

ANDRÉA DE CASTRO PEREZ

ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS RESPOSTAS
EDEMATOGÊNICAS E ESPASMOGÊNICAS INDUZIDAS
PELA BRADICININA E HISTAMINA.

Tese apresentada à Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de doutor em Ciências.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Andréa de Castro Perez

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Área de concentração: Fisiologia

23/05/95

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci



Campinas
1995

P415e

26109/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA

C.m.00080344-6

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	JUNICAMP
	P415e
V.º	E.º
TO	26109
PA	433/95
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/12/95
N.º CPD	

Perez, Andrea Castro

P415e

Envolvimento do oxido nitrico nas respostas edematogenicas e espasmogenicas induzidas pela bradicinina e histamina / Andrea Castro Perez. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Gilberto de Nucci.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Oxido nitrico. 2. Permeabilidade. 3. Fluxo sanguineo. 4. Arginina. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

SUMÁRIO

Resumo	2
Lista de abreviações	5
Lista de tabelas	6
Lista de figuras	7
Introdução	8
Objetivos	16
Métodos	17
Materiais	21
Resultados	23
- Ação da bradicinina e histamina na permeabilidade cutânea de cobaias	23
- Efeitos de aminoácidos em músculo liso das vias aéreas de cobaias e coelhos (<i>in vitro</i>)	24
- Cinética dos inibidores da óxido-nítrico sintase em cobaias	27
- Doadores de NO	31
Discussão	61
- Ação da bradicinina e histamina na permeabilidade cutânea de cobaias	61
- Efeitos de aminoácidos em músculo liso das vias aéreas de cobaias e coelhos (<i>in vitro</i>)	63
- Cinética dos inibidores da óxido-nítrico sintase em cobaias	65
- Doadores de NO	68
Conclusão final	69
Referências bibliográficas	70
Abstract	87

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sintetizada à partir da L-arginina, catalizada pela enzima óxido-nítrico sintase (NOS), podendo ser inibida por análogos da L-arginina como L-N^G-nitro arginina metil éster (L-NAME). O NO é responsável por vários efeitos biológicos tais como modulação da pressão arterial, atividade plaquetária, etc. Entretanto, seu papel no controle da resposta inflamatória é controverso.

O objetivo desta tese foi verificar o envolvimento do NO nas respostas edematogênicas e espasmogênicas induzidas pela histamina e bradicinina.

O extravasamento de proteínas plasmáticas em pele de cobaias foi medido pelo acúmulo de ¹²⁵I marcado com albumina (¹²⁵IHSA) injetado intravenosamente.

O inibidor de síntese de NO, L-NAME (0.1 μmol/sítio) reduziu o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por bradicinina (0.5 nmol/sítio) e histamina (4.5 nmol/sítio) enquanto que seu enantiômero D-NAME não teve efeito.

Esse efeito inibidor foi revertido pela L-arginina (10 μmol/sítio) somente nas respostas da bradicinina. L-arginina sozinha potencializou a resposta da bradicinina, enquanto que reduziu a resposta da histamina.

Em íleo de cobaia *in vitro*, L-arginina e D-arginina tiveram um efeito inibidor em contrações isométricas estimuladas pela histamina mas não bradicinina.

L-lisina um outro aminoácido de carga semelhante a arginina não teve efeito sobre os diferentes agonistas tanto em permeabilidade como contração.

O agonista α-adenocceptor, fenilefrina (6 nmol/sítio) e o agonista β-adenocceptor isoprenalina (10 nmol/sítio) inibiram as respostas da bradicinina e da histamina de modo comparáveis.

Nossos resultados sugerem que a produção local de NO está envolvida na permeabilidade vascular induzida por mediadores, sendo este efeito mais pronunciado em bradicinina, e que esses dois mediadores tem diferentes mecanismos de ação.

Investigamos também o efeito dos aminoácidos L-arginina, D-arginina e L-lisina em músculo liso (traquéias isoladas de cobaias e brônquios de coelhos). Tanto L-arginina como D-arginina (100 mM) reduziram a potência contrátil e a resposta contrátil máxima da histamina (em traquéia e brônquio), o que não ocorreu com metacolina ou cloreto de potássio em traquéias isoladas e sem epitélio de cobaias. Por outro lado L-lisina não mostrou efeito.

L-arginina e D-arginina produziram um relaxamento dose dependente em traquéias isoladas de cobaias pré-contraídas com histamina. Este efeito relaxante não foi alterado pela presença ou não do endotélio, ou ainda L-NAME (inibidor da óxido-nítrico sintase).

Assim demonstramos que arginina antagoniza contração induzida por histamina de um modo não competitivo, independente de óxido nítrico e também não relacionado com a sua carga.

Em outros experimentos comparamos os efeitos de L-NAME em extravasamento de proteína plasmáticas e fluxo sanguíneo (medido pelo método de *clearance* do ^{133}Xe)

O efeito inibidor de L-NAME em permeabilidade persiste por até 8 horas, enquanto que em fluxo sanguíneo não se nota mais efeito após 4 horas.

Fenilefrina (5 nmol/sítio) produziu um efeito somente quando co-injetado com bradicinina.

Quando comparados, L-NAME, L-NMMA e L-NOArg, produziram semelhante redução no fluxo sanguíneo, porém o efeito de L-NMMA não persistiu por 0.5 horas.

L-arginina reverteu os efeitos inibidores de L-NAME, quando injetada com bradicinina somente após 4 horas e não 2 horas, sugerindo que o bloqueio já está fraco nesse tempo.

Assim, concluímos que L-NAME está exercendo algum efeito independente de mudanças em fluxo sanguíneo.

Numa outra série de experimentos usando os doadores de NO (SNAP, SNP e GTN), observamos que somente SNAP potencializava o extravasamento de

proteína plasmática, estando este dado de acordo com o aumento de fluxo sanguíneo causado. Com relação ao fluxo sanguíneo, SNP teve efeito semelhante aumentando o fluxo sanguíneo. GTN não teve nenhum efeito, nem mesmo revertendo os efeitos de L-NAME ou fenilefrina.

Esses compostos parecem portanto que têm mecanismos distintos de ação.

LISTA DE ABREVIÇÕES

BK	Bradicinina
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio hidratado
Co	Co-injeção
D-arg	D-arginina
D-NAME	N^{G} -nitro D-arginina metil éster
GTN	glyceryl trinitrate
HA	Histamina
^{125}I	Iodo 125
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio
L-arg	L-arginina
L-lis	L-lisina
L-NAME	L- N^{G} -nitro arginina metil éster
L-NO Arg	L- N^{G} -nitro arginina
L-NMMA	L- N^{G} monometil arginina
Min.	Minutos
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio hepta hidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido-nítrico sintase
PGE_2	Prostaglandina E_2
Pre	Pré-injeção
salina	solução salina fisiológica
SNAP	S-nitroso- N^{G} -acetylpenicilamina
SNP	nitroprussiato de sódio
^{133}Xe	Xenônio

LISTA DE TABELAS

Tab	Pag	Título
1	33	Efeito da arginina e da lisina nas respostas contráteis de íleo de cobaia <i>in vitro</i>
2	34	Duração dos efeitos do L-NAME no extravasamento de proteína plasmática
3	35	Duração dos efeitos da dose baixa de L-NAME no extravasamento de proteína plasmática
4	36	Duração dos efeitos de L-NMMA e L-NO Arg no extravasamento de proteína plasmática
5	37	Efeito da combinação de inibidores da NOS no extravasamento de proteína plasmática mediada por BK
6	38	Efeito de inibidores da NOS no fluxo sanguíneo
7	39	Efeito da L-arginina no extravasamento de proteína plasmática
8	40	Efeitos de SNAP, SNP, GTN e PGE ₂ sobre a inibição do L-NAME
9	41	Efeitos de SNAP, SNP, GTN e PGE ₂ sobre a inibição da fenilefrina
10	42	Medidas de fluxo sanguíneo

LISTA DE FIGURAS

Fig	Pag	Título
1	43	Efeitos da arginina na inibição do L-NAME
2	44	Efeitos da arginina no extravasamento de proteína plasmática
3	45	Comparação dos efeitos de arginina e lisina
4	46	Comparação dos efeitos de fenilefrina e isoprenalina
5	47	Efeito da arginina em traquéia isolada (histamina)
6	48	Efeito da lisina em traquéia isolada (histamina)
7	49	Efeito da arginina em traquéia isolada (metacolina)
8	50	Curva de relaxamento da L-arginina
9	51	Curva de relaxamento da D-arginina
10	52	Efeito da arginina em brônquio de coelho
11	53	Duração dos efeitos do L-NAME (bradicinina)
12	54	Duração dos efeitos do L-NAME (histamina)
13	55	Duração dos efeitos do D-NAME
14	56	Duração dos efeitos da fenilefrina
15	57	Fluxo sanguíneo de L-NAME, D-NAME e fenilefrina
16	58	Fluxo sanguíneo de L-NAME, D-NAME e fenilefrina (pré-injetados)
17	59	Efeitos de GTN, SNAP e SNP no extravasamento de proteína plasmática
18	60	Efeitos de SNAP, SNP, GTN e PGE ₂ no fluxo sanguíneo

INTRODUÇÃO

INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é um mecanismo essencial de proteção contra injúrias ou organismos invasores orquestrado pelo sistema imune e pelo sistema nervoso. Esse processo pode, porém tornar-se patológico por defeito em algum dos muitos componentes (como na asma e na artrite reumatóide, etc.).

