.*, 2003) na ativação da GCp e a ordem de potência parece ser ANP \geq BNP > CNP (Hamad *et al.*, 2003).

No sistema vascular, em condições fisiológicas, o relaxamento dos vasos, veias e artérias, são mediados pelo GMPc, através da modulação dos canais de cálcio (Waldman e Murad, 1987), resultando em diminuição da pré- e pós-carga (Jackson, 2001), sendo que a inibição da sua degradação aumenta o fluxo sangüíneo coronário em corações hipoperfundidos durante isquemia induzida por exercício (Rybalkin e Borfeldt, 1999). No coração o GMPc exerce efeitos inotrópicos negativos (Singh e Flitney, 1981; Trautwein e Trube, 1976), reduz o influxo de cálcio (Nawrath, 1977), encurta a duração do potencial de ação (Trautwein *et al.*, 1982) e inibe os potenciais de ação dependentes de Ca⁺² (Bkaily e Sperelakis, 1985; Mehegan *et al.*, 1985; Wahler e Sperelakis, 1985).

Também está envolvido na agregação plaquetária (Schwarz *et al.*, 2001), regulação de transporte eletrolítico e fluído intestinal (Mezoff *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 2000), fototransdução (Ames *et al.*, 1999), controle da secreção de renina (Hackenthal *et al.*, 1990; Kurtz e Wagner, 1998), proliferação celular (Assender *et al.*, 1992; Rybalkin e Bornfeldt, 1999), síntese de matriz extracelular (Dey *et al.*, 1998) e controle do tônus das vias aéreas respiratórias (Stuart-Smith *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1995).

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi comparar as alterações cardiovasculares morfológicas e funcionais, induzidas pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico (NO) com aquelas descritas para o modelo de cardiopatia hipertensiva-diabética em ratos.

3. Material e Método

Neste estudo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 8 e 10 semanas de idade, pesando entre 200 e 250 gramas, quando do início do estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade, no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com 12 horas de período diurno/noturno. Os animais serviram-se “ad libitum” de água e de ração Purina®, contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração. Os experimentos descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEEA/IB/UNICAMP) do qual foram executados em acordo com o NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals e dentro das normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

3.1 Grupos Experimentais

Foram estudados 5 grupos experimentais:

- Grupo CONTROLE: ratos submetidos à cirurgia simulada para produção de estenose de artéria renal recebendo somente água de torneira;
- Grupo L-NAME: ratos que receberam 60mg/kg/dia de L-NAME (N ω -nitro-L-arginina metil éster) acrescentados à água ingerida (Moreno et al, 1996)
- Grupo 2K-1C: ratos submetidos à estenose de artéria renal para indução de hipertensão arterial renovascular;
- Grupo DIABETES: ratos que receberam estreptozotocina (60 mg/100 g de peso corporal; Sigma Chemical Co., MO, USA), por via endovenosa, para indução de diabetes melito (Braunlich et al., 1994);
- Grupo 2K-1C + DIABETES: ratos que também foram submetidos à cirurgia para indução de hipertensão e receberam estreptozotocina (6 mg/100 g de peso corporal), por via intravenosa, ao início do estudo.

Um balanço hídrico diário permitia a adequação do volume de água a ser ingerida pelos animais, visando à ingestão total da droga pelo grupo tratado com L-NAME. Cuidados com o asseio das gaiolas (ex: tipo de serragem troca uma vez ao dia) melhoraram consideravelmente o estado geral dos animais de todos os grupos (principalmente, os diabéticos).

3.2 Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda

Durante o estudo uma vez por semana após o início do mesmo, os animais eram pesados, utilizando-se balança Ohaus (Union N.J.,USA). Nos mesmos dias, a pressão arterial de cauda era avaliada utilizando-se um manguito colocado em torno da cauda do animal o qual era conectado a um microfone usado como sensor. O manguito era inicialmente insuflado a um valor superior à pressão arterial do animal, para em seguida ser desinsuflado até que as pulsações arteriais detectadas por método pletismográfico fossem visíveis ao osciloscópio. Os valores obtidos através deste método correlacionam-se melhor com a pressão média. A medida da pressão arterial de cauda era obtido estando o animal em estado de vigília, após aquecimento em gaiola especial, para que se produzisse vasodilatação da artéria. Para minimizar os efeitos do estresse psíquico, as leituras foram consideradas válidas quando três determinações consecutivas com variações não maiores que 2 mmHg eram registradas (Zatz,1990).

Os valores médios de uma medida semanal do peso corporal e da pressão arterial de cauda foram utilizados como representativos de cada semana.

3.3 Hipertensão arterial – Técnica de Goldblatt

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 50mg/Kg intraperitoneal e submetidos a uma incisão látero-dorsal esquerda através da qual o rim esquerdo era exposto. Com auxílio de haste flexível de algodão, o pedículo renal era isolado, e um clipe de prata (0,2 mm de diâmetro interno) era colocado em torno da artéria renal, como descrito por GOLDBLATT et al. (1934). Em seguida e

cuidadosamente recolocado o rim no abdome do animal, e feita à sutura com fio de algodão número 8. No grupo controle, uma cirurgia “fictícia” era realizada, na qual o clipe era removido imediatamente após sua colocação em torno do vaso e o rim recolocado na cavidade abdominal. Os animais se recuperaram em gaiolas aquecidas 40°.

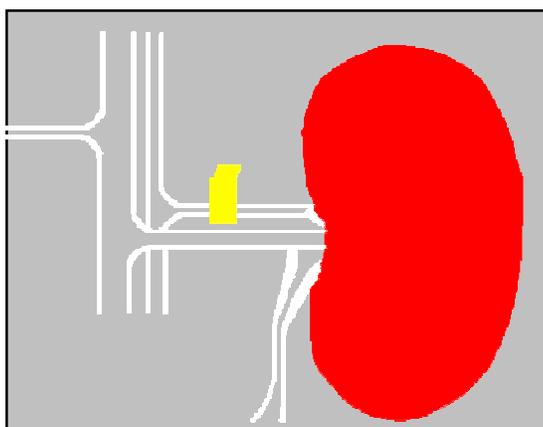


Figura 4. Clipagem da artéria renal esquerda.

3.4 Indução do Diabetes

Os animais eram induzidos à diabetes, com injeção única de estreptozotocina (60mg/kg em tampão citrato 0,05 M; pH=4,2), através da veia peniana, sob anestesia com pentobarbital sódico 50mg/kg. Previamente ao estudo e ao final do mesmo, foi avaliada a concentração de glicose plasmática por reflectometria (Glucotend, Laboratórios Boehringer Mannheim de Portugal, Ltda), tendo sido considerados diabéticos os animais que apresentassem glicemia entre 250-650mg/dl.

3.5 Determinação da massa miocárdica

Após sacrificar os animais com pentobarbital, e ao final de oito semanas de estudo, o coração era removido do tórax, lavado em solução salina e dissecado e os átrios e os ventrículos eram removidos e pesados em uma balança analítica (TR-403 Denver Instrument Company), obtendo-se assim, o peso cardíaco total (PCTotal, g). Em seguida, o peso ventricular esquerdo (PVE, g) era determinado removendo-se

a parede livre do ventrículo direito e pesando-se o tecido restante (ventrículo esquerdo e septo interventricular). O peso do coração e do ventrículo esquerdo foram normalizados para o peso corporal de cada animal ao final do estudo, obtendo-se assim, respectivamente, o peso cardíaco relativo (PCRelat, mg/g) e o peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat, mg/g).

3.6 Avaliação histológica

Após a determinação dos pesos cardíacos, o ventrículo esquerdo era imerso em solução de formol a 10% por 48 horas, sendo após cortado perpendicularmente ao seu maior eixo em cinco níveis equidistantes e incluídos em parafina, os quais eram corados para estudo sob microscopia ótica.

3.7 Determinação das áreas de fibrose e do diâmetro de cardiomiócitos

Essa determinação visa detectar a ocorrência de hipertrofia das fibras, sendo utilizada uma ocular (10x) contendo uma escala graduada (micrômetro ocular) e objetiva de imersão de 100x, resultando em aumento final de 1000x. Com este sistema efetuou-se a medição dos diâmetros dos miócitos de três regiões distintas do ventrículo esquerdo (subendocárdica, médio-miocárdica e subepicárdica) em cada um dos animais dos diferentes grupos experimentais. Mediu-se o diâmetro de 15 miócitos de cada região. Efetuada a medição dos diâmetros celulares, deu-se início a calibração da escala da ocular com uma lâmina especial da marca Zeiss® (micrômetro objeto), que é provida de uma escala onde 1 mm é dividido em 100 intervalos de 10µm. Essa calibração visa transformar as unidades da ocular, que não estão expressas em nenhuma unidade do sistema métrico, em micrômetros (µm).

3.8 Coração isolado

Ao término da 8ª semana os grupos CONTROLE (n=10), L-NAME (n=10), 2K-1C (n=10), Diabetes (n=10) e 2K-1C + Diabetes com peso corporal médio de

350g, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg) por via intra-peritoneal e submetidos à toracotomia lateral. Rapidamente o coração era retirado e mergulhado em solução de Krebs. Em seguida, introduzia-se a extremidade de uma cânula cardíaca na porção da aorta ascendente, onde era realizada uma incisão no átrio esquerdo e através dela, um balão de látex era introduzido no interior do ventrículo esquerdo. Este balão era preenchido com solução salina (0,1 ml) (BING et al., 1995) em todos os animais e conectado através de um cateter de polietileno (Intramedic cateter de polietileno, PE50, Caly Adams, Inc. USA) a um transdutor de pressão (ISOTEC, Hugo Sachs, Alemanha) acoplado a um registrador de oito canais (WR-5000, Graphtec-Watanabe, Hugo Sachs, Alemanha), o qual era previamente calibrado. Foram avaliados funcionalmente os corações dos animais normotensos e hipertensos em modelos diferentes de hipertensão arterial.

3.9 Sistema de perfusão do coração isolado

O coração era perfundido pela técnica de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit (NaCl – 115 mM; KCl – 5,4 mM; CaCl₂ – 1,25 mM; NaH₂PO₄ – 1,15 mM, MgSO₄ – 1,2 mM; NaHCO₃ – 25 mM; Glicose – 11 mM). Após um período de 15-20 min para estabilização, a reatividade do coração será avaliada injetando-se noradrenalina (<0.2 µg) in bolus.

3.10 Determinação do desenvolvimento de pressão intra-ventricular

Com este sistema foi possível determinar as pressões sistólica e diastólica (mmHg) do ventrículo esquerdo. O registro permitiu a determinação da frequência de batimentos cardíacos (FC), dP/dT máxima e dP/dt mínima. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar a capacidade contrátil do ventrículo esquerdo, já que nesta preparação o mesmo efetua contrações isovolumétricas, estando com a pré-carga e a pós-carga fixas. A relação PD/PVE é mais sensível para avaliar a capacidade contrátil intrínseca do miocárdio, pois esta depende da massa miocárdica

participante da contração, refletindo melhor a tensão parietal desenvolvida durante a sístole ventricular (SASAYAMA et al., 1976).

3.11 Avaliação da resposta do coração isolado à administração de noradrenalina.

Obteve-se o registro da pressão intraventricular antes e após administração de noradrenalina 0,1µg em bolus, através da extremidade da cânula cardíaca conectada à aorta. Como valores de PSVE e PDFVE após noradrenalina, foram-se considerado os valores máximos atingidos entre 30-45 segundos após a administração da droga (resposta máxima).

3.12 Sondas ultrassônicas

Foram utilizadas sondas ultrassônicas 2SB (Transonic® Flowprobe – Transonic Systems Inc. NY, EUA), para monitorização do débito cardíaco.

As sondas ultrassônicas são constituídas por uma placa acústica refletora em formato de gancho, com um dispositivo que permite a abertura e o fechamento, possibilitando o envolvimento do vaso sanguíneo. Do lado oposto ficam posicionados dois cristais piezoelétricos (transdutores) que emitem e captam as ondas de ultrassom refletidas pela placa refletora acústica.

3.13 Método ultrassônico de medida de fluxo

O ultrassom é uma forma de medida mecânica que consiste de vibrações de alta frequência, superior ao limite de audição humana (20 kHz). As ondas ultrassônicas são geradas por transdutores ultrassônicos que são dispositivos que convertem a energia elétrica em energia mecânica sonora e vice-versa. Estes transdutores são confeccionados com materiais de propriedade piezoelétrica. O efeito piezoelétrico consiste na variação das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos (Kraus, 1985, Nichols e O'Rourke, 1990). Quando um

material com propriedade piezoelétrica é submetido a pressões que alterem suas dimensões, (e.g. pressões acústicas), um campo elétrico é gerado e ocorre a produção de tensão elétrica. Alguns cristais naturais são piezoelétricos (quartzo, turmalina) outros são produzidos artificialmente em laboratório (sulfato de lítio, titanato de bário, etc).

Para que o cristal seja utilizado como transdutor ultrassônico ele deve ser cortado de forma que um campo elétrico a ele aplicado alternadamente produza variação em sua espessura, dessa variação resulta um movimento das faces do cristal, originando as ondas sonoras. Quanto menor a espessura do cristal, maior é a sua frequência de variação. O mesmo transdutor que emite o sinal ultrassônico pode funcionar como detector, pois os ecos que a ela retornam produzem vibração variando as suas dimensões gerando um campo elétrico. A onda ultrassônica nos dispositivos de medida de fluxo é gerada pela deformação do cristal piezoelétrico causada por uma excitação elétrica. A frequência do ultrassom gerado pela sonda aórtica 2SB é de 3,6MHz. A frequência de medida é dada pela taxa de repetição, ou seja, o número de vezes por segundo que um cristal é ativado, mandando o sinal ultrassônico para o outro transdutor. A taxa de repetição da sonda ultrassônica utilizada para monitorar o débito cardíaco é cerca de 3,5 vezes por segundo.

A excitação elétrica faz com que o transdutor emita uma onda ultrassônica plana que atravessa o vaso em direção à placa acústica refletora, em sentido corrente ou contracorrente. A onda é refletida na placa, atravessa o vaso novamente indo à direção ao outro transdutor onde é transformado em sinal elétrico. Com estes sinais, o fluxômetro deriva uma medida precisa do tempo de trânsito que a onda ultrassônica levou de um transdutor a outro. O tempo de trânsito da onda ultrassônica é afetado pelo movimento do líquido que atravessa o vaso estudado. No sentido contracorrente, a onda de som vai contra o fluxo e o tempo de trânsito total é aumentado. Esta mesma seqüência de transmissão de ondas é repetida, porém as funções de transmissão e recepção dos transdutores são trocadas, desta vez a transmissão é feita no sentido da corrente, dessa forma o fluxo sob estudo é seccionado duas vezes pela onda ultrassônica. Neste ciclo que vai à direção do fluxo (corrente), o som é transmitido mais rapidamente através do vaso. O fluxômetro,

novamente deriva e obtém dessa seqüência de transmissão e recepção a medida precisa do tempo de trânsito. O tempo de trânsito é inversamente proporcional, portanto, à velocidade da corrente sanguínea no vaso e ao fluxo.

Os feixes ultrassônicos que cruzam a janela acústica sem atravessar o vaso não contribuem para o volume do fluxo total, dessa forma, o volume do fluxo é medido pelas sondas ultrassônicas mesmo quando o vaso é menor que a janela acústica.

O feixe ultrassônico passa através do vaso duas vezes e em cada intersecção o feixe é modificado por um componente vetor do fluxo no vaso estudado, e o tempo de trânsito total é calculado pela soma destes dois componentes vetores, que é a própria medida do fluxo. Quando ocorre um desalinhamento no posicionamento do vaso dentro da sonda ultrassônica, um componente vetor do fluxo torna-se maior e o segundo componente vetor, menor, mas há pouca consequência em sua soma, e, portanto o tempo de trânsito é calculado de forma precisa.

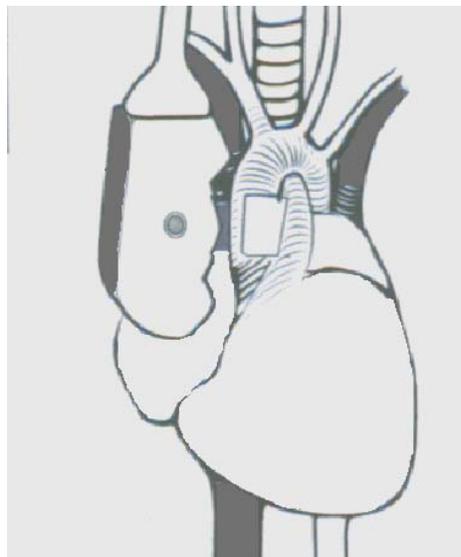


Figura 5. Sonda ultrassônica aórtica de medida de fluxo

3.14 Procedimentos cirúrgicos

3.14.1 Implantação aguda de cateteres

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico e submetidos à cateterização da artéria carótida direita.

3.14.2 Implantação de sonda ultrassônica aórtica para experimentos agudos

Após a indução anestésica, os ratos (n=10) foram entubados com cânula orotraqueal para assistência ventilatória mecânica durante a cirurgia; a cânula foi conectada a um respirador (Pressure Controlled Ventilador Kent Scientific 325 Norfolk Rd – Litchfield CT 06759 – USA). Durante a cirurgia os ratos foram mantidos com volume corrente de 2,5 ml/g e frequência respiratória de aproximadamente 56 movimentos por minuto.

Realizou-se uma incisão na pele na altura do terceiro espaço intercostal direito e após a identificação do espaço intercostal, os músculos intercostais foram seccionados em extensão de aproximadamente 1 cm para permitir o acesso à cavidade torácica. A aorta ascendente foi identificada, dissecada e isolada das estruturas adjacentes. A sonda ultrassônica 2SB (Transonic® Flowprobe – Transonic Systems Inc. NY< EUA), foi então posicionada seguida da incisão na pele e suturada com fio de algodão.

3.15 Registros Hemodinâmicos

3.15.1 Registro e análise da pressão arterial

Os cateteres arteriais foram mantidos patentes com solução de heparina [0,1 ml de heparina sódica 5.000U.I./ml em 0,9 ml de soro fisiológico]. A pressão arterial pulsátil obtida da cânula implantada na artéria carótida foi monitorada através de transdutor de pressão previamente calibrado. O sinal da pressão arterial foi amplificado, e processado por uma placa analógico-digital conectada a um

computador tipo PC carregado com o sistema Windaq (DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EUA) para a monitorização hemodinâmica e pós-processamento.

Os registros foram analisados pelo programa Windaq (DATAQ Instruments Windaq, Version 1.78, Akron, OH, EUA) e Advanced Codas (Dataq Instruments, Calç Package, Version 3.19, EUA). A análise foi realizada com a detecção dos picos sistólicos e diastólicos das ondas de pressão e fluxo para obtenção das medidas aritméticas, batimento a batimento, das pressões sistólicas, diastólicas e média e fluxos arteriais durante cada etapa dos protocolos experimentais. Cada canal de registro adquiriu os sinais a uma frequência de amostragem de 100 Hz. A frequência cardíaca foi obtida da análise dos intervalos entre os picos máximos normalizados para 1 minuto. Os valores do pico máximo, pico mínimo, pressão arterial média (obtida da integral da área de cada pulso) e frequência cardíaca foram obtidos de planilhas de Excel® geradas com valores do pós-processamento com o programa Advanced-Codas.

Com as médias da pressão arterial (PA), débito cardíaco (DC), frequência cardíaca (FC) obtidas no pós-processamento dos registros, foi calculado o volume sistólico (VS), a resistência total (RPT) dos grupos estudados. O volume sistólico foi calculado pela fórmula: $VS=DC/FC$, individualmente para cada animal. A resistência periférica total (RPT) foi calculada pela relação: $RPT=PAM/DC$.

3.15.2 Determinação do Glicogênio

As amostras de ventrículo (200 mg) foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada (3000 rpm durante 15 min). O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol (Lo et al., 1970). A concentração de glicogênio (100 mg de peso úmido) foi determinada pela leitura da absorbância a 490 nm em espectrofotômetro.

3.16 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro-padrão das médias.

Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das distribuições dos valores ou a variabilidade das medidas efetuadas. Foram aplicados os seguintes testes.

Análise de variância para as medidas repetidas foi aplicada para comparar as médias de peso corporal e de pressão arterial de cauda nos vários períodos em cada grupo experimental. Esta análise intra-grupo foi aplicada, em separado, para cada um dos grupos, e, quando significativo, o teste Dunetts foi utilizado para definir as superposições e contrastes nos valores confrontados.

4. Resultados

4.1 Peso Corporal

Os animais dos cinco grupos experimentais apresentaram peso corporal semelhante, previamente ao estudo. O ganho de peso ponderal dos animais dos grupos CONTROLE, L-NAME, 2K1C, foram semelhantes ao final de oito semanas, porém, houve menor ganho ponderal nos grupos DIABETES e 2K1C+DIABETES.

Tabela 1. Evolução do peso corporal (g), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média).

GRUPOS	CONTROLE (n=10)	L-NAME (n=10)	2K1C (n=10)	DIABETE (n=10)	2K1C + DIABETE (n=10)
Basal	222 ± 3,1	228 ± 3,1	210 ± 3,7	214 ± 2,4	234 ± 4,4
2a. Semana	248 ± 5,2	248 ± 4,4	232 ± 1,1*	224 ± 2,2*	223 ± 6,1*
4a. Semana	276 ± 8,6	271 ± 3,4	264 ± 2,8	234 ± 2,6*	222 ± 7,5*
6a. Semana	287 ± 4,6	292 ± 3,6	306 ± 1,0*	243 ± 3,3*	229 ± 8,1*
8a. Semana	347 ± 10	304 ± 3,5*	351 ± 3,0	249 ± 2,9*	238 ± 8,4*

ANOVA para medidas repetidas

*p<0,05 vs BASAL

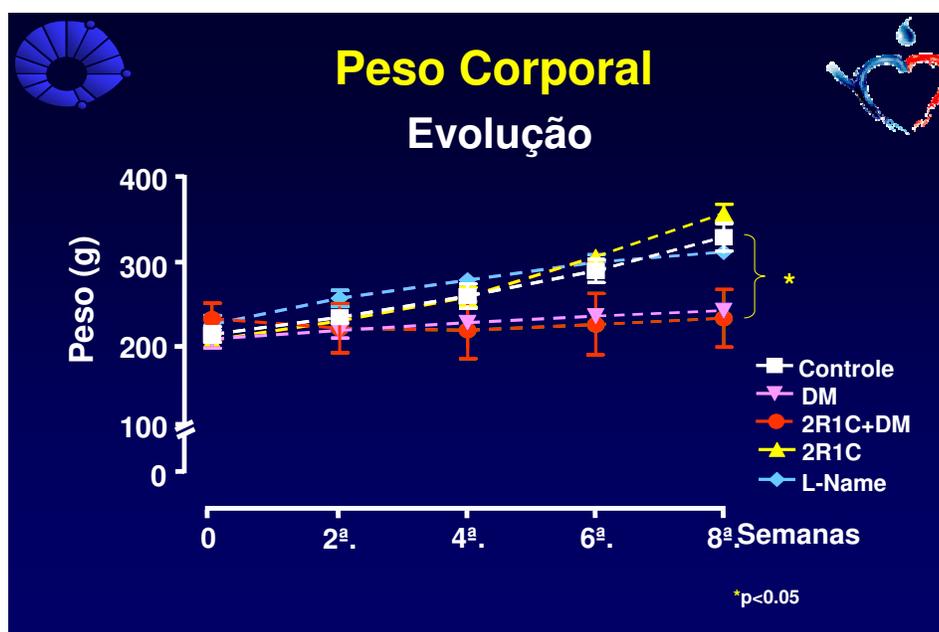


Figura 6: Evolução do peso corporal durante 8 semanas dos grupos; Controle, Diabetes mellitus (DM), 2 rins 1 clipe + diabetes mellitus (2R1C + DM), 2 rins 1 clipe (2R1C), inibidor de óxido nítrico (L-Name). Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, *P<0.05, #P<0.05 comparados ao controle.