John Hunter (séc. XVIII), demonstrou ser a inflamação uma resposta vascular.

Foram estabelecidas como características da inflamação aguda: dilatação arteriolar, permeabilidade vascular aumentada, acumulação de leucócitos, dor e perda de função. A ocorrência desses eventos parece óbvia quando se entende que a resposta do corpo é a de eliminar o organismo invasor.

As arteríolas são as responsáveis pela manutenção do tônus vascular, sendo limitadas por 1 - 3 camadas de músculo liso. Na inflamação, a liberação de mediadores como a bradicinina e a histamina causa a dilatação desses vasos, aumentando o fluxo sanguíneo local, permitindo que as células de defesa (leucócitos) entrem na área afetada. Como a parede de alguns vasos apresenta maior permeabilidade, algumas proteínas plasmáticas atravessam o tecido, atraindo neutrófilos e eosinófilos (Gerard & Hugli, 1981) que também atuam no processo inflamatório.

O extravasamento de proteínas depende do gradiente da pressão hidrostática na parede do vaso, da permeabilidade e do tônus de resistência dos vasos (as arteríolas). Isto parece ser uma das razões pelas quais os mediadores produzidos na inflamação relaxam o músculo liso arteriolar e aumentam o fluxo sanguíneo.

Em condições normais, o endotélio é relativamente impermeável a macromoléculas. Acredita-se que o aumento da permeabilidade vascular, observada em resposta a vários mediadores endógenos e exógenos deva-se à

formação de *gaps* transitórios e reversíveis entre as células endoteliais em vênulas pós-capilares (Majno & Palade, 1961; Schachter, 1963; Majno *et al.*, 1969; Arfors *et al.*, 1979; Fox *et al.*, 1980). Foi sugerido também haver o envolvimento de mecanismo contrátil baseado em mudanças conformacionais nas células endoteliais (Majno *et al.*, 1969) e a presença de proteínas contráteis nessas células (Becker e Nachman, 1973; Drenckhahn, 1983).

MEDIADORES DE ORIGEM CELULAR

A histamina foi um dos primeiros mediadores inflamatórios a serem descritos (Dale & Laidlaw, 1910). Ela produz vasodilatação e edema atuando em receptores específicos pela liberação de NO (Garrison, 1991).

A bradicinina, outro potente vasodilatador, também causa edema pela liberação de NO.

As prostaglandinas são potentes vasodilatadores, todavia só potenciam edema quando co-injetadas com outros agonistas como a bradicinina (Williams & Morley, 1973; Williams, 1976; Williams & Peck, 1977).

Outras substâncias, como o VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), ambos potentes vasodilatadores, também podem agir sinergicamente em pele de ratos e coelhos produzindo extravasamento de proteínas plasmáticas (Williams, 1982; Brain & Williams, 1985), enquanto os vasoconstritores inibem essa resposta (Beets & Paul, 1980).

ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Furchgott e Zawadzki, em 1980, demonstraram que o relaxamento vascular causado pela acetilcolina era dependente da presença de endotélio, e que esse efeito era resultado de um fator chamado EDRF (fator relaxante derivado do endotélio). O relaxamento dependente do endotélio foi demonstrado em várias preparações (veias, artérias e microvasos) e ocorreu em resposta a várias substâncias (acetilcolina, nucleotídeos de adenina, trombina, substância P, ionóforo de cálcio A23187, bradicinina, etc). Outros estímulos, como a hipóxia, o aumento de fluxo e o estímulo elétrico, também causam relaxamento dependente de endotélio em tecido vascular *in vitro* (Ignarro *et al.*, 1987; Ignarro, 1989; Moncada *et al.*, 1991). Outros fatores, como os nitrovasodilatadores, o fator natriurético atrial, os agonistas beta adrenérgicos, a prostaciclina, induzem relaxamento vascular por mecanismos independentes do endotélio (Furchgott, 1984; Griffith *et al.*, 1984; Busse *et al.*, 1985; Moncada *et al.*, 1986).

Desde a identificação do NO como a substância responsável pela atividade do EDRF (Palmer *et al.*, 1987), e a descoberta de que agentes vasoativos pró-inflamatórios liberam o EDRF, verificou-se um grande interesse pelo papel modulador do NO na permeabilidade microvascular.

O NO é um radical altamente reativo formado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido-nítrico sintase (NOS; Palmer *et al.*, 1988a, b). Essa reação é estereoespecífica, já que D-arg não é substrato, e libera também outro produto com a mesma relação estequiométrica: a L-citrulina (Palmer & Moncada, 1989). Uma vantagem na formação deste co-produto é que ele pode ser medido mais facilmente do que o óxido nítrico que tem meia vida de alguns segundos (Bredt & Snyder, 1990).

Os efeitos do EDRF são inibidos pela hemoglobina (Hb), pelo azul de metileno (Martin *et al.*, 1985) e por outros agentes como a hidroquinona (Griffith *et al.*, 1984).

ÓXIDO-NÍTRICO SINTASE (NOS)

Várias espécies de NOS já foram caracterizadas. Esta enzima existe basicamente sob duas formas, ambas dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH): a NOS constitutiva (NOSc) e a NOS induzível (NOSi). A primeira é encontrada em células endoteliais, neuronais, neutrófilos e mastócitos (Bredt & Snyder, 1990), e é dependente de Ca^{+2} /calmodulina, produzindo NO rapidamente. A segunda é ativada após exposição a certas citocinas e endotoxinas, e não é dependente de cálcio. A ativação desta última forma se dá através de transcrição genética e produz maior quantidade de NO por período de horas. Os corticoesteróides inibem a indução da NOSi mas não têm efeito sobre a NOSc (Marletta *et al.*, 1988).

INIBIDORES DE NOS

Análogos da L-Arg agem como falso substrato para a enzima, bloqueando a formação do NO, de modo reversível quando se acrescenta L-Arg (mas não D-Arg; Palmer *et al.*, 1988a).

Alguns desses inibidores são o L-N^G-monometil-arginina (L-NMMA), o L-N^G-nitro-arginina (L-NO ARG) e o L-N^G-nitro-arginina metil éster (L-NAME; Moore *et al.*, 1989, 1990; Palmer *et al.*, 1988b, Palmer & Moncada, 1989, Rees *et al.*, 1990a, b).

EFEITOS DO NO

O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, aumentando a produção de guanosina 3,5-monofosfato (GMPc) e resultando no relaxamento do músculo liso (Rapoport & Murad, 1983). A vasodilatação é a componente chave da reação inflamatória, influenciando a formação de edema e a acumulação de leucócitos (Teixeira *et al.*, 1993).

O NO endógeno age como modulador contra a vasoconstrição, um efeito bastante importante no pulmão (Moncada *et al.*, 1988).

O NO é uma molécula bastante instável e sua interação com ânions superóxidos (O_2^-) pode gerar radicais tóxicos aos tecidos como, por exemplo, o peroxinitrito (Beckman *et al.*, 1990; Stamler *et al.*, 1992). Os compostos descritos como inibidores do NO, com exceção da Hb (Martin *et al.*, 1986), agem por esse mecanismo, gerando O_2^- . Os efeitos do NO podem ser prolongados pela adição da enzima superóxido dismutase (SOD; Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

O NO inibe a agregação de plaquetas (Azuma *et al.*, 1986; Furlong *et al.*, 1987; Radomski *et al.*, 1987a), desagrega plaquetas já agregadas (Radomski *et al.*, 1987b) e inibe a adesão de plaquetas à camada endotelial, à *matrix* extracelular e às fibras de colágeno (Radomski *et al.*, 1987c, d).