4.2 Pressão arterial de cauda (PAC)

As medidas de pressão arterial do grupo CONTROLE (n=10), L-NAME (n=10), 2K1C (n=10), DIABETES (n=10) e 2K1C+DIABETES (n=10) foram semelhantes ao início do estudo. Todos os grupos experimentais apresentaram elevação da PAC progressivamente, a partir da 1ª semana (Figura 6), embora esse aumento tenha sido pouco acentuado para o grupo DIABETES. Novamente, ao final da 8ª. semana, os valores de PAC foram semelhantes aos basais neste grupo. Não foi observado diferença estatisticamente significante entre os valores de PAC dos grupos experimental L-NAME, 2K1C, 2K1C+DIABETES, ao final da 8ª.semana, que apresentaram tendência a maiores níveis de pressão que o grupo DIABETES.

Tabela 2. Evolução da pressão arterial de cauda (mmHg), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média ± Erro Padrão da Média)

GRUPOS	CONTROLE (n=10)	L-NAME (n=10)	2K1C (n=10)	DIABETE (n=10)	2K1C + DIABETE (n=10)
Basal	133 ± 1,7	132 ± 1,2	129 ± 1,9	129 ± 2,0	128 ± 1,7
2ª. Semana	132 ± 2,4	171 ± 0,9*	164 ± 2,4*	140 ± 1,0*	169 ± 1,6*
4ª. Semana	136 ± 1,6	172 ± 2,3*	164 ± 3,5*	143 ± 0,6*	171 ± 1,0*
6ª. Semana	138 ± 2,2	185 ± 4,5*	170 ± 4,3*	155 ± 2,3*	171 ± 1,2*
8ª. Semana	130 ± 1,7	211 ± 5,2*	171 ± 2,9*	156 ± 3,3*	173 ± 1,3*

ANOVA para medidas repetidas

*p<0,05 vs BASAL

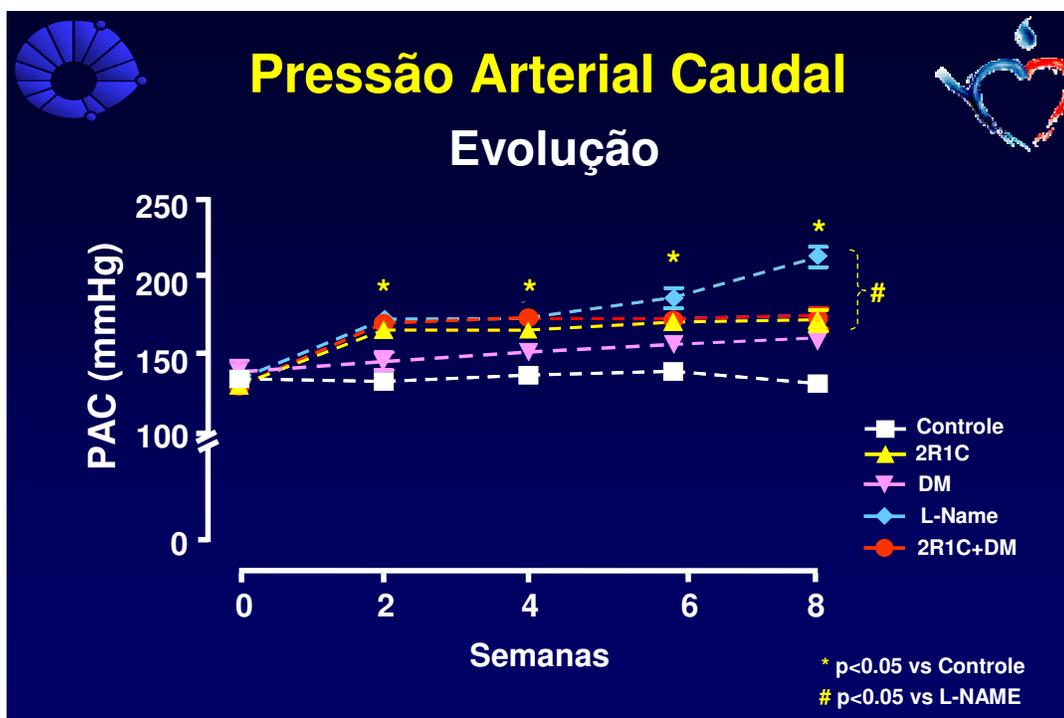


Figura 7: Evolução da pressão arterial de cauda durante oito semanas dos grupos; Controle, 2 rins 1 clipe (2R1C), diabetes mellitus (DM), inibidor de óxido nítrico (L-Name), 2 rins 1 clipe + diabetes mellitus (2R1C + DM) Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$ comparados ao controle.

4.3 Desenvolvimento da massa miocárdica e áreas de fibrose

Tabela 3. Desenvolvimento do peso corporal (Pcorp), do peso cardíaco total (PCT), do peso cardíaco relativo (PCRelat), do peso ventricular esquerdo (PVE), do peso ventricular esquerdo relativo (PVERelat), do peso ventricular direito (PVD), e do peso ventricular direito relativo (PVD Relat), expressos em microgramas. Médias \pm desvios padrão dos cinco grupos experimentais na 8ª. semana de estudo.

GRUPOS	CONTROLE (n=10)	2R1C (n=10)	DIABETE (n=10)	L-NAME (n=10)	2R1C+DIABETE (n=10)
Pcorp (g)	347 \pm 10	351 \pm 3,0	249 \pm 2,9*	304 \pm 3,5	238 \pm 8,4*
PCT (mg)	760 \pm 35	1000 \pm 90*	765 \pm 24	914 \pm 64	734 \pm 66
PCRelat (mg/g)	2,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,8	2,6 \pm 0,2	3,0 \pm 0,7
PVE (mg)	584 \pm 28	774 \pm 89	571 \pm 14	710 \pm 42	570 \pm 67
PVERelat (mg/g)	1,6 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,4	2,0 \pm 1,4	2,3 \pm 0,7
PVD (mg)	176 \pm 9	228 \pm 14*	204 \pm 21	195 \pm 12	164 \pm 17
PVDRelat (mg/g)	0,50 \pm 0,9	0,75 \pm 0,4	0,81 \pm 0,7	0,55 \pm 0,4	0,68 \pm 0,2

ANOVA para medidas independentes

* $p < 0,05$ vs Controle

Tabela 4. Medida dos diâmetros dos miócitos das três regiões do ventrículo esquerdo (subendocárdica, médio-miocárdica e subepicárdica) em (μm), nos cinco grupos experimentais durante o período de estudo (Média \pm Erro Padrão da Média).

GRUPOS	Controle (n=10)	RHR (n=10)	DM (n=10)	L-NAME (n=10)	RHR+DM (n=10)
Subendocárdio	12,3 \pm 0,2	18 \pm 0,6*	16,6 \pm 0,3*	19,9 \pm 1,4*	17,4 \pm 0,7*
Médiomiocárdio	10,7 \pm 0,3	14,9 \pm 0,2*	14,2 \pm 0,3*	15,4 \pm 0,3*	14,4 \pm 0,7*
Subepicárdio	11,9 \pm 0,3	16,6 \pm 0,6*	14,5 \pm 0,5*	16,6 \pm 0,4*	14,3 \pm 0,5*

ANOVA para medidas repetidas

*p<0,05 vs Controle

Tabela 5. Resultados das áreas de fibrose dos cinco grupos experimentais ao final do período de estudo (Média \pm Erro Padrão da Média).

GRUPOS	CONTROLE (n=10)	2R1C (n=10)	L-NAME (n=10)	DIABETE (n=10)	2R1C+DIABETE (n=10)
8a.Semana	0,045 \pm 0,004	0,36 \pm 0,17	0,46 \pm 0,13*	0,07 \pm 0,003	0,068 \pm 0,003

ANOVA para medidas repetidas:

*p<0.05 vs Controle

4.4 Pressão arterial média (PAM)

O resultado de PAM esta representado pelo gráfico, os grupos: 2k1C, L-NAME e 2k1C+DIABETE, apresentaram aumento significativo em relação ao grupo CONTROLE e DIABETES antes da administração da noradrenalina. Após a administração da noradrenalina o grupo L-NAME apresentou aumento significativo em relação ao grupo Controle. Os grupos 2K1C, DIABETES e 2K1C+DIABETES não mostraram diferença em relação ao grupo CONTROLE.

Pressão Arterial Média

8ª. Semana

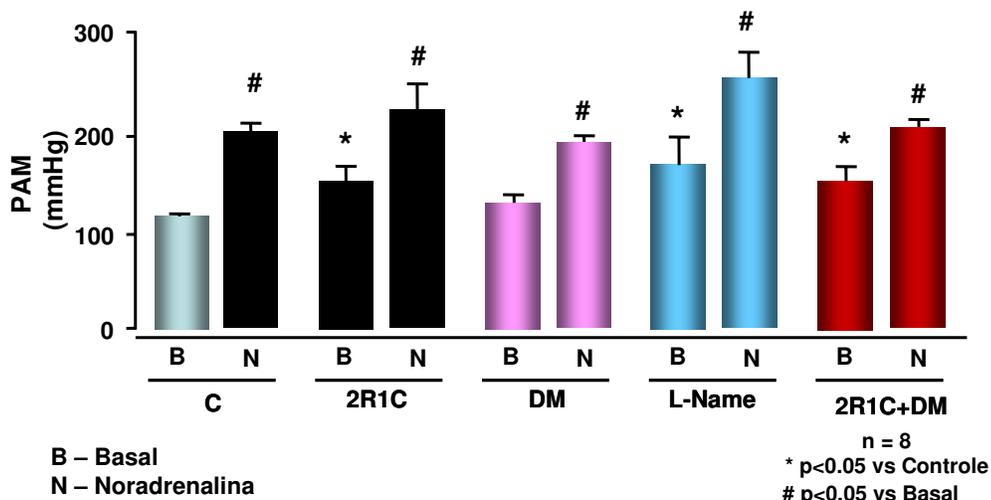


Figura 8: Avaliação Pressão Arterial Média (PAM) mmHg depois de 8 semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-Name, 2R1C + DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, *P < 0.05, #P < 0.05 comparados ao controle.

4.5 Débito cardíaco (DC)

Os resultados do DC dos grupos 2K1C, L-NAME, DIABETES e 2K1C+DIABETES, apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo CONTROLE antes da administração de noradrenalina. Após a administração de noradrenalina, todos os grupos experimentais apresentaram diminuição do DC em relação ao CONTROLE.

Fluxo Aórtico

8^a. Semana

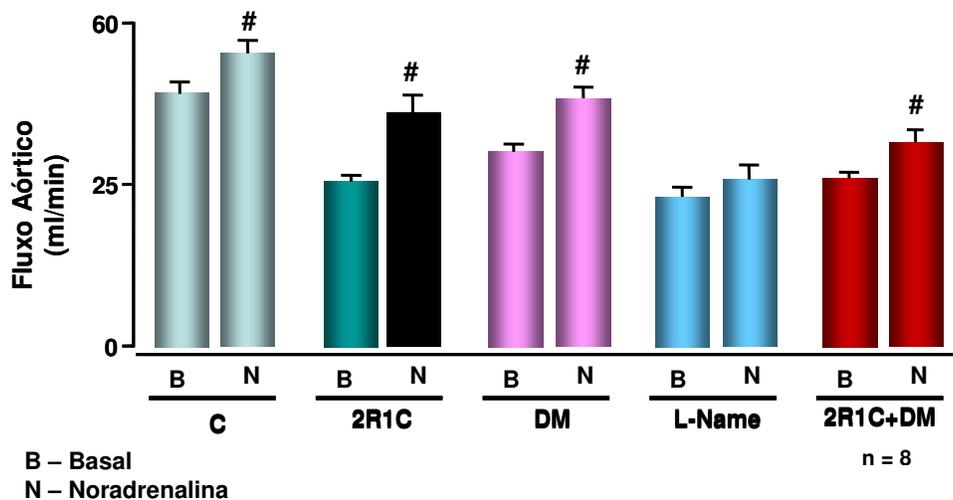


Figura 9: Avaliação do Fluxo Aórtico depois de oito semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; controle, 2R1C, DM, L-Name e 2R1C + DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, #P<0.05 vs basal comparados ao controle.