Efeitos no sistema cardiovascular

O NO é constantemente liberado no sistema cardiovascular, mantendo o tônus dilatador (Palmer *et al.*, 1988b), e pode ser antagonizado por L-NMMA (Thomas *et al.*, 1989). Esse efeito é particularmente importante no lado arterial onde o NO é produzido em maior quantidade do que no lado venoso (Vallance *et al.*, 1989).

Em coelhos anestesiados, o L-NMMA, mas não o D-NMMA, aumentou a pressão arterial, sendo esse efeito revertido pela L-arginina (Rees *et al.*, 1989), demonstrando importante efeito do NO na regulação do fluxo sanguíneo e na pressão arterial. O mesmo foi observado em cobaias (Aisaka *et al.*, 1989, 1990) e ratos (Whittle *et al.*, 1989; Rees *et al.*, 1990a).

Efeitos no sistema nervoso

A via L-arginina-NO e a NOS estão amplamente distribuídas no sistema nervoso (principalmente nos neurônios e no endotélio, mas não na glia; Ross *et al.*, 1990)

A NOS do cérebro, é inibida competitivamente por L-NMMA, por L-NA e por L-NIO (Knowles *et al.*, 1990) e, semelhantemente à NOS das células endoteliais e das plaquetas requer o NADPH como cofator.

Muitos dos efeitos do NO ainda não foram elucidados, mas acredita-se que tenha função excitatória, principalmente no aprendizado e na memória, e atue como mediador de efeitos biológicos de outros neurotransmissores cujas ações são associadas com o aumento do GMPc (Drummond, 1984).

A via L-arginina-NO pode ser também a responsável por alguns processos patológicos no sistema nervoso (Moncada *et al.*, 1989), tais como a degeneração de neurônios por excessiva ativação de receptores NMDA, com conseqüente aumento de cálcio, e a produção de NO (Rothman & Olney 1987, Garthwaite, 1989). Altos níveis de GMPc causam destruição de células fotorreceptoras na retina (Ross *et al.*, 1990) e podem causar maior incidência de ataques epiléticos (Ferrendelli *et al.*, 1980).

O NO pode ser também o neurotransmissor não adrenérgico não colinérgico (NANC; Rand, 1992), já que uma forma de NOSc foi localizada em nervos periféricos (Bredt *et al.*, 1990). Os neurônios cujo neurotransmissor não é nem a acetilcolina nem a adrenalina (NANC) formam um importante componente da inervação autonômica no músculo liso, no trato gastrointestinal, nas vias aéreas, etc. (Burnstock, 1979; Barnes, 1986; Gillespie *et al.*, 1990).

Efeitos em outras células e tecidos

A via L-arginina-NO está também presente em vários outros tipos celulares, como o córtex e a medula da adrenal (Palacios *et al.*, 1989), sendo possível que o NO exerça papel modulador no controle e na síntese dos hormônios dessa glândula, no neuroblastoma de ratos (Ishii *et al.*, 1989), em células epiteliais do

rim (Ishii *et al.*, 1989), em mastócitos (Salvemini *et al.*, 1990), em neutrófilos (Salvemini *et al.*, 1989, Wright *et al.*, 1989), em macrófagos (Hibbs *et al.*, 1987), propiciando um efeito na defesa do organismo (Hibbs *et al.*, 1990).

O NO também tem importante papel ao diminuir a proliferação de células do músculo liso vascular (Garg & Hassid, 1989).

PAPEL COMO MEDIADOR NA INFLAMAÇÃO

O NO é produzido em quantidades basais na microvasculatura cutânea de ratos, possivelmente contrabalanceando os vasoconstritores endógenos (Lawrence & Brain, 1992), e o L-NAME mas não o D-NAME, diminui o fluxo sanguíneo cutâneo basal (Hughes *et al.*, 1990).

O NO também está envolvido na formação de edema induzido por vários mediadores como a substância P (Hughes *et al.*, 1990), a bradicinina (Paul *et al.*, 1992a), a histamina (Paul *et al.*, 1992b), a carragenina e o dextran (Ialenti *et al.*, 1992).

O L-NMMA e o L-NAME mas não o enantiômero D-NAME, inibiram edema em pele de rato induzido pela substância P causado pelo aumento da permeabilidade microvascular. Essa inibição era reversível pelo precursor do NO, a L-Arginina, e, portanto, o NO tem um papel no edema causado por outros mediadores (Hughes *et al.*, 1990). Teixeira *et al.*, (1993) também verificaram que a co-administração de inibidores da síntese de NO inibem edema e acumulação de leucócitos em resposta a injeções de histamina e bradicinina em pele de cobaias.

Mayhan (1992) concluiu que o NO contribui ativamente para a permeabilidade microvascular *in vivo* e sugeriu que o NO não atua somente como vasodilatador, mas também diretamente na contração de células endoteliais em vasos pós-capilares, já que foi previamente demonstrado que a formação de pontos de extravasamento ocorre independentemente da pressão venular e da dilatação arteriolar.

A vasodilatação induzida por endotoxina em pele de ratos anestesiados foi inibida por L-NAME e L-NMMA (Warrrem *et al.*, 1992).

Edema em pata de rato induzido por carragenina com aumento na permeabilidade vascular inibido por L-NAME e a resposta inflamatória aumentada por L-Arginina são outras evidências da implicação do NO na inflamação (Ialenti *et al.*, 1992). Muitos experimentos também foram realizados para examinar o efeito do NO em inflamação neurogênica. Khalil & Helme (1992), usando o modelo de bolha em pata de rato para determinar a contribuição de nervos sensoriais e NO na vasodilatação e no extravasamento de plasma causado por bradicinina, notaram que não somente o L-NOARG inibiu a inflamação, mas que o efeito era mais pronunciado em ratos tratados com capsaicina. Isto sugere que a inflamação neurogênica é, em parte, causada pela ação do NO. Essa observação apoiou-se em estudo realizado por Lippe *et al.*, (1993) com óleo de mostarda para indução de inflamação neurogênica em ratos atenuada por L-NAME.

DOADORES DE NO

Substâncias como o SNP, o GTN e o SNAP, que são potentes nitrovasodilatadores, são conhecidos como doadores de NO pois liberam-no através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Feelisch & Noack, 1987; Waldman & Murad, 1987).

O SNP aumenta o fluxo sanguíneo em pele de rato (Khalil & Helme, 1992) e bloqueia o decréscimo em fluxo sanguíneo produzido pelo L-NAME (Teixeira *et al.*, 1993).

A PGE₂, assim como o SNP também reverte os efeitos inibitórios do L-NAME em edema induzido pela bradicinina (Teixeira *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

O presente estudo foi realizado com o propósito de estudar os efeitos da L-arginina na permeabilidade cutânea e contração de músculo liso, cinética dos inibidores da óxido-nítrico sintase e efeitos dos doadores de NO em permeabilidade e fluxo sanguíneo de cobaias.

MÉTODOS

Extravasamento de proteínas plasmáticas

Os experimentos foram realizados em cobaias (OLAC, não anestesiadas), machos e pesando aproximadamente 400-500 g.

A pele das costas foi cuidadosamente depilada 2 horas antes do início dos experimentos.

Cada animal recebeu 0.5 ml de tintura azul de Evans via venosa (pata traseira), contendo aproximadamente 0.07 MBq de albumina humana marcada com ^{125}I (^{125}I -HSA).

Todas as soluções testadas foram preparadas em solução salina estéril. Injeções intradérmicas (0.1 ml/sítio) foram aplicadas em padrões alternados proporcionando assim uma maior variação dos sítios injetados (quadrado latino *design*). Cada animal recebeu até 6 tratamentos em duplicatas, com o seu devido controle.

Quarenta minutos após a última injeção intradérmica o animal foi sacrificado com uma *overdose* de pentobarbital sódico, e uma amostra de sangue coletada (com heparina) via punção cardíaca. A pele foi removida, e discos de pele contendo a lesão foram recortadas e contados em um gamma espectrômetro juntamente com 2 amostras de 100 μl de plasma de cada animal.