4.6 Resistência periférica total (RPT)

Os resultados da RPT dos grupos 2K1C, L-NAME, DIABETES e 2K1C+DIABETES, apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo CONTROLE sem administração de noradrenalina (basal). Após a administração de noradrenalina os grupos; 2k1C, L-NAME, DIABETES, 2K1C+DIABETES, apresentaram aumento significativo em relação ao grupo CONTROLE.

Resistência Periférica Total

8^a. Semana

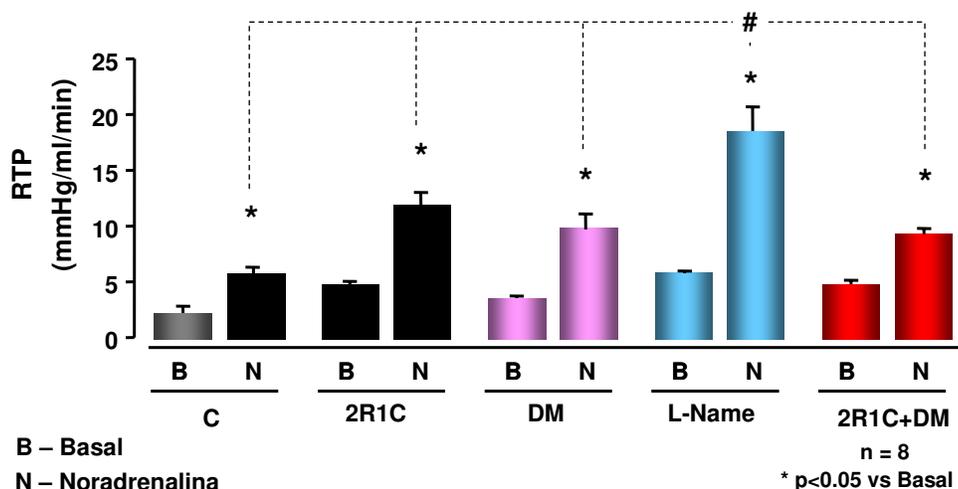


Figura 10: Avaliação da Resistência Periférica Total depois de oito semanas, utilizando Noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-Name e 2R1C + DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, *P < 0.05, vs basal comparados ao controle.

4.7 Freqüência cardíaca (FC)

Os resultados da FC dos grupos experimentais no basal não apresentaram diferença entre o grupo CONTROLE. Após ter administrado Noradrenalina, houve um aumento da FC em todos os grupos estudados.

Frequência Cardíaca

8^a. Semana

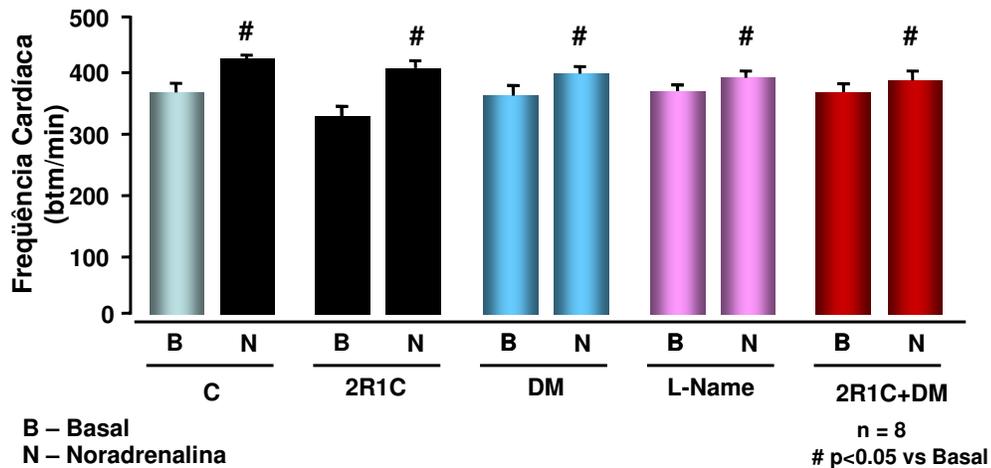


Figura 11: Avaliação da frequência cardíaca depois de oito semanas, utilizando Noradrenalina nos seguintes grupos; Controle, 2R1C, DM, L-Name, 2R1C+DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, *P < 0.05, #P < 0.05 comparados ao controle.

4.8 Coração isolado

4.8.1 - dP/dT +

Os valores de dP/dT + dos grupos DIABETES e 2K1C+DIABETES apresentam uma diminuição em relação ao grupo CONTROLE, os grupos L-NAME e 2K1C não apresentaram diferenças entre o grupo CONTROLE.

dP/dT + Coração Isolado - 8^a. Semana

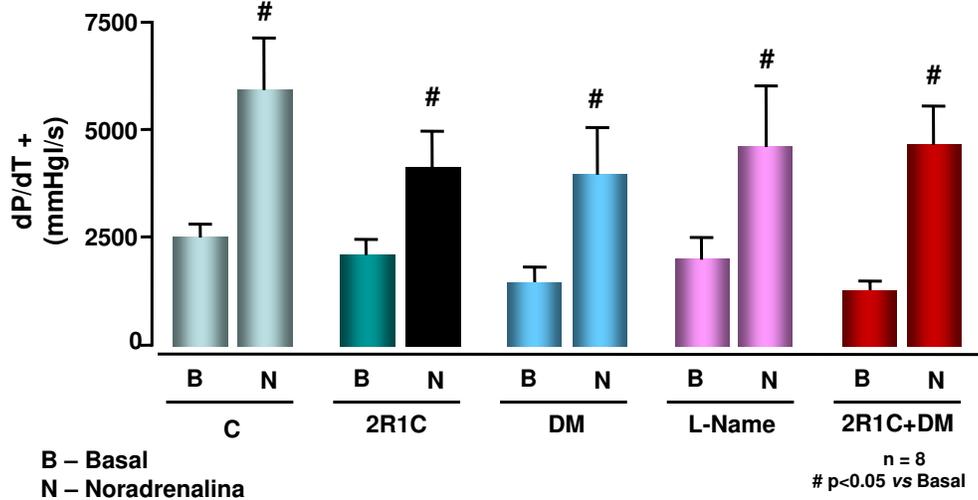


Figura 12: Avaliação do coração isolado depois 8 semanas na derivada de pressão/ pela derivada de tempo (dP/dT) sistólica utilizando noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-Name e 2R1C + DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, #P<0.06 vs basal comparados ao controle.

4.8.2 dP/dT –

Os resultados da dP/dT – dos grupos; 2K1C, L-NAME, DIABETES e 2K1C+DIABETES apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo CONTROLE.

dP/dT - Coração Isolado - 8^a. Semana

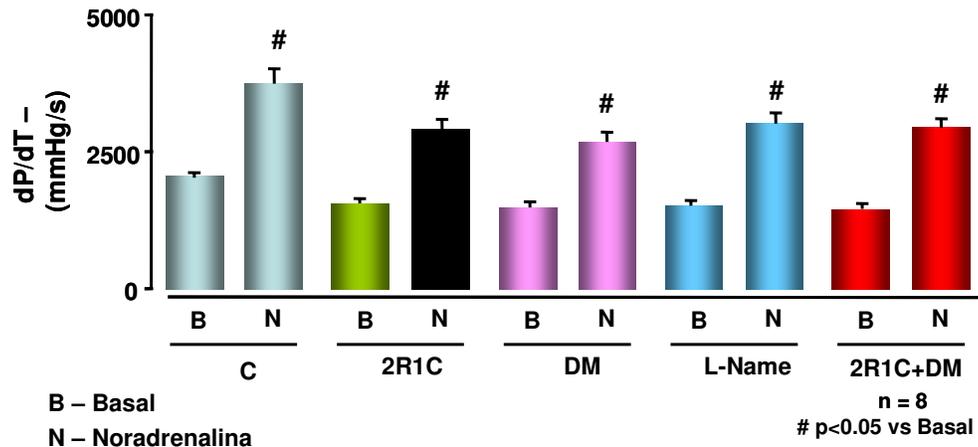


Figura 13: Avaliação do coração isolado depois de 8 semanas na derivada de pressão/ pela derivada de tempo (dP/dT) diastólica utilizando noradrenalina nos grupos; Controle, 2R1C, DM, L-Name e 2R1C+DM. Dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA, com teste a posteriori de Dunnett, #P<0.05 vs basal comparados ao controle.

5. Discussão

O presente estudo mostra claramente que, a hipertensão arterial renovascular associada ao diabetes tipo I, assemelha-se às anormalidades morfológicas observadas na cardiomiopatia induzida por L-NAME, não há similaridade nestes modelos animais no que tange a pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT).

No presente estudo, foi comparado o desempenho cardiovascular através da avaliação hemodinâmica em ratos anestesiados, bem como em corações isolados, inibindo de forma crônica a síntese de NO e investigando através dos modelos animais a hipertensão-diabética e renovascular. Foi hipotetizado que, uma vez provocadas às alterações cardiovasculares, os parâmetros avaliados poderiam ser similares, como previamente demonstrado por achados histopatológicos nestas cardiomiopatias (Sampaio *et al.*, 2002). Além disso, comparando a cardiomiopatia hipertensiva-diabética severa após a indução da inibição da NO sintase, o desenho experimental possibilitou investigar outros mecanismos hemodinâmicos associados à redução da biodisponibilidade de NO no coração e nos tecidos vasculares.

A pressão arterial caudal (PAC) aumentou igualmente, após duas semanas de tratamento, nos grupos 2R1C+DM e L-NAME. Estes valores estão em acordo com a PAM medida após a oitava semana. Também, uma redução significativa do DC foi observada em ambos os grupos ao final do estudo. Conseqüentemente, como esperado, nos grupos L-NAME e 2R1C+DM a RVPT aumentou. Os resultados da pressão arterial não-invasiva e da PAM poderiam caracterizar ambos os modelos por hipertensão arterial e redução do DC.

Usando o coração isolado, uma importante redução no dP/dT positiva foi observada no grupo 2R1C+DM e uma redução não muito significativa, quando comparada com o grupo L-NAME, tal situação pode ser interpretada como uma sustentação parcial da contratilidade miocárdica, tendo em vista que o enchimento cardíaco estava controlado; não houve diferenças significativas na frequência cardíaca em relação aos grupos estudados. Em ambos os grupos o relaxamento diastólico (dP/dT) apresentou-se significativamente diminuído. O aumento na pré-carga no grupo hipertenso pode ter levado a uma hipertrofia ventricular, fibrose e

isquemia. Esses três fatores, isolados ou associados, levam a um comprometimento no relaxamento do ventrículo esquerdo. A diminuição na distensibilidade diastólica do ventrículo esquerdo (aumento da pressão diastólica e para qualquer nível de volume diastólico) pode não somente elevar como alterar as propriedades elásticas decorrentes da fibrose ou aumento da massa muscular e também do desarranjo na dinâmica do relaxamento ventricular. Desta forma, o DC seria prejudicado devido a estas alterações na função ventricular diastólica através de uma redução no tempo de relaxamento isovolumétrico.

Assim, a redução do DC não pode ser justificada pelo leve comprometimento na contratilidade no grupo L-NAME ou pelo desequilíbrio da disfunção diastólica entre os dois grupos, uma explicação possível seria para os altos valores da RVPT encontrados no grupo L-NAME. Neste caso, a redução da biodisponibilidade de NO nas arteríolas e meta-arteríolas pode ser responsável pela intensa vasoconstrição e aumento na resistência ao fluxo sanguíneo (Sigmon *et al.*, 1998). Desta maneira, hipertensão associada a diabetes não impediriam o NO nos vasos sanguíneos assim como no grupo L-NAME.

No presente estudo, pode ser visto que as alterações histológicas no miocárdio foram, qualitativamente, parecidas no grupo L-NAME e no grupo 2R1C, ao passo que na análise quantitativa, foi evidenciada marcas e lesões mais extensas no grupo L-NAME. Estas diferenças histológicas sugerem que a gravidade do grupo L-NAME, induzido pelas lesões miocárdicas, eram semelhantes àquelas em ratos com diabetes mellitus associado à hipertensão (Sampaio *et al.*, 2002). Este fato é sustentado através da observação que, apesar da área total da lesão miocárdica ocasionada no grupo L-NAME ser diferente da lesão ocasionada no grupo 2R1C+DM, os múltiplos focos precoces de fibrose reparativa e necrose miocárdica observados após tratamento no grupo L-NAME parecem ser mais severas e extensas que as do grupo 2R1C+DM (Sampaio *et al.*, 2002). Os múltiplos focos de fibrose reparativa analisados depois do tratamento com L-NAME foram similares para todos aqueles descritos em estudos prévios (Moreno *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 2002). Entretanto, a inibição crônica na síntese de NO pode causar uma ativação

precoce dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes às lesões cardíacas precoces encontradas no grupo 2R1C+DM.

Como conhecido, o aumento da pressão arterial eleva o mecanismo de estresse dos miócitos cardíacos e vasculares e constitui um importante estímulo ao remodelamento cardiovascular. Entretanto, elevações nos níveis pressóricos não necessariamente levaram a resultados iguais nas respostas hipertróficas em modelos experimentais de hipertensão, sugerindo que outros mecanismos, além da sobrecarga pressórica, também são ativados. De fato, sugere-se que a hipertrofia esteja relacionada a fatores humorais, tais como as concentrações nos níveis plasmáticos de renina ou angiotensina II (Fredersdorf *et al.*, 2004; Sun, *et al.*, 2004), e não somente ao fator de sobrecarga mecânica (Matsubara, *et al.*, 1998). Além disso, a falta de uma resposta hipertrófica após tratamento com L-NAME pode ser explicada por uma limitação imposta ao crescimento ventricular, decorrente de uma perda acentuada de cardiomiócitos por apoptose após a inibição na síntese de NO (Pessanha *et al.*, 2000; Maejima *et al.*, 2003). Curiosamente, estudos demonstraram que diferentes doses de L-NAME produziram aumento da pressão sanguínea sistólica, que resultou em fibrose, que foi proporcional às doses administradas com L-NAME (Pechanova *et al.*, 1999). Deste modo, quanto maior for a inibição na síntese do NO mais severo poderá ser a lesão miocárdica nos ratos tratados com L-NAME, ou, quando DM e hipertensão renovascular estiverem associadas. Em conjunto, estes dados podem explicar as diferenças nos padrões hemodinâmicos observados no presente estudo experimental, baseados na biodisponibilidade de NO presente no coração e nos vasos sanguíneos.

Os níveis da proteína NOS3 encontram-se aumentados no tecido cardíaco dos ratos diabéticos provavelmente por decorrência do aumento do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia (Stockklauser-Farber *et al.*, 2000; Bojunga *et al.*, 2004). Embora os níveis da proteína NOS3 estivessem aumentados no tecido cardíaco do grupo 2R1C+DM, o tratamento com L-NAME acarretou em grande aumento da proteína NOS3 no tecido cardíaco. Curiosamente, a concentração plasmática de nitrato/nitrito diminuiu em ambos os grupos (L-NAME e 2R1C+DM), os quais apresentaram a maioria lesões miocárdicas severas (Sampaio *et al.*, 2002).

Apesar da relação entre os níveis séricos de nitrato/nitrito e produção de NO ainda não esteja clara (Moshage, 1997), estes resultados sugerem uma importante diminuição da biodisponibilidade de NO (Jungerten *et al.*, 1996) em ambos os grupos. De fato, ratos diabéticos apresentam resistência a acetilcolina, induzida pelo relaxamento aórtico, e produção de nitrito/nitrato, atribuído a um metabolismo anormal de NO (Kobayashi *et al.*, 2001). A redução na biodisponibilidade de NO causada por uma falta de substratos ou co-fatores pode levar a um desacoplamento da NOS3 ou aumento da degradação do NO por elementos reativos ao oxigênio (Hink *et al.*, 2001; Andrew e Mayer, 1999; Cai *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2003).

Concluindo, o presente estudo não sustenta inteiramente a hipótese inicial de que a disfunção cardiovascular encontrada na hipertensão renovascular na diabetes tipo 1 seria parecida àquelas induzidas pela inibição crônica de NO. A hipertensão renovascular associada a diabetes tipo 1 intensifica as anormalidades morfológicas e hemodinâmicas, mas não com a mesma intensidade das disfunções cardiovasculares proporcionadas pelo L-NAME. Novos estudos seriam necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos endoteliais nestes modelos.

6. Conclusões

Estes resultados indicam que a associação da hipertensão com diabetes, demonstram que, apesar das semelhanças morfológicas entre os grupos 2R1C+DM e L-NAME, este último não mimetizou as alterações hemodinâmicas dos modelos diabético-hipertenso renovascular associados com as alterações induzidas pelo L-NAME em ratos, o que sugere uma explicação para o óxido nítrico na fisiopatologia da cardiomiopatia na diabete e na hipertensão arterial.

7. Referências Bibliográficas

Abell, T. J.; Richards, A. M.; Ikram, H.; Espiner, E. A.; Yandle, T. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. **Biochem Biophys Res Commun**, 160: 1392-6, 1989.

Adler, S.; Huang, H.; Loke, K. E.; Xu, X.; Tada, H.; Laumas, A. et al. Endothelial nitric oxide synthase plays an essential role in regulation of renal oxygen consumption by NO. **Am J Physiol Renal Physiol**, 280: F838-43, 2001.

Aherne, W. Quantitative methods in histology. **J Med Lab Technol**, 27: 160-70, 1970.

Ames, J. B.; Dizhoor, A. M.; Ikura, M.; Palczewski, K.; Stryer, L. Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. **J Biol Chem**, 274: 19329-37, 1999.

Amin, A. R.; Attur, M.; Patel, R. N.; Thakker, G. D.; Marshall, P. J.; Rediske, J. et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. **J Clin Invest**, 99: 1231-7, 1997.

Amrani, M.; O'Shea, J.; Allen, N. J.; Harding, S. E.; Jayakumar, J.; Pepper, J. R. et al. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. **J Physiol**, 456: 681-7., 1992.

Andrew, P. J.; Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, 43: 521-31, 1999.

Arch, 437: 667-74, 2000

Armour, K. E.; Armour, K. J.; Gallagher, M. E.; Godecke, A.; Helfrich, M. H.; Reid, D. M. et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrinology**, 142: 760-6, 2001.

Arnal, J. F.; El Amrani, A. I.; Chatellier, G.; Menard, J.; Michel, J. B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**, 22: 380-7, 1993.

Arnal, J. F.; Warin, L.; Michel, J. B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. **J Clin Invest**, 90: 647-52, 1992.

Arora, R. R.; Timoney, M.; Melilli, L. Acute myocardial infarction after the use of sildenafil. **N Engl J Med**, 341: 700., 1999.

Assender, J. W.; Southgate, K. M.; Hallett, M. B.; Newby, A. C. Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. **Biochem J**, 288 (Pt 2): 527-32, 1992.

Avontuur, J. A.; Buijk, S. L.; Bruining, H. A. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur J Clin Pharmacol*, 54: 627-31, 1998.

Babal, P.; Pechanova, O.; Bernatova, I.; Stvrtina, S. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. **Histol Histopathol**, 12: 623-9, 1997.

Balligand, J. L.; Kelly, R. A.; Marsden, P. A.; Smith, T. W.; Michel, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 347-51, 1993.

Balligand, J. L.; Kobzik, L.; Han, X.; Kaye, D. M.; Belhassen, L.; O'Hara, D. S. et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, 270: 14582-6, 1995.

Baylis, C.; Mitruka, B.; Deng, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J Clin Invest**, 90: 278-81, 1992.

Beavo, Ja. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol**, 75: 725-48, 1995.

Bedarida, G. V.; Kim, D.; Blaschke, T. F.; Hoffman, B. B. Characterization of an inhibitor of nitric oxide synthase in human-hand veins. **Horm Metab Res**, 26: 109-12, 1994.

Bernatova, I.; Pechanova, O.; Kristek, F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. **Jpn J Pharmacol**, 81: 99-106, 1999.

Bernatova, I.; Pechanova, O.; Sinko, F. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. **Exp Physiol**, 84: 1095-105, 1999.

Berthet, J.; Sutherland, E. W.; Rall, T. W. The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. **J Biol Chem**, 229: 351-61, 1957.

Beverelli, F.; Bea, M. L.; Puybasset, L.; Giudicelli, J. F.; Berdeaux, A. Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. **Fundam Clin Pharmacol**, 11: 252-9, 1997.

Biel, M.; Zong, X.; Ludwig, A.; Sautter, A.; Hofmann, F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 135: 151-71, 1999.

Biffi, W. L.; Moore, E. E.; Moore, F. A.; Barnett, C. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. **J Surg Res**, 63: 328-32, 1996.

Bkaily, G.; Sperelakis, N. Injection of guanosine 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels. **Am J Physiol**, 248: H745-9, 1985.

Blair, A.; Shaul, P. W.; Yuhanna, I. S.; Conrad, P. A.; Snart, E. J. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. **J Biol Chem**, 274: 32512-9, 1999.

Boerth, N. J.; Dey, N. B.; Cornwell, T. L.; Lincoln, T. M. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. **J Vasc Res**, 34: 245-59, 1997.

Boger, R. H.; Bode-Boger, S. M.; Gerecke, U.; Frolich, J. C. Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. **Cardiovasc Res**, 28: 494-9, 1994.

Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, Kusterer K, Zeuzem S. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. **Biochem Biophys Res Commun**, 316: 771-80, 2004

Bolotina, V. M.; Najibi, S.; Palacino, J. J.; Pagano, P. J.; Cohen, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-3, 1994.

Bornfeldt, K. E.; Graves, L. M.; Raines, E. W.; Igarashi, Y.; Wayman, G.; Yamamura, S. et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. **J Cell Biol**, 130: 193-206, 1995.

Brady, T. C.; Chang, L. Y.; Day, B. J.; Crapo, J. D. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. **Am J Physiol**, 273: L1002-6, 1997.

Braunwald, E.; Bristow, M. R. Congestive heart failure: fifty years of progress. **Circulation**, 102: IV14-23, 2000.

Brede, M.; Roell, W.; Ritter, O.; Wiesmann, F.; Jahns, R.; Haase, A. et al. Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. **Hypertension**, 42: 1177-82, 2003.

Brouillet, E.; Roeda, D.; Valette, H.; Fuseau, C.; Guyot, M. C.; Crouzel, C. In vivo metabolites of N omega-nitro-L-arginine methyl ester: methanol and N omega-nitro-L-arginine. **Eur J Pharmacol**, 293: 487-90, 1995.

Brune, B.; Sandau, K.; Von Knethen, A. Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. **Biochemistry (Mosc)**, 63: 817-25, 1998.

Brune, B.; Von Knethen, A.; Sandau, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur J Pharmacol**, 351: 261-72, 1998.

Buga, G. M.; Gold, M. E.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. **Hypertension**, 17: 187-93, 1991.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, 87: 840-4, 2000

Chao, C.; Madeddu, P.; Wang, C.; Liang, Y.; Chao, L.; Chao, J. Differential regulation of kallikrein, kininogen, and kallikrein-binding protein in arterial hypertensive rats. **Am J Physiol**, 271: F78-86, 1996.