Extravasamento de cada lesão na pele foi expresso como μl de plasma (^{125}I pele/ ^{125}I plasma). Esses valores foram corrigidos pela subtração de seu devido controle (salina ou droga sozinha).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por análise de variância teste de Tukey (comparação múltipla).

Contração de músculo liso *in vitro*

Cobaias (300-500 g) foram mortas por deslocamento cervical, a traquéia removida e mantida em solução de Krebs (4°C, contendo inibidor de ciclo-oxygenase, indometacina, 5µM, aerado com 95% O₂ e 5% CO₂).

Coelhos (NZW, 2-3 Kg) foram mortos por *overdose* de pentobarbital, o brônquio principal removido e mantido em solução de Krebs como descrito acima.

Como foi demonstrado que o epitélio pode influenciar as respostas em traquéia de cobaias (Goldie *et al.*, 1986) e brônquios de coelhos (Raeburn *et al.*, 1986), em alguns experimentos o epitélio foi cuidadosamente removido com uma espátula de madeira.

Os tecidos em forma de anéis foram então suspensos sob tensão de 1g em solução de Krebs aerada (95% O₂, 5%CO₂, na temperatura de 37°C). Após um período de equilíbrio (30 minutos) com constantes trocas da solução a cada 10 minutos, metacolina (10 µM) foi acrescentada ao banho induzindo máxima contração. Após a resposta atingir um *plateau* os tecidos foram lavados (5x) e equilibrados novamente por 30 minutos.

Foram realizadas curvas dose-efeito de concentrações cumulativas de histamina (0.01 µM - 1 mM), metacolina (0.1 - 100 µM) e cloreto de potássio (10 - 160 mM) na ausência ou presença (incubação por 20 min.) de L-, D-arginina ou L-lisina (10 - 100 mM). Essas curvas também foram realizadas após a remoção desses aminoácidos do banho.

Em outros experimentos, preparações de traquéia, com epitélio intacto ou removido foram contraídas com histamina (EC₅₀) na presença ou ausência de L-NAME (50µM), concentrações cumulativas de L- e D-arginina (10 - 100mM) foram adicionados à resposta contrátil da histamina .

Análise dos resultados

As respostas contráteis foram expressas como % da resposta max (E max), obtidas com o agente espasmogênico na ausência do aminoácido. A potência contrátil foi determinada em 30 - 50 % da E max e expressa como média

geométrica com 95% limite de confiança e os resultados analisados por teste "t" pareado de Student.

Íleo de cobaia (*in vitro*)

Íleos de cobaias foram suspensos em solução de Krebs (gaseificada 95 % O₂, 5 % CO₂) e mantidos na temperatura de 34°C sob tensão de 1 g, para monitoração de contração isométrica. Curvas dose-efeito foram feitas em Krebs, na presença e ausência de D-arginina, L-arginina ou L-lisina, todos na concentração 100 mM. Cada peça de íleo foi exposta a somente um aminoácido. Os resultados foram expressos como % de resposta a máxima concentração de histamina (25 μM) ou bradicinina (1 μM). Os valores EC₅₀ foram calculados a partir de cada curva individualmente e expressos como média geométrica (95% limite de confiança) em n=4-6.

Medidas de fluxo sanguíneo

As alterações no fluxo sanguíneo local foram medidas usando-se a técnica do *clearance* do xenônio (¹³³Xe).

Os sítios na pele dorsal depilada do animal foram injetados com 0.1 ml de um volume contendo aproximadamente 0.08 MBq ¹³³Xe. As injeções de ¹³³Xe foram diluídas em salina em diferentes tempos após as injeções i.d. da droga sob teste (pre-tratamento) ou ¹³³Xe diluído juntamente com a droga a ser testada (co-injeção). Após 15 minutos os animais foram mortos com *overdose* de pentobarbital sódico (i.v.) e a pele retirada e cortada em pequenos discos exatamente como descrito anteriormente nos experimentos de permeabilidade.

As amostras de pele e 0.1 ml das soluções injetadas foram colocadas sob 2 ml de parafina líquida e contadas num gamma espectrometro para leitura de ¹³³Xe.

Os resultados foram calculados como % de alteração no *clearance* do ¹³³Xe nos sítios testes em relação aos sítios tratados com salina (Williams, 1979).

Os resultados foram calculados usando-se a seguinte equação:

$$\frac{[\ln X_{es} - \ln X_{eA}] \times 100}{[\ln X_{e1} - \ln X_{es}]}$$

= % de alteração do *clearance* do ^{133}Xe em relação ao controle, sítios injetados com salina.

onde:

X_{es}= contagem/min da pele injetada com salina

X_{eA}= contagem/min da pele injetada com agente teste

X_{e1}= contagem/min em um volume de 0.1 ml do fluido injetado

MATERIAIS

Histamina (difosfato)	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Indometacina	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Metacolina	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Bradicinina (acetato)	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Azul de Evans	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Pentobarbital sódico	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
L-lisina HCl	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Fenilefrina HCl	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
L-NAME	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
L-NMMA	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
L-NO Arg	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
L- e D- arginina HCl	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Isoprenalina (sulfato)	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
Prostaglandina E ₂	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra

SNP	Sigma Chemical Co., Poole, Inglaterra
GTN	Lipha Pharmaceuticals Ltd, Middlesex, Inglaterra
SNAP	Alexis Biochemicals, Nottingham, Inglaterra
D-NAME	Bachem, Suíça.
Heparina (Multiparin)	C. P. Pharmaceutical Ltd., Wrexham, Inglaterra.
¹²⁵ I-HSA (1.85 MBq/ml; 20 mg albumina/ml)	Amersham International plc., Amersham, Inglaterra.
¹³³ Xe (74 MBq/ml)	Medgenix Ltd., High Wycombe, Inglaterra

Composição da solução de Krebs (mM)

NaCl 117.6, KCl 5.4, MgSO₄·7H₂O 0.57,
KH₂PO₄ 1.03, NaHCO₃ 25.0, glicose 11.1 e CaCl₂·2H₂O 2.5.

RESULTADOS

AÇÃO DA BRADICININA E HISTAMINA NA PERMEABILIDADE CUTÂNEA DE COBAIAS.

Efeito do L-NAME e D-NAME em respostas à bradicinina e à histamina.

As respostas à bradicinina na dose de 0.5 nmol/sítio ($76.3 \pm 7.4 \mu\text{l}$; n=5) foram reduzidas ($p < 0.01$) por tratamento com L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; $21.5 \pm 2.3 \mu\text{l}$), mas não com D-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; $79.7 \pm 10.7 \mu\text{l}$). Do mesmo modo a resposta à histamina (4.5 nmol/sítio; $138.2 \pm 15.2 \mu\text{l}$; n=6) foi significativamente reduzida ($p < 0.01$) por L-NAME ($51.6 \pm 11.5 \mu\text{l}$), mas não D-NAME ($118.0 \pm 13.6 \mu\text{l}$), nas mesmas concentrações.

Efeitos da arginina

A L-arginina (1 - 10 $\mu\text{mol/sítio}$) reverteu os efeitos inibidores do L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) na resposta à bradicinina (0.5 nmol/sítio; n=5; $p < 0.05$; Figura 1a).

A D-arginina (10 μmol) produziu uma reversão parcial, porém não significativa (Figura 1a). Essas mesmas doses de D- e L-arginina não reverteram os efeitos inibitórios do L-NAME sobre a histamina (4.5 nmol/sítio; n=5; Figura 1b). Na ausência de L-NAME a resposta da bradicinina (0.5 nmol/sítio; n=5) foi aumentada pela L-arginina (10 $\mu\text{mol/sítio}$), todavia a L-arginina (1 - 10 $\mu\text{mol/sítio}$) teve um efeito inibidor sobre a histamina (4.5 nmol/sítio; n=5; Figura 2).

Por outro lado, a D-arginina (10 $\mu\text{mol/sítio}$) não teve efeito sobre a bradicinina mas inibiu ($p < 0.05$) a histamina (Figura 2).

A Figura 3 mostra esses mesmos resultados comparando-os agora com a L-lisina. Este aminoácido (L-lisina; 10 μ mol/sítio) não teve efeito (n=6) nas respostas da bradicinina nem da histamina (Figura 3b).

Efeitos de agonistas de adenoceptores nas respostas à bradicinina e à histamina.

A fenilefrina nas doses 0.3 e 6.0 nmol/sítio reduziu a resposta da bradicinina (0.5 nmol/sítio) em 14% e 57% respectivamente, assim como a resposta da histamina (4.5 nmol/sítio) em 19% e 65% respectivamente (Figura 4a; $p < 0.05$ significativo somente com a dose alta de fenilefrina; n=6).

A isoprenalina nas doses 0.5 e 10 nmol/sítio (Figura 4b) também inibiu as respostas da bradicinina e da histamina. Quanto à bradicinina, a inibição foi de 24% e 60% respectivamente (significativo com a dose alta somente), e em relação à histamina a inibição foi de 59% e 86% respectivamente (significativo para ambas as doses $p < 0.05$ e $p < 0.01$ respectivamente; n=6).

Efeitos da L-, D-arginina e L-lisina em contrações de íleo de cobaia.

A L-arginina (100 mM) aumentou ($p < 0.05$) o valor EC_{50} para a histamina mas não teve efeito nas respostas da bradicinina (Tabela 1). Não houve decréscimo na resposta máxima com ambos agonistas.

A D-arginina (100 mM) aumentou ($p < 0.05$) o EC_{50} para a histamina enquanto que L-lisina (100 mM) não teve efeito (Tabela 1). A D-arginina diminuiu a resposta máxima para $70 \pm 3.5\%$ (n=6).

EFEITOS DE AMINOÁCIDOS EM MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS DE COBAIAS E COELHOS (*IN VITRO*).

Respostas à histamina em traquéia de cobaia

A L-arginina nas concentrações de 10 e 30 mM não alterou a potência contrátil da histamina. Só reduzindo-a na concentração de 100 mM (EC30, 95% limite de confiança, controle 0.7 μ M [0.6 - 1.2], n=6 vs L-arginina 100 μ M [40-250] n=6, p<0.05; Figura 5a).

A resposta contrátil máxima (E max) também foi reduzida na presença da L-arginina (controle 500 \pm 150 mg vs L-arginina 200 \pm 50 mg, n=6, p<0.05). Após a retirada da L-arginina do banho, a potência contrátil e a E max não foram diferentes do controle.

A D-arginina (10 e 30 mM) não alterou a potência contrátil da histamina. Entretanto, a D-arginina (100 mM) reduziu a potência contrátil (EC30, 95% limite de confiança, controle 1.0 μ M [0.4 - 2.5]; n=4 vs D-arginina 8 μ M [5 - 12]; n=4, p<0.05 Figura 5b) e a E max (controle 650 \pm 190 mg vs D-arginina 475 \pm 140 mg, n=4, P<0.05). Após a retirada da D-arginina do banho, a E max e a potência contrátil não foram diferentes do controle.

A L-lisina (100 mM) não alterou a potência contrátil (EC30, 95% limite de confiança; controle 1.2 μ mol [0.6 - 2.5], n=4 vs L-lisina 1.2 μ mol [0.8 - 2], n=4, p>0.05, Figura 6) nem a E max (controle 650 \pm 90 mg vs L-lisina 650 \pm 130 mg, n=4, p>0.05).

Respostas à metacolina em traquéia de cobaias.

A L-arginina (100 mM) não reduziu a potência contrátil da metacolina (EC30, 95% limite de confiança; controle 0.47 μ M [0.03 - 6.5], n=4 vs L-arginina 0.56 μ M [0.14 - 2.2], n=4, Figura 7a; p>0.05) nem a E max (controle 1.6 \pm 0.4 g vs L-arginina 2.0 \pm 0.6 g, n=4, p>0.05). De modo similar, a D-arginina (100 mM) também não reduziu a potência contrátil da metacolina (EC30, 95% limite de confiança; controle 0.44 μ l [0.66 - 3.2], n=4 vs D-arginina 0.16 μ M [0.04 - 0.69], n=4, p>0.05) nem a E max (controle 1.6 \pm 0.11 g vs D-arginina 1.6 \pm 0.05 g, n=4, p>0.05, Figura 7b).

Respostas ao cloreto de potássio em traquéia de cobaias

A L-arginina (100 mM) não alterou a potência contrátil do cloreto de potássio (EC₃₀, 95% limite de confiança; controle 3.2 mM [1.7 - 5.8], n=6 vs L-arginina, 2.0 mM [0.8 - 5.0], n=6, p>0.05) nem a E max (controle 700 ± 70 mg vs L-arginina 600 ± 60 mg, n=6, p>0.05).

Efeito relaxante

Em experimentos com traquéia de cobaia contraída com histamina, a L-arginina (10 - 100 mM) induziu um relaxamento dependente da concentração em preparações com epitélio intacto ou denudado (Figura 8).

Na ausência do L-NAME, remoção do epitélio não alterou significativamente a potência de L-arginina (EC₅₀, 95% limite de confiança; epitélio intacto 26.9 mM [22.4 - 32.4], n=6 vs epitélio denudado 20 mM [17.2 - 23.1], n=6, p>0.05, Figura 8a).

Do mesmo modo, a remoção do epitélio não alterou a potência relaxante da L-arginina na presença do L-NAME (EC₅₀, 95% limite de confiança; epitélio intacto 26.3 mM [22.9 - 30.2], n=6 vs epitélio denudado 20 mM [16.2 - 24.5], n=6, p>0.05, Figura 8b). Quando comparados quanto à ausência ou presença de L-NAME, não houve diferença nos grupos.

A D-arginina (10 - 100 mM) também induziu relaxamento dependente da concentração em preparações com epitélio intacto ou denudado (Figura 9).

Na ausência de L-NAME, a remoção do epitélio não alterou a potência da D-arginina (EC₅₀, 95% limite de confiança; com epitélio 26.3 mM [18.3 - 36.5], n=6, vs sem epitélio 15.1 mM [12.3 - 18.6], n=7 p>0.05, Figura 9a).

A remoção do epitélio também não alterou a potência relaxante da D-arginina na presença do L-NAME (EC₅₀, 95% limite de confiança; com epitélio 18.6 mM [14.8 - 23.4], n=5 vs epitélio denudado 16.2 mM [13.2 - 19.5], n=6, p>0.05,

Figura 9b). O L-NAME não alterou a potência relaxante da D-arginina em epitélio intacto ou em epitélio denudado.

Brônquio de coelho

A L-arginina (100 mM) reduziu a potência contrátil da histamina (EC₃₀, 95% limite de confiança; controle 10 μ M [5.5 - 18]; n=8 vs L-arginina 160 μ M [91 - 275], n=8, p<0.05) e a E max (controle 900 \pm 160 mg vs L-arginina 300 \pm 60 mg, n=8, p<0.05, Figura 10). Após a remoção da L-arginina do banho, a potência contrátil e a E max não diferiram do controle.

CINÉTICA DOS INIBIDORES DA ÓXIDO-NÍTRICO SINTASE EM COBAIAS.

Efeitos inibitórios do L-NAME em exudação de proteína plasmáticas

Em vários experimentos, o L-NAME (0.1 μ mol/sítio) foi injetado antes da bradicinina (0.75 nmol/sítio), em tempos que variavam de 0.5 - 16 horas, para a verificação da duração do seu efeito inibidor. Em cada experimento também foi testado o efeito da co-injeção de L-NAME e controle foi feito em sítios injetados com salina.

A inibição da exudação de proteínas plasmáticas induzida pela bradicinina co-injetada com o L-NAME foi 57.6 \pm 2.9% em 6 experimentos (Figura 11a e Tabela 2). Em relação à pré-injeção em períodos de 0.5 - 4 horas o efeito do L-NAME foi maior ou igual ao produzido pela co-injeção (Figura 11 e Tabela 2)

A inibição nos sítios injetados com L-NAME 0.5 hora antes de bradicinina foi significativamente maior (p<0.05; n=6) do que aquele produzido pela co-injeção (Figura 11).

Após 8 horas, o efeito inibidor do L-NAME ainda era significativo (p<0.05; n=6, Tabela 2a), porém não tão potente quanto o da co-injeção (p<0.05, Tabela 2). Após 16 horas esse efeito não era mais observado (Figura 11).

Uma duração de inibição semelhante também foi observada quando o mediador usado foi a histamina (5.4 nmol/sítio, Figura 12 e Tabela 2b).

Quando a dose de L-NAME foi reduzida para 0.02 μ mol/sítio, a co-injeção inibiu a bradicinina em $41.3 \pm 5.4\%$ (Tabela 3).