Chen, L. Y.; Mehta, J. L. Downregulation of nitric oxide synthase activity in human platelets by nitroglycerin and authentic nitric oxide. **J Investig Med**, 45: 69-74, 1997.

Chinkers, M.; Garbers, D. L. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. **Science**, 245: 1392-4, 1989.

Clancy, R. M.; Leszczynska-Piziak, J.; Abramson, S. B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J Clin Invest**, 90: 1116-21, 1992.

Coelho-Filho, O. R.; De Luca, I. M.; Tanus-Santos, J. E.; Cittadino, M.; Sampaio, R. C.; Coelho, O. R. et al. Pravastatin reduces myocardial lesions induced by acute inhibition of nitric oxide biosynthesis in normocholesterolemic rats. **Int J Cardiol**, 79: 215-21, 2001.

Corbin, J. D. and Francis, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J Biol Chem**, 274: 850-3, 1994

Craven, P. A.; Derubertis, F. R. Effects of thiol inhibitors on hepatic guanylate cyclase activity. **Biochim Biophys Acta**, 524: 231-44, 1978.

Cunha, R. S.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **Am J Hypertens**, 6: 806-9, 1993.

Curran, R. D.; Ferrari, F. K.; Kispert, P. H.; Stadler, J.; Stuehr, D. J.; Simmons, R. L. et al. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. **Faseb J**, 5: 2085-92, 1991.

Dachman, W. D.; Ford, G. A.; Blaschke, T. F.; Hoffman, B. B. Mechanism of bradykinin-induced venodilation in humans. **J Cardiovasc Pharmacol**, 21: 241-8, 1993.

De Oliveira, C. F.; Nathan, L. P.; Metze, K.; Moreno, H., JR.; De Luca, I. M.; Sucupira, M. et al. Effect of Ca²⁺ channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. **Eur J Pharmacol**, 373: 195-200, 1999.

Delacretaz, E.; Hayoz, D.; Osterheld, M. C.; Genton, C. Y.; Brunner, H. R.; Waeber, B. Long-term nitric oxide synthase inhibition and distensibility of carotid artery in intact rats. **Hypertension**, 23: 967-70, 1994.

Deng, L. Y.; Thibault, G.; Schiffrin, E. L. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. **Clin Exp Hypertens**, 15: 527-37, 1993.

Denninger, J. W.; Marlatta, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, 1411: 334-50, 1999.

Dey, N. B.; Boerth, N. J.; Murphy-Ullrich, J. E.; Chang, P. L.; Prince, C. W.; Lincoln, T. M. Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells. **Circ Res**, 82: 139-46, 1998.

Dickinson, N. T.; Jang, E. K.; Haslam, R. J. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. **Biochem J**, 323 (Pt 2): 371-7, 1997.

Dubey, R. K.; Jackson, E. K.; Luscher, T. F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. **J Clin Invest**, 96: 141-9, 1995.

Eshima, K.; Hirooka, Y.; Shigematsu, H.; Matsuo, I.; Koike, G.; Sakai, K. et al. Angiotensin in the nucleus tractus solitarius contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**, 36: 259-63, 2000.

Feil, R.; Lohmann, S. M.; De Jonge, H.; Walter, U.; Hofmann, F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. **Circ Res**, 93: 907-16, 2003.

Fin, C.; Da Cunha, C.; Bromberg, E.; Schmitz, P. K.; Bianchin, M.; Medina, J. H. et al. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. **Neurobiol Learn Mem**, 63: 113-5, 1995.

Fiorino, P. Participação dos nervos renais no curso temporal da hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese de óxido nítrico: avaliações hemodinâmicas, bioquímicas e moleculares. São Paulo, 2004. (Tese - Doutorado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina).

Forstermann, U.; Mulsch, A.; Bohme, E.; Busse, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circ Res**, 58: 531-8, 1986.

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

Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griesse DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. **Cardiovasc Pathol**. 13 :11-9, 2004

Furuya, M.; Yoshida, M.; Hayashi, Y.; Ohnuma, N.; Minamino, N.; Kangawa, K. et al. C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 177: 927-31, 1991.

Garbers, D. L. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. **Cell**, 71: 1-4, 1992.

Garbers, D. L.; Lowe, D. G. Guanylyl cyclase receptors. **J Biol Chem**, 269: 30741-4, 1994.

Gardes, J.; Gonzales, M. F.; Alhenc-Gelas, F.; Menard, J. Influence of sodium diet on L-NAME effects on renin release and renal vasoconstriction. **Am J Physiol**, 267: F798-804, 1994.

Gardiner, S. M.; Compton, A. M.; Bennet, T.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. **Br J Pharmacol**, 101: 10-2, 1990.

Garg, U. C.; Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, 83: 1774-7, 1989.

Gaton, D. D.; Sagara, T.; Lindsey, J. D.; Weinreb, R. N. Matrix metalloproteinase-1 localization in the normal human uveoscleral outflow pathway. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 40: 363-9, 1999.

Gonzalez, W.; Fontaine, V.; Pueyo, M. E.; Laquay, N.; Messika-Zeitoun, D.; Philippe, M. et al. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. **Hypertension**, 36: 103-9, 2000.

Griffith, O. W.; Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, 57: 707-36, 1995.

Gross, S. S.; Stuehr, D. J.; Aisaka, K.; Jaffe, E. A.; Levi, R.; Griffith, O. W. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. **Biochem Biophys Res Commun**, 170: 96-103, 1990.

Gross, S. S.; Wolin, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, 57: 737-69, 1995.

Guo, K.; Andres, V.; Walsh, K. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, 97: 2066-72, 1998.

Hackenthal, E.; Paul, M.; Ganten, D.; Taugner, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol Rev**, 70: 1067-116, 1990.

Hamad, A. M.; Clayton, A.; Islam, B.; Knox, A. J. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 285: L973-83, 2003.

Han, X.; Shimoni, Y.; Giles, W. R. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. **J Gen Physiol**, 106: 45-65, 1995.

Hardman, J. G. Cyclic nucleotides and regulation of vascular smooth muscle. **J Cardiovasc Pharmacol**, 6: S639-45., 1984.

Hardman, J. G.; Sutherland, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **J Biol Chem**, 244: 6363-70, 1969.

Hecker, M.; Cattaruzza, M.; Wagner, A. H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **Gen Pharmacol**, 32: 9-16, 1999.

Hemmens, B.; Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods Mol Biol**, 100: 1-32, 1998.

Herity, N. A.; Allen, J. D.; Silke, B.; Adgey, A. A. Comparison of the ability of nicardipine, theophylline and zaprinast to restore cardiovascular haemodynamics following inhibition of nitric oxide synthesis. **Br J Pharmacol**, 112: 423-8, 1994.

Hille, R.; Olson, J. S.; Palmer, G. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. **J Biol Chem**, 254: 12110-20, 1979.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res**, 88: E14-22, 2001

Holecyova, A.; Torok, J.; Bernatova, I.; Pechanova, O. Restriction of nitric oxide rather than elevated blood pressure is responsible for alterations of vascular responses in nitric oxide-deficient hypertension. **Physiol Res**, 45: 317-21, 1996.

Houslay, M. D.; Kolch, W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. **Mol Pharmacol**, 58: 659-68, 2000.

Huang, M.; Manning, R. D., JR.; Leblanc, M. H.; Hester, R. L. Overall hemodynamic studies after the chronic inhibition of endothelial-derived nitric oxide in rats. **Am J Hypertens**, 8: 358-64, 1995.

- Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**, 100: 113-27, 2000.
- Iadecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci**, 20: 132-9, 1997.
- Ichiki, T.; Usui, M.; Kato, M.; Funakoshi, Y.; Ito, K.; Egashira, K. et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. **Hypertension**, 31: 342-8, 1998.
- Ignarro, L. J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. **Pharmacol Toxicol**, 67: 1-7, 1990.
- Ignarro, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem Pharmacol**, 41: 485-90, 1991.
- Ignarro, L. J.; Adams, J. B.; Horwitz, P. M.; Wood, K. S. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **J Biol Chem**, 261: 4997-5002, 1986.
- Irigoyen, M. C.; Moreira, E. D.; Cestari, I. A.; Krieger, E. M. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. **Braz J Med Biol Res**, 24: 219-22, 1991.
- Ishikawa, E.; Ishikawa, S.; Davis, J. W.; Sutherland, E. W. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. **J Biol Chem**, 244: 6371-6, 1969.
- Jackson, G. Phosphodiesterase 5 inhibition: effects on the coronary vasculature. **Int J Clin Pract**, 55: 183-8., 2001.
- Jahnsen, T.; Hedin, L.; Kidd, V. J.; Beattie, W. G.; Lohmann, S. M.; Walter, U. et al. Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II

cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. **J Biol Chem**, 261: 12352-61, 1986.

Jover, B.; Herizi, A.; Ventre, F.; Dupont, M.; Mimran, A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. **Hypertension**, 21: 944-8, 1993.

Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. **Clin Physiol**, 16: 369-79, 1996

Kaji, T.; Inada, M.; Yamamoto, C.; Fujiwara, Y.; Koizumi, F. Cyclic AMP-dependent pathway that mediates suppressive regulation of glycosaminoglycan production in cultured vascular endothelial cells. **Thromb Res**, 82: 389-97, 1996.

Kanno, S.; Wu, Y. J.; Lee, P. C.; Billiar, T. R.; HO, C. Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation**, 104: 945-50, 2001.

Kariya, K.; Kawahara, Y.; Araki, S.; Fukuzaki, H.; Takai, Y. Antiproliferative action of cyclic GMP-elevating vasodilators in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, 80: 143-7, 1989.

Kassab, S.; Millaer, M. T.; Hester, R.; Novak, J.; Granger, J. P. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. **Hypertension**, 31: 315-20, 1998.

Katz, A. M. Cardiac ion channels. **N Engl J Med**, 328: 1244-51, 1993.

Kawada, N.; Kuroki, T.; Uoya, M.; Inoque, M.; Kobayashi, K. Smooth muscle alpha-actin expression in rat hepatic stellate cell is regulated by nitric oxide and cGMP production. **Biochem Biophys Res Commun**, 229: 238-42, 1996.

Keh, D.; Gerlach, M.; Kurer, I.; Seiler, S.; Kerner, T.; Falke, K. J. et al. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 7: 615-24, 1996.

Kelm, M.; Schrader, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. **Circ Res**, 66: 1561-75, 1990.

Khatsenko, O. Interactions between nitric oxide and cytochrome P-450 in the liver. **Biochemistry (Mosc)**, 63: 833-9, 1998.

Kilo, S.; Berghoff, M.; Hilz, M.; Freeman, R. Neural and endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. **Neurology**, 54: 1246-52, 2000.

Knoblich, P. R.; Freeman, R. H.; Villarreal, D. Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. **Hypertension**, 28: 738-42, 1996.

Kobayashi T, Kamata K. Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats. **Atherosclerosis**, 155: 313-20, 2001

Koesling, D.; Bohme, E.; Schultz, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. **Faseb J**, 5: 2785-91, 1991.

Kojda, G.; Kottenberg, K.; Nix, P.; Schluter, K. D.; Piper, H. M.; Noack, E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. **Circ Res**, 78: 91-101, 1996.

Koo JR, Vaziri ND. Effects of diabetes, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. **Kidney Int**, 63: 195-201, 2003.

Koyama, H.; Bornfeldt, K. E.; Fukumoto, S.; Nishizawa, Y. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. **J Cell Physiol**, 186: 1-10., 2001.

Koyanagi, M.; Egashira, K.; Kubo-Inque, M.; Usui, M.; Kitamoto, S.; Tomita, H. et al. Role of transforming growth factor-beta1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Hypertension**, 35: 86-90, 2000.

Krejcy, K.; Schwarzacher, S.; Raberger, G. Distribution and metabolism of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L-arginine methylester in canine blood in vitro. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 347: 342-5, 1993.

Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin Exp Immunol**, 113: 147-56, 1998.

Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 4651-5, 1991.

Kuhlencordt, P. J.; Gyurko, R.; Han, F.; Scherrer-Crosbie, M.; Aretz, T. H.; Hajjar, R. et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. **Circulation**, 104: 448-54, 2001.

Kupatt, C.; Weber, C.; Wolf, D. A.; Becker, B. F.; Smith, T. W.; Kelly, R. A. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 2599-609, 1997.

Kurtz, A.; Wagner, C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. **Am J Physiol**, 275: F849-62, 1998.

Lala, P. K.; Al-Mutter, N.; Orucevic, A. Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice. **Int J Cancer**, 73: 371-80, 1997.

Langan, T. A. Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. **Science**, 162: 579-80, 1968.

Laycock, S. K.; Vogel, T.; Forfia, P. R.; Tuzman, J.; Xu, X.; Ochoa, M. et al. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. **Circ Res**, 82: 1263-71, 1998.

Lee, J.; Kim, S.; Jung, M.; Oh, Y.; Kim, S. W. Altered expression of vascular natriuretic peptide receptors in experimental hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 29: 299-303, 2002.

Lee, P. C.; Salyapongse, A. N.; Bragdon, G. A.; Shears, L. L., N; Watkins, S. C.; Edington, H. D. et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. **Am J Physiol**, 277: H1600-8, 1999.

Lee, S. D.; Kim, D. S.; Shim, T. S.; Lim, C. M.; Koh, Y.; Kim, W. S. et al. Nitric oxide and molsidomine in the management of pulmonary hypertension in Takayasu's arteritis. **Chest**, 119: 302-7, 2001.

Lefer, A. M.; Lefer, D. J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovasc Res**, 32: 743-51, 1996.

Lewis, M. J.; Shah, A. M.; Smith, J. A.; Henderson, A. H. Does endocardium modulate myocardial contractile performance? **Cardioscience**, 1: 83-7, 1990.

Li, J. S.; Schiffrin, E. L. Resistance artery structure and neuroeffector mechanisms in hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthase. **Am J Hypertens**, 7: 996-1004, 1994.

Lincoln, T. M.; Komalavilas, P.; Boerth, N. J.; Macmillan-Crow, L. A.; Cornwell, T. L. cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. **Adv Pharmacol**, 34: 305-22, 1995.

Lloyd-Jones, D. M.; Bloch, K. D. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. **Annu Rev Med**, 47: 365-75, 1996.

Loesberg, C.; Van Wijk, R.; Zandbergen, J.; Van Aken, W. G.; Van Mourik, J. A.; De Groot, P. G. Cell cycle-dependent inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by prostaglandin E1. **Exp Cell Res**, 160: 117-25, 1985.

Lohmann, S. M.; Fischmeister, R.; Walter, U. Signal transduction by cGMP in heart. **Basic Res Cardiol**, 86: 503-14., 1991.

Lohmann, S. M.; Vaandrager, A. B.; Smolenski, A.; Walter, U.; De Jonge, H. R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends Biochem Sci**, 22: 307-12, 1997.

Loughney, K.; Hill, T. R.; Florio, V. A.; Uher, L.; Rosman, G. J.; Wolda, S. L. et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Gene**, 216: 139-47, 1998.

Maejima Y, Adachi S, Ito H, Nobori K, Tamamori-Adachi M, Isobe M. Nitric oxide inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by modulating cyclin A-associated kinase activity. **Cardiovasc**

Mahmud, A.; Hennessy, M.; Feely, J. Effect of sildenafil on blood pressure and arterial wave reflection in treated hypertensive men. **J Hum Hypertens**, 15: 707-13, 2001.

Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LA, Franco M, Janicki JS. Left

Matsuoka, H.; Nishida, H.; Nomura, G.; Van Vliet, B. N.; Toshima, H. Hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition is renal nerve dependent. **Hypertension**, 23: 971-5, 1994.

Mcallister-Lucas, L. M.; Haik, T. L.; Colbran, J. L.; Sonnenburg, W. K.; Seger, D.; Turko, I. V. et al. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, 270: 30671-9, 1995.

Mehegan, J. P.; Muir, W. W.; Unverferth, D. V.; Fertel, R. H.; Mcguirk, S. M. Electrophysiological effects of cyclic GMP on canine cardiac Purkinje fibers. **J Cardiovasc Pharmacol**, 7: 30-5, 1985.

Mehta, P. M.; Alker, K. J.; Kloner, R. A. Functional infarct expansion, left ventricular dilation and isovolumic relaxation time after coronary occlusion: a two-dimensional echocardiographic study. **J Am Coll Cardiol**, 11: 630-6, 1988.

Mery, P. F.; Lohmann, S. M.; Walter, U.; Fischmeister, R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 1197-201, 1991.

Mezoff, A. G.; Giannella, R. A.; Eade, M. N.; Cohen, M. B. Escherichia coli enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. **Gastroenterology**, 102: 816-22, 1992.

Michelson, A. D.; Benoit, S. E.; Furman, M. I.; Breckwoldt, W. L.; Rohrer, M. J.; Barnard, M. R. et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. **Am J Physiol**, 270: H1640-8, 1996.

Mohan, P.; Brutsaert, D. L.; Paulus, W. J.; SYS, S. U. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. **Circulation**, 93: 1223-9, 1996.

Mohan, P.; Sys, S. U.; Brutsaert, D. L. Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. **Int J Cardiol**, 50: 233-7., 1995.

Moncada, S.; Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 329: 2002-12., 1993.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43: 109-42., 1991.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, 12: 365-72, 1988.

Moncada, S.; Radomski, M. W.; Palmer, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol**, 37: 2495-501, 1988.

Moore, P. K.; Al-Swayeh, O. A.; Chong, N. W.; Evans, R. A.; Gibson, A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. **Br J Pharmacol**, 99: 408-12, 1990.

Moore, P. K.; Oluyomi, A. O.; Babbedge, R. C.; Wallace, P.; Hart, S. L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol**, 102: 198-202, 1991.

Moreno Junior, H.; Metze, K.; Zatz, R.; De Nucci, G. Chronic nitric oxide blockade causes cardiac ischaemia but not cardiac hypertrophy: An experiment of four weeks in rats. **Verh Dtsch Ges Path**, 78: 459, 1994.

Moreno, H., Jr.; Metze, K.; Bento, A. C.; Antunes, E.; Zatz, R.; De Nucci, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Res Cardiol**, 91: 248-55, 1996.

Moreno, H., Jr.; Piovesan Nathan, L.; Pereira Costa, S. K.; Metze, K.; Antunes, E.; Zatz, R. et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur J Pharmacol**, 287: 93-6, 1995.

Moreno, H.; Metze, K.; Antunes, E.; Zatz, R.; De Nucci, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Bas Res Cardiol**, 91: 248-55, 1996.

Moreno, H.; Nathan, L. P.; Metze, K.; Costa, S. K. P.; Antunes, E.; Hyslop, S. et al. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 25: 349-52, 1997.

Moshage H. Nitric oxide determinations: much ado about NO.-thing? **Clin Chem**, 43: 553-6, 1997

Muirhead, G. J.; Wilner, K.; Colburn, W.; Haug-Pihale, G.; Rouviex, B. The effects of age and renal and hepatic impairment on the pharmacokinetics of sildenafil. **Br J Clin Pharmacol**, 53 Suppl 1: 21S-30S, 2002.

Mulsch, A.; Busse, R. NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 341: 143-7, 1990.

Nadal-Ginard, B.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. **Circ Res**, 92: 139-50, 2003.

Nakaki, T.; Nakayama, M.; Kato, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol**, 189: 347-53, 1990.

Nakatsu, K.; Diamond, J. Role of cGMP in relaxation of vascular and other smooth muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, 67: 251-62., 1989.

Nawrath, H. Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart? **Nature**, 267: 72-4, 1977.

nitric oxide synthesis inhibition on cardiomyocytes number. **Virchows**

Numaguchi, K.; Egashira, K.; Takemoto, M.; Kadokami, T.; Shimokawa, H.; Sueishi, K. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension**, 26: 957-62, 1995.

of nitric oxide synthase in rats. **Basic Res Cardiol**, 93:173-81, 1998

Okere, C. O.; Kaba, H.; Higuchi, T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. **Neuroscience**, 71: 349-54, 1996.

Pacca, S. R.; De Azevedo, A. P.; De Oliveira, C. F.; De Luca, I. M.; De Nucci, G.; Antunes, E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial

fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. **J Cardiovasc Pharmacol**, 39: 201-7, 2002.

Palmer, R. M.; Ashton, D. S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-6, 1988.

Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-6, 1987.

Pang, D. C. Tissue and species specificity of cardiac cAMP-phosphodiesterase inhibitors. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, 25: 307-20, 1992.

Panza, J. A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. **Clin Cardiol**, 20: II-26-33, 1997.

Passaretti, T. V.; Wilcox, B. D.; Jeffrey, J. J. Serotonin regulation of gene expression in uterine extracellular matrix: reciprocal effects on collagens and collagenase. **Mol Cell Endocrinol**, 120: 125-32, 1996.

Pearson, D. L.; Dawling, S.; Walsh, W. F.; Haines, J. L.; Christman, B. W.; Bazyk, A. et al. Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. **N Engl J Med**, 344: 1832-8, 2001.

Pechanova, O.; Bernatova, I. Effect of long-term NO synthase inhibition on cyclic nucleotide content in rat tissues. **Physiol Res**, 45: 305-9, 1996.

Pechanova, O.; Bernatova, I.; Babal, P. Structural alterations in the heart after long-term L-NAME and D-NAME treatment. **Gen Physiol Biophys**, 18 Suppl 1: 6-9, 1999.

Pechanova, O.; Bernatova, I.; Pelouch, V.; Babal, P. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. **Physiol Res**, 48: 353-62, 1999.

Pechanova, O.; Bernatova, I.; Pelouch, V.; Simko, F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 3365-74, 1997.

Pessanha MG, Mandarim-de-Lacerda CA. Influence of the chronic

Pfeiffer, S.; Leopold, E.; Schmidt, K.; Brunner, F.; Mayer, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **Br J Pharmacol**, 118: 1433-40, 1996.

Pfeilschifter, J.; Eberhardt, W.; Beck, K. F. Regulation of gene expression by nitric oxide. **Pflugers Arch**, 442: 479-86, 2001.

phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. **Hypertension**, 649-56, 1998

Pinsky, D. J.; Patton, S.; Mesaros, S.; Brovkovich, V.; Kubaszewski, E.; Grunfeld, S. et al. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. **Circ Res**, 81: 372-9, 1997.

Prendergast, B. D.; Sagach, V. F.; Shah, A. M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. **Circulation**, 96: 1320-9, 1997.

Qiang, M.; Chen, Y. C.; Wang, R.; Wu, F. M.; Qiaq, J. T. Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. **Behav Pharmacol**, 8: 183-7, 1997.

Radomski, M. W.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br J Pharmacol**, 92: 181-7, 1987.

Rall, T. W.; Sutherland, E. W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. **J Biol Chem**, 232: 1065-76, 1958.

Redmond, E. M.; Cahill, P. A.; Hodges, R.; Zhang, S.; Sitzmann, J. V. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Cell Physiol**, 166: 469-79, 1996.

Rees, D. D.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86: 3375-8., 1989.

Rees, D. D.; Palmer, R. M.; Schulz, R.; Hodson, H. F.; Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol**, 101: 746-52., 1990.

Regan, C. P.; Adam, P. J.; Madsen, C. S.; Owens, G. K. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. **J Clin Invest**, 106: 1139-47, 2000.

Remick, D. G.; Villarete, L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **J Leukoc Biol**, 59: 471-5, 1996.

Res, 59: 308-20, 2003

Rhaleb, N. E.; Yang, X. P.; Scicli, A. G.; Carretero, O. A. Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. **Hypertension**, 23: 865-8, 1994.

Ribeiro, M. O.; Antunes, E.; De Nucci, G.; Lovisolo, S. M.; Zatz, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, 20: 298-303, 1992.