Os sítios injetados com a dose baixa de L-NAME 0.5 hora antes da bradicinina mostraram significativa ($p < 0.01$, $n=6$) inibição em extravasamento de proteína plasmática (Tabela 3a). O efeito inibidor permaneceu por 2 horas ($p < 0.01$; $n=6$), mas não por 4 horas, enquanto o da co-injeção ainda mostrava efeito (Tabela 3a).

Essa dose baixa de L-NAME não teve efeito quando co-injetada com histamina (5.4 nmol/sítio), mas produziu um efeito significativo ($p < 0.05$; $n=6$) quando injetada 0.5 hora antes da histamina (Tabela 3).

Efeitos do D-NAME e da fenilefrina no extravasamento de proteína plasmática

O D-NAME (0.1 μ mol/sítio) quando co-injetado, ou injetado 0.5 hora antes, não teve efeito significativo no extravasamento de proteína plasmática induzido pela bradicinina (Figura 13). O pequeno efeito visto 0.5 hora antes não foi mais evidente após 2 horas (controle $103.3 \pm 9.1 \mu$ l; D-NAME - pré-injeção: $90.1 \pm 10.4 \mu$ l; $n=6$).

A fenilefrina (5 nmol/sítio) reduziu a resposta da bradicinina quando co-injetada (BK controle $94.2 \pm 7.5 \mu$ l; BK + fenilefrina: $38.2 \pm 7.4 \mu$ l; $p < 0.01$; $n=5$), mas não quando injetada 1 hora ($101.4 \pm 17.1 \mu$ l) ou 0.5 hora antes do mediador (Figura 14).

Efeitos de outros inibidores de NOS no extravasamento de proteína plasmática.

Outros inibidores da NOS como o L-NMMA e o L-NO Arg (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) quando co-injetados com a bradicinina (0.75 nmol/sítio) produziram inibição de $43.4 \pm 2.5\%$ (n=5) e $53.3 \pm 5.4\%$ (n=5) respectivamente.

O efeito inibidor do L-NMMA não foi significativo após 0.5, 2 ou 4 horas (Tabela 4a).

Com respeito ao L-NO Arg, a pré-injeção causou inibição das resposta à bradicinina até 4 horas (Tabela 4b).

O efeito inibidor do L-NO Arg foi maior quando injetado 0.5 hora antes do que quando co-injetado (Tabela 4b).

A co-injeção de L-NMMA com L-NAME ou L-NO Arg não teve efeito cumulativo sobre a resposta da bradicinina (Tabela 5).

Efeitos da L-Arginina

A injeção de L-arginina (10 $\mu\text{mol/sítio}$) 2 horas antes da bradicinina (0.75 nmol/sítio) não teve efeito no extravasamento de proteína plasmática (sal - BK: $94.3 \pm 10.4 \mu\text{l}$; L-Arg - BK: $99.6 \pm 11.5 \mu\text{l}$; n=6).

Quando a L-arginina foi injetada com o L-NAME (2 horas antes), ela reduziu ($p < 0.05$) o efeito inibidor do L-NAME no extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina (sal - BK: $84.2 \pm 3.4 \mu\text{l}$; L-NAME - BK: $25.6 \pm 3.3 \mu\text{l}$; L-NAME + L-arg - BK: $48.0 \pm 4.7 \mu\text{l}$; n=6).

A resposta à bradicinina foi significativamente ($p < 0.05$) aumentada pela co-injeção de L-arginina, enquanto que o efeito produzido pela injeção de L-NAME 2 horas antes de bradicinina não foi revertido pela arginina (Tabela 7, n=6).

Quando o tempo da pré-injeção foi estendido até 4 horas a resposta da bradicinina foi significativamente reduzida ($p < 0.01$) por L-NAME. A co-injeção de L-arginina com bradicinina aumentou significativamente ($p < 0.05$) a resposta

da bradicinina e, com este tempo reverteu significativamente ($p < 0.01$) o efeito inibidor de L-NAME (Tabela 7, $n=6$).

Efeitos no fluxo sanguíneo

O D-NAME ($0.1 \mu\text{mol/sítio}$) não teve efeito no fluxo sanguíneo, enquanto o L-NAME e a fenilefrina (5nmol/sítio) produziram sua redução ($p < 0.01$ e $p < 0.001$ respectivamente; $n=5$; Figura 15).

Quando injetada 0.5 hora antes do ^{133}Xe , a fenilefrina não teve mais efeito, enquanto que os efeitos de D- e L-NAME foram aumentados (apesar de só o L-NAME ser estatisticamente significativo; $p < 0.05$; $n=6$; Figura 16).

Quando o fluxo sanguíneo foi medido 4 horas após as injeções, o D-NAME não teve mais efeito e a redução de fluxo produzida por L-NAME não era mais significativa (sal: $0.1 \pm 9.9\%$; D-NAME: $0.8 \pm 5.3\%$; L-NAME: $-22.2 \pm 5.4\%$; $n=6$). Após 8 horas, o L-NAME não causou mais redução de fluxo sanguíneo mensurável (sal: $3.0 \pm 10.0\%$; L-NAME: $8.2 \pm 11.0\%$; $n=6$).

Numa segunda série de experimentos, os efeitos dos inibidores da NOS (L-NMMA e L-NO Arg) no fluxo sanguíneo foram comparados com os do L-NAME (todos $0.1 \mu\text{mol/sítio}$). Como pode ser visto na Tabela 6, todos os inibidores da NOS produziram reduções similares no fluxo sanguíneo quando co-injetados com ^{133}Xe . Quando o fluxo sanguíneo foi medido 0.5 hora após, somente os efeitos do L-NAME e do L-NO Arg foram similares ou maiores do que aqueles produzidos pela co-injeção com o ^{133}Xe (Tabela 6).

Após 2 horas as reduções no fluxo causadas por L-NAME e L-NO Arg foram semelhantes e, maiores do que por L-NMMA (Tabela 6).

DOADORES DE NO.

Efeitos dos doadores de NO no extravasamento de proteína plasmática.

Os 3 doadores de NO (GTN, SNP e SNAP) foram testados em cobaias, nas doses de 0.001, 0.01 e 0.1 $\mu\text{mol/sítio}$, em extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pela bradicinina (0.5 nmol/sítio, n=6).

O GTN e o SNP não apresentaram efeito no extravasamento de proteína plasmática (Figura 17). O SNAP (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) foi o único que potencializou ($p < 0.05$) o extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina (Figura 17).

Efeitos dos doadores de NO no fluxo sanguíneo.

Os efeitos dos doadores de NO (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$, n=6) no fluxo sanguíneo foram medidos pelo método do *clearance* do ^{133}Xe e seus efeitos comparados com o do vasodilatador PGE_2 (0.3 nmol/sítio).

O GTN não teve efeito no fluxo sanguíneo. Somente a PGE_2 , o SNAP e o SNP produziram aumento no fluxo sanguíneo local (Figura 18).

Efeitos de L-NAME e fenilefrina no extravasamento de proteína plasmática induzido pela bradicinina.

Como mostra a tabela 8, o L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$, n=6), quando co-injetado com bradicinina (0.5 nmol/sítio), reduziu o extravasamento de proteína plasmática.

O GTN (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) não teve efeito sobre a inibição do L-NAME, enquanto que o SNAP e o SNP (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) e a PGE_2 (0.3 nmol/sítio) reverteram o efeito inibidor do L-NAME (Tabela 8).

A fenilefrina (5 nmol/sítio, n=6), quando co-injetada com a bradicinina (0.5 nmol/sítio), também reduziu o extravasamento de proteína plasmática. Este efeito da fenilefrina foi significativamente revertido pela PGE₂, pelo SNAP, pelo SNP, mas não pelo GTN (Tabela 9).

Efeitos dos doadores de NO no fluxo sanguíneo reduzido por L-NAME e pela fenilefrina.

O L-NAME (0.1 μmol/sítio, n=6) e a fenilefrina (5 nmol/sítio, n=6) reduziram o fluxo sanguíneo local da pele de cobaias em 34 e 52 % respectivamente (Tabela 10).

O GTN (0.1 μmol/sítio) não teve efeito no fluxo sanguíneo reduzido pela fenilefrina e, apesar de o fluxo estar um pouco aumentado na presença do L-NAME, este efeito não foi estatisticamente significante (Tabela 10).

A PGE₂ (0.3 nmol/sítio), o SNAP e o SNP (0.1 μmol/sítio) produziram aumentos significativos (p<0.01 e p<0.001) no fluxo, tanto na presença do L-NAME, como na da fenilefrina (Tabela 10).

Efeitos dos doadores de NO no fluxo sanguíneo na presença de bradicinina.

O fluxo sanguíneo em sítios injetados com bradicinina (0.5 nmol/sítio) foi 5.4 ± 15.7 % (n=6) quando comparado com sítios injetados com salina.

O GTN (0.1 μmol/sítio) não teve efeito significativo no fluxo sanguíneo estimulado pela bradicinina (40.6 ± 23.3 %, n=6), enquanto que o SNAP e o SNP (0.1 μmol/sítio) produziram aumentos semelhantes (p<0.01) no fluxo sanguíneo na presença de bradicinina (141.8 ± 16.4 e 130.2 ± 17.9 % respectivamente, n=6).

Tabela 1 Efeito da arginina (L- e D-arg) e da lisina (L-lis) nas respostas contráteis de íleo de cobaia *in vitro*

Tratamento	EC50
a) Histamina sozinha	0.4 (0.1 - 1.5) μ M
+ L-arg 100 mM	*68.3 (8.3 - 563.2) μ M
Histamina sozinha	113 (60 - 211) nM
+D-arg 100 mM	*3800 (2000 - 7400) nM
Histamina sozinha	71 (12 - 426) nM
+L-lis 100 mM	188 (63 - 560) nM
b) bradicinina sozinha	32.4 (16.7 - 62.5) nM
+L-arg 100 mM	53.7 (37.2 - 77.4) nM

Os valores são médias geométricas (95% limite de confiança) dos valores de EC50 para (a) histamina e (b) bradicinina em 4 - 6 experimentos em íleo de cobaia. Contrações isométricas foram medidas em soluções de Krebs sozinha ou contendo o aminoácido especificado. * $p < 0.05$ comparado com o mediador sozinhos.

Tabela 2 Duração dos efeitos do L-NAME em extravasamento de proteína plasmática.

a)

	Tempo da pré-injeção (h)		
	1	2	8
BK	106.2 ± 15.1	88.0 ± 10.4	92.1 ± 8.2
PRE	35.2 ± 6.9**	37.6 ± 6.3**	62.9 ± 5.2*
CO	50.7 ± 7.2**	40.9 ± 7.0**	37.4 ± 3.3**#

b)

HA	72.5 ± 6.5
PRE	50.4 ± 4.5**
CO	31.7 ± 2.2**#

Comparação de pré-injeção (PRE) com co-injeção (CO) de L-NAME (0.1 µmol/sítio) em extravasamento de proteína plasmática em resposta a (a) bradicinina (BK, 0.75 nmol/sítio) ou (b) histamina (HA, 5.4 nmol/sítio). Os sítios foram pré-injetados com salina (BK, HA e CO) ou com L-NAME (PRE) no tempo especificado antes da injeção do mediador (BK ou HA e PRE) ou , mediador + L-NAME (CO). Os valores são média ± erro padrão da média do volume extravasado (µl) corrigidos pelos respectivos controles, n=6 * p<0.05, p<0.01 vs mediador; # p<0.05 vs pré-injeção.

Tabela 3 Duração dos efeitos da dose baixa do L-NAME no extravasamento de proteína plasmática.

a)	Tempo da pré-injeção (h)		
	0.5	2	4
BK	121.0 ± 11.8	101.0 ± 9.0	75.7 ± 6.7
PRE	53.5 ± 7.7**	61.1 ± 9.2**	58.8 ± 5.0
CO		53.5 ± 4.5**	40.6 ± 5.5**
b)			
HA	78.6 ± 7.2		
PRE	47.1 ± 6.7*		
CO	60.4 ± 8.6		

Comparação de pré-injeção (PRE) com co-injeção (CO) de L-NAME (0.02 $\mu\text{mol/sítio}$) em extravasamento de proteína plasmática em resposta a (a) bradicinina (BK, 0.75 nmol/sítio) ou (b) histamina (HA, 5.4 nmol/sítio). Os sítios foram pré-injetados com salina (BK, HA e CO) ou com L-NAME (PRE) no tempo especificado antes da injeção do mediador (BK ou HA e PRE) ou , mediador + L-NAME (CO). Os valores são média \pm erro padrão da média do volume extravasado (μl) corrigidos pelos respectivos controles, n=6 * p<0.05, ** p<0.01 vs mediador.

Tabela 4 Duração dos efeitos do L-NMMA e do L-NO Arg no extravasamento de proteína plasmática.

a)	Tempo da pré-injeção (h)		
	0.5	2	4
BK	83.7 ± 9.0	112.1 ± 14.1	94.5 ± 12.0
PRE	65.0 ± 15.4	100.8 ± 6.2	98.2 ± 9.6
CO	47.0 ± 4.1*	74.2 ± 8.5*#	51.1 ± 6.1**##
b)			
BK	70.3 ± 1.9	126.2 ± 12.6	83.5 ± 7.6
PRE	29.4 ± 4.7*	73.7 ± 8.8**	53.2 ± 9.2*
CO	44.2 ± 3.4*#	57.5 ± 7.4**	24.2 ± 1.9**#

Comparação de pré-injeção (PRE) com co-injeção (CO) de 0.1 µmol/sítio de (a) L-NMMA or (b) L-NO Arg em extravasamento de proteína plasmática em resposta a bradicinina (BK, 0.75 nmol/sítio). Os sítios foram pré-injetados com salina (BK e CO) ou com L-NMMA ou L-NO Arg (PRE) nos tempos especificados antes da injeção de bradicinina (BK e PRE) ou bradicinina + L-NMMA ou L-NO Arg (CO). Os valores são média ± erro padrão da média do volume extravasado (µl) corrigidos pelos respectivos controles, n=6 * p<0.05, ** p<0.01 vs mediador; #p<0.05, ##p<0.01 vs pré-injeção.

Tabela 5 Efeito da combinação de inibidores da NOS no extravasamento de proteína plasmática mediada pela bradicinina.

	volume plasmático (μ l)	
BK	72.6 \pm 12.1	54.5 \pm 1.8
BK + LN	27.0 \pm 2.1**	
BK + L-NMMA	39.2 \pm 5.1*	28.6 \pm 1.5**
BK + LN + L-NMMA	23.9 \pm 6.1**	
BK + LNOArg		25.6 \pm 2.8**
BK + L-NMMA + LNOArg		19.1 \pm 0.7**

Comparação de co-injeção de L-NAME, L-NMMA ou L-NO Arg sozinhos (0.1 μ mol/sítio) ou combinados no extravasamento de proteína plasmática induzidos por bradicinina (BK, 0.75 nmol/sítio). Os valores são média \pm erro padrão da média do volume extravasado (μ l) corrigidos pelos respectivos controles, n=5-6
* p<0.05, ** p<0.01 vs mediador.

Tabela 6 Efeito dos inibidores da NOS no fluxo sanguíneo

	Tempo da pré-injeção (h)		
	0	0.5	2
L-NAME	-35 ± 6	-46 ± 2	-36 ± 3
L-NO Arg	-30 ± 5	-37 ± 3	-28 ± 3
L-NMMA	-30 ± 5	-17 ± 3**	-8 ± 4**

Efeito de L-NAME, L-NO Arg e L-NMMA (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) no fluxo sanguíneo medido como *clearance* do ^{133}Xe . Os sítios foram pré-injetados com um volume de 0.1 ml contendo salina ou os inibidores de NOS nos tempos especificados antes da injeção de 0.1 ml de salina contendo ^{133}Xe e medidos após 15 minutos. Valores são média \pm erro padrão da média (porcentagem em relação a salina). n=6; ** p<0.01 em relação aos valores de L-NO Arg ou L-NAME.

Tabela 7 Efeito da L-arginina no extravasamento de proteína plasmática

pré-injeção	2 ^a injeção após 2 horas	plasma (μ l)
salina	BK	71.7 \pm 5.0
salina	BK + L-arg	99.1 \pm 9.7*
L-NAME	BK	35.4 \pm 5.4**
L-NAME	BK + L-arg	55.6 \pm 5.1 NS

pré-injeção	2 ^a injeção após 4 horas	plasma (μ l)
salina	BK	94.0 \pm 7.7
salina	BK + L-arg	123.4 \pm 6.3*
L-NAME	BK	38.0 \pm 2.4**
L-NAME	BK + L-arg	80.7 \pm 5.5###

Efeito da L-arginina (L-arg; 10 μ mol/sítio) na inibição causada por L-NAME (0.1 μ mol/sítio) em extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina (BK; 0.75 nmol/sítio). Os valores são média \pm erro padrão da média do volume extravasado (μ l) corrigidos pelos respectivos controles, n=6 * p<0.05, ** p<0.01 vs mediador, ###p<0.01, NS p>0.05 vs L-NAME.