Ruskoaho, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. **Pharmacol Rev**, 44: 479-602, 1992.

Sagara, T.; Gatton, D. D.; Lindsey, J. D.; Gabelt, B. T.; Kaufman, P. L.; Weinreb, R. N. Topical prostaglandin F₂α treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. **Arch Ophthalmol**, 117: 794-801, 1999.

Salt, T. E.; Zhang, H.; Mayer, B.; Benz, B.; Binns, K. E.; Do, K. Q. Novel mode of nitric oxide neurotransmission mediated via S-nitroso-cysteinyl-glycine. **Eur J Neurosci**, 12: 3919-25, 2000.

Sampaio, R. C.; Tanus-Santos, J. E.; Melo, S. E.; Hyslop, S.; Franchini, K. G.; Luca, I. M. et al. Hypertension plus diabetes mimics the cardiomyopathy induced by nitric oxide inhibition in rats. **Chest**, 122: 1412-20., 2002.

Sarkar, R.; Gordon, D.; Stanley, J. C.; Webb, R. C. Dual cell cycle-specific mechanisms mediate the antimitogenic effects of nitric oxide in vascular smooth muscle cells. **J Hypertens**, 15: 275-83, 1997.

Sarkar, R.; Meinberg, E. G.; Stanley, J. C.; Gordon, D.; Webb, R. C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, 78: 225-30, 1996.

Sarkar, R.; Webb, R. C. Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? A critical appraisal. **J Vasc Res**, 35: 135-42, 1998.

Schlossmann, J.; Feil, R.; Hofmann, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann Med**, 35: 21-7, 2003.

Schultz, G.; Bohme, E.; Munske, K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. **Life Sci**, 8: 1323-32, 1969.

Schwarz, U. R.; Walter, U.; Eigenthaler, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochem Pharmacol**, 62: 1153-61, 2001.

Schwarzacher, S.; Raberger, G. I-NG-nitro-arginine methyl ester in the anesthetized rabbit: venous vasomotion and plasma levels. **J Vasc Res**, 29: 290-2, 1992.

Scott, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Pharmacol Ther**, 50: 123-45, 1991.

Scott, J. D.; Dell'acqua, M. L.; Fraser, I. D.; Tavalin, S. J.; Lester, L. B. Coordination of cAMP signaling events through PKA anchoring. **Adv Pharmacol**, 47: 175-207, 2000.

Scott-Burden, T.; Schini, V. B.; Elizondo, E.; Junquero, D. C.; Vanhoutte, P. M. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. **Circ Res**, 71: 1088-100, 1992.

Shah, A. M.; Maccarthy, P. A. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. **Pharmacol Ther**, 86: 49-86, 2000.

Shah, A. M.; Spurgeon, H. A.; Sollott, S. J.; Talo, A.; Lakatta, E. G. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. **Circ Res**, 74: 970-8, 1994.

Shakar, S. F.; Abraham, W. T.; Gilbert, E. M.; Robertson, A. D.; Lowes, B. D.; Zisman, L. S. et al. Combined oral positive inotropic and beta-blocker therapy for treatment of refractory class IV heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 31: 1336-40, 1998.

Shekerdemian, L. S.; Ravn, H. B.; Penny, D. J. Interaction between inhaled nitric oxide and intravenous sildenafil in a porcine model of meconium aspiration syndrome. **Pediatr Res**, 55: 413-8, 2004.

Sigmon D, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic

Simko, F.; Matuskova, J.; Luptak, I.; Krajcirovicova, K.; Kucharsa, J.; Gvozdjakova, A. et al. Effect of simvastatin on remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. **Life Sci**, 74: 1211-24, 2004.

Singh, J.; Flitney, F. W. Inotropic responses of the frog ventricle to dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo cyclic GMP and related changes in endogenous cyclic nucleotide levels. **Biochem Pharmacol**, 30: 1475-81, 1981.

Smith, C. J.; Huang, R.; Sun, D.; Ricketts, S.; Hoegler, C.; Ding, J. Z. et al. Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP phosphodiesterase PDE3A. **Circulation**, 96: 3116-23, 1997.

Smith, C.; Mitchinson, M. J.; Aruoma, O. I.; Halliwell, B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **Biochem J**, 286 (Pt 3): 901-5, 1992.

Sonnenburg, W. K.; Seger, D.; Kwak, K. S.; Huang, J.; Charbonneau, H.; Beavo, J. A. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J Biol Chem**, 270: 30989-1000, 1995.

Stewart, P. M.; Whorwood, C. B.; Valentino, R.; Burt, D.; Sheperd, M. C.; Edwards, R. W. 11-BETA-Hydroxysteroid Dehydrogenase activity and gene expression in the hypertensive Bianchi-Milan rat. **J Hypertension**, 11: 349-54, 1993.

Stockklauser-Farber, K.; Ballhausen, T.; Laufer, A.; Rosen, P. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. **Biochim Biophys Acta**, 1535: 10-20, 2000.

Stuart-Smith, K.; Warner, D. O.; Jones, K. A. The role of cGMP in the relaxation to nitric oxide donors in airway smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, 341: 225-33, 1998.

Sugiyama, A.; Takeuchi, N.; Saegusa, Y.; Sugita, M.; Hashimoto, K. Molecular mechanisms of cardiostimulatory effects of sildenafil. **Jpn J Pharmacol**, 88: 362-4., 2002.

Sun Y, Zhang J, Lu L, Bedigian MP, Robinson AD, Weber KT. Tissue angiotensin II in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. **J Lab Clin Med**, 143: 41-51, 2004

Sunahara, R. K.; Dessauer, C. W.; Gilman, A. G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 36: 461-80, 1996.

Tabrizi-Fard, M. A.; Fung, H. L. Pharmacokinetics, plasma protein binding and urinary excretion of N omega-nitro-L-arginine in rats. **Br J Pharmacol**, 111: 394-6, 1994.

Takemoto, M.; Egashira, K.; Tomita, H.; Usui, M.; Okamoto, H.; Kitabatake, A. et al. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. **Hypertension**, 30: 1621-7, 1997.

Tamir, S.; Tannenbaum, S. R. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. **Biochim Biophys Acta**, 1288: F31-6, 1996.

Taussig, R.; Gilman, A. G. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. **J Biol Chem**, 270: 1-4, 1995.

Tharoux, P. L.; Dussaule, J. C.; Pauti, M. D.; Vassitch, Y.; Ardaillou, R.; Chatziantoniou, C. Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. **Kidney Int**, 51: 1780-7, 1997.

Thompson, D. K.; Garbers, D. L. Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. **J Biol Chem**, 270: 425-30, 1995.

Thorpe, D. S.; Morkin, E. The carboxyl region contains the catalytic domain of the membrane form of guanylate cyclase. **J Biol Chem**, 265: 14717-20, 1990.

Thyberg, J. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. **Histol Histopathol**, 13: 871-91, 1998.

Titheradge, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta**, 1411: 437-55, 1999.

Tokuno, S.; Thoren, P.; Lowbeer, C.; Valen, G. The role of nitric oxide in ischaemia/reperfusion injury of isolated hearts from severely atherosclerotic mice. **Life Sci**, 69: 2067-80, 2001.

Trautwein, W.; Taniguchi, J.; Noma, A. The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. **Pflugers Arch**, 392: 307-14, 1982.

Trautwein, W.; Trube, G. Negative inotropic effect of cyclic GMP in cardiac fiber fragments. **Pflugers Arch**, 366: 293-5, 1976.

Troy, C. M.; Derossi, D.; Prochiantz, A.; Greene, L. A.; Shelanski, M. L. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. **J Neurosci**, 16: 253-61, 1996.

Tschope, C.; Spillmann, F.; Altmann, C.; Koch, M.; Westermann, D.; Dhayat, N. et al. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, 61: 559-69, 2004.

Tsurumi, Y.; Murohara, T.; Krasinski, K.; Chen, D.; Witzenbichler, B.; Kearney, M. et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. **Nat Med**, 3: 879-86, 1997.

Uhlenius, N.; Tikkanen, I.; Tikkanen, T.; Miettinen, A.; Tornroth, T.; Fyhrquist, F. Chronic inhibition of nitric oxide synthase in Heymann nephritis. **Nephron**, 74: 144-9, 1996.

Usui, M.; Ichiki, T.; Katoh, M.; Egashira, K.; Takeshita, A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. **Hypertension**, 32: 527-33, 1998.

Vaandrager, A. B.; Bot, A. G.; Ruth, P.; Pfeifer, A.; Hofmann, F.; De Jonge, H. R. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. **Gastroenterology**, 118: 108-14, 2000.

Vallance, P. Control of the human cardiovascular system by nitric oxide. **J Hum Hypertens**, 10: 377-81, 1996.

Veeravalli, K. K.; Akula, A.; Kota, M. K. Nitric oxide- and prostaglandin-mediated cardioprotection by bradykinin in myocardial ischemia and reperfusion injury. **Pol J Pharmacol**, 55: 1021-9, 2003.

ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition

Vila-Petroff, M. G.; Younes, A.; Egan, J.; Lakatte, E. G.; Sollott, S. J. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. **Circ Res**, 84: 1020-31, 1999.

Wahler, G. M.; Dollinger, S. J. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. **Am J Physiol**, 268: C45-54, 1995.

Wahler, G. M.; Sperelakis, N. Intracellular injection of cyclic GMP depresses cardiac slow action potentials. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, 10: 83-95, 1985.

Waldman, S. A.; Murad, F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. **J Cardiovasc Pharmacol**, 12 Suppl 5: S115-8, 1988.

Waldman, S. A.; Murad, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev**, 39: 163-96., 1987.

Wallace, D. R.; Booze, R. M. Upregulation of (+)-7-hydroxy-N,N-di-n-[3H]propyl-2-aminotetralin binding following intracerebroventricular administration of a nitric oxide generator. **Neurochem Res**, 22: 163-70, 1997.

Walsh, D. A.; Perkins, J. P.; Krebs, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **J Biol Chem**, 243: 3763-5, 1968.

Ward, J. K.; Barnes, P. J.; Tadjkarimi, S.; Yacoub, M. H.; Belvisi, M. G. Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in humal trachea. **J Physiol**, 483 (Pt 2): 525-36, 1995.

Watanabe, G.; Tomiyama, H.; Doba, N. Effects of oral administration of L-arginine on renal function in patients with heart failure. **J Hypertens**, 18: 229-34, 2000.

Wedel, B.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. **J Biol Chem**, 270: 24871-5, 1995.

White, A. A.; Aurbach, G. D. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. **Biochim Biophys Acta**, 191: 686-97, 1969.

William, D.; Fruzsina, K. J.; Robert, A. J. Arginase: A critical regulator of oxide synthesis and vascular function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 34: 906–911, 2007

Yamada, S. S.; Sasaki, A. L.; Fujihara, C. K.; Malheiros, D. M.; De Nucci, G.; Zatz, R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. **Hypertension**, 27: 1165-72, 1996.

Yoshimoto, T.; Naruse, M.; Naruse, K.; Fujimaki, Y.; Tanabe, A.; Muraki, T. et al. Gene expression of vascular natriuretic peptide receptor in the aorta of hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl**, 22: S175-6, 1995.

Zanchi, A.; Schaad, N. C.; Osterheld, M. C.; Grouzmann, E.; Nusseberger, J.; Brunner, H. R. et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. **Am J Physiol**, 268: H2267-73, 1995.

Zappellini, A.; Moreno Junior, H.; Antunes, E.; De Nucci, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs. **J Cardiovasc Pharmacol**, 29: 45-8., 1997.

Zatz, R.; Baylis, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32: 958-64, 1998.

Zhao, A. Z.; Bornfeldt, K. E.; Beavo, J. A. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. **J Clin Invest**, 102: 869-73, 1998.

Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Wang JC, Fang QZ, Zhou ZN. Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. **Acta Pharmacol Sin.** 23:305-10, 2002.

Ziche, M.; Morbidelli, L. Nitric oxide and angiogenesis. **J Neurooncol**, 50: 139-48, 2000.