Tabela 8 Efeitos de SNAP, SNP, GTN e PGE₂ sobre a inibição do L-NAME

a)

BK	67.7 ± 7.9
BK + L-NAME	32.2 ± 3.5*
BK + LNAME + SNAP	145.4 ± 10.6***
BK + L-NAME + SNP	106.5 ± 12.9*

b)

BK	67.7 ± 9.5
BK + L-NAME	23.8 ± 4.0 **
BK + LNAME + GTN	49.6 ± 6.5
BK + L-NAME + PGE ₂	69.3 ± 9.3##

Efeitos de SNAP, SNP, GTN, L-NAME (0.1 μmol/sítio) e PGE₂ (0.3 nmol/sítio) em extravasamento de proteína plasmática induzida por bradicinina (BK, 0.5 nmol/sítio).

Os valores são expressos como μl de plasma (valores corrigidos) e média ± erro padrão da média, n=6.***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs BK; ##p<0.001 vs BK+LNAME.

Tabela 9 Efeitos de SNAP, SNP, GTN e PGE₂ sobre a inibição da fenilefrina

a)

BK	63.4 ± 8.0
BK + fenilefrina	15.9 ± 4.2**
BK + fenilefrina + SNP	62.8 ± 6.2
BK + fenilefrina + PGE ₂	64.4 ± 11.1

b)

BK	55.7 ± 9.1
BK + fenilefrina	11.6 ± 3.8**
BK + fenilefrina + GTN	25.0 ± 4.8*
BK + fenilefrina + SNAP	100.0 ± 14.3

Efeitos de SNAP, SNP, GTN (0.1 μmol/sítio), fenilefrina (5 nmol/sítio) e PGE₂ (0.3 nmol/sítio) em extravasamento de proteína plasmática induzida por bradicinina (BK, 0.5 nmol/sítio). Os valores são expressos como μl de plasma (valores corrigidos) e média ± erro padrão da média, n=6. **p<0.01, *p<0.05 vs BK.

Tabela 10 Medidas do fluxo sanguíneo.

Tratamento	^{133}Xe Clearance (%)	p
L-NAME (0.1 μmol)	-33.9 \pm 7.6	
+GTN (0.1 μmol)	+23.9 \pm 9.6	NS
+PGE ₂ (0.3 nmol)	+154.2 \pm 15.0	<0.001
+SNAP (0.1 μmol)	+165.9 \pm 23.8	<0.001
+SNP (0.1 μmol)	+199.9 \pm 32.5	<0.001
Fenilefrina (5nmol)	-52.4 \pm 7.8	
+GTN (0.1 μmol)	-35.2 \pm 14.1	NS
+PGE ₂ (0.3 nmol)	+80.4 \pm 9.4	<0.01
+SNAP (0.1 μmol)	+165.3 \pm 33.7	<0.001
+SNP (0.1 μmol)	+123.8 \pm 28.9	<0.001

Efeitos de SNAP, SNP, GTN, L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$), fenilefrina (5 nmol/sítio) e PGE₂ (0.3 nmol/sítio) em fluxo sanguíneo medido pelo método de *clearance* do ^{133}Xe .

Os valores são média \pm erro padrão da média (n=6), porcentagem em relação ao controle (salina). NS=não significativo.

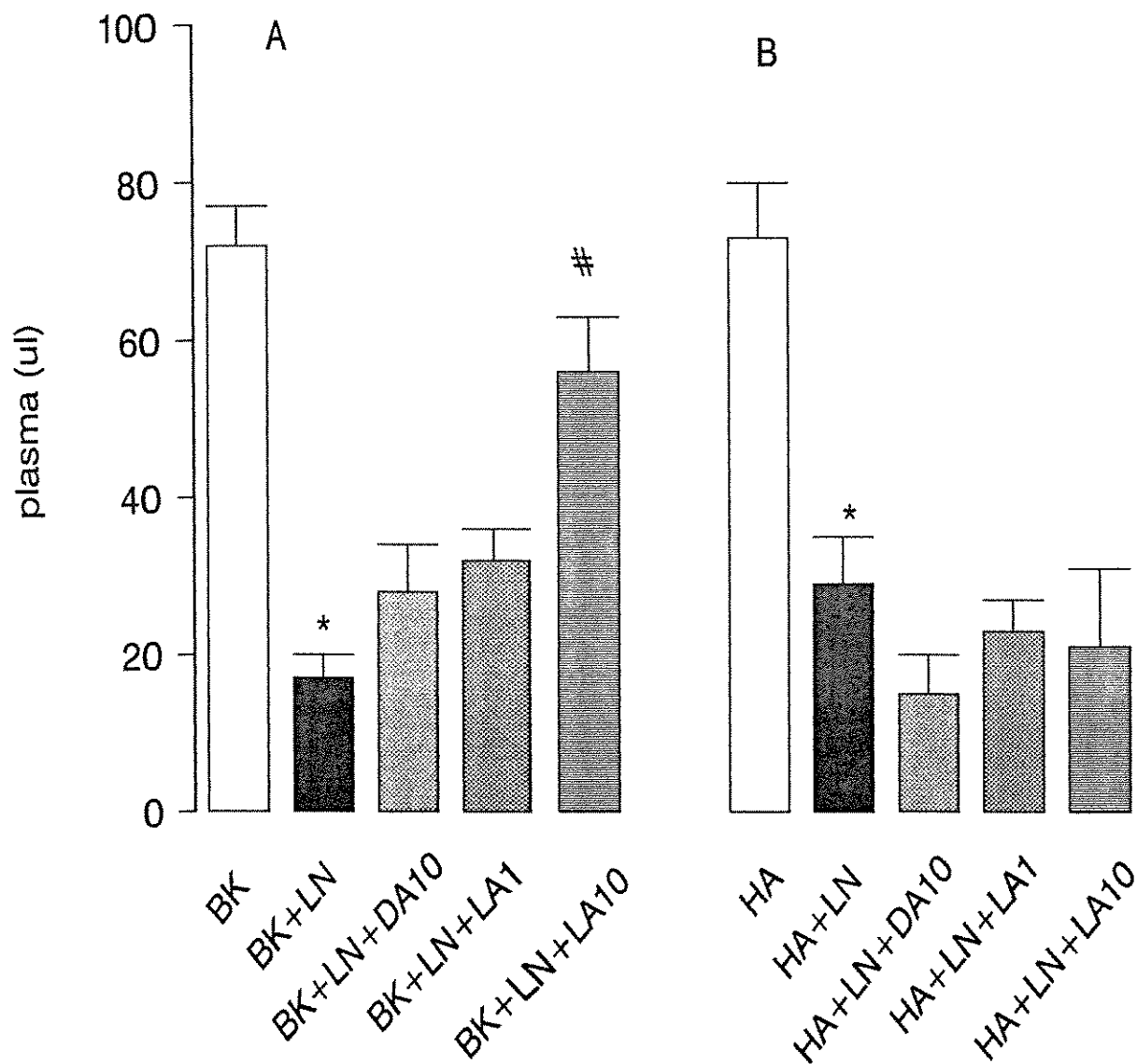


Figura 1 Efeitos de D-e L-arginina na inibição de L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) sobre as respostas de (a) bradicinina (BK, 0.5 nmol/sítio, n=5) ou (b) histamina (HA, 4.5 nmol/sítio; n=5). Coluna aberta resposta ao mediador sozinho; coluna cheia mediador + L-NAME (BK+LN ou HA+LN); coluna hachurada com L-NAME + D-arginina (BK+LN+DA10 ou HA+LN+DA10, 10 $\mu\text{mol/sítio}$); coluna hachurada (BK+LN+LA1 ou HA+LN+LA1) com 1 μmol L-arginina ou coluna riscada 10 $\mu\text{mol/sítio}$ L-arginina (BK+LN+LA10 ou HA+LN+LA10). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média \pm erro padrão da média.

* $p < 0.01$ comparados com o mediador sozinho; # $p < 0.05$ comparados com mediador + L-NAME

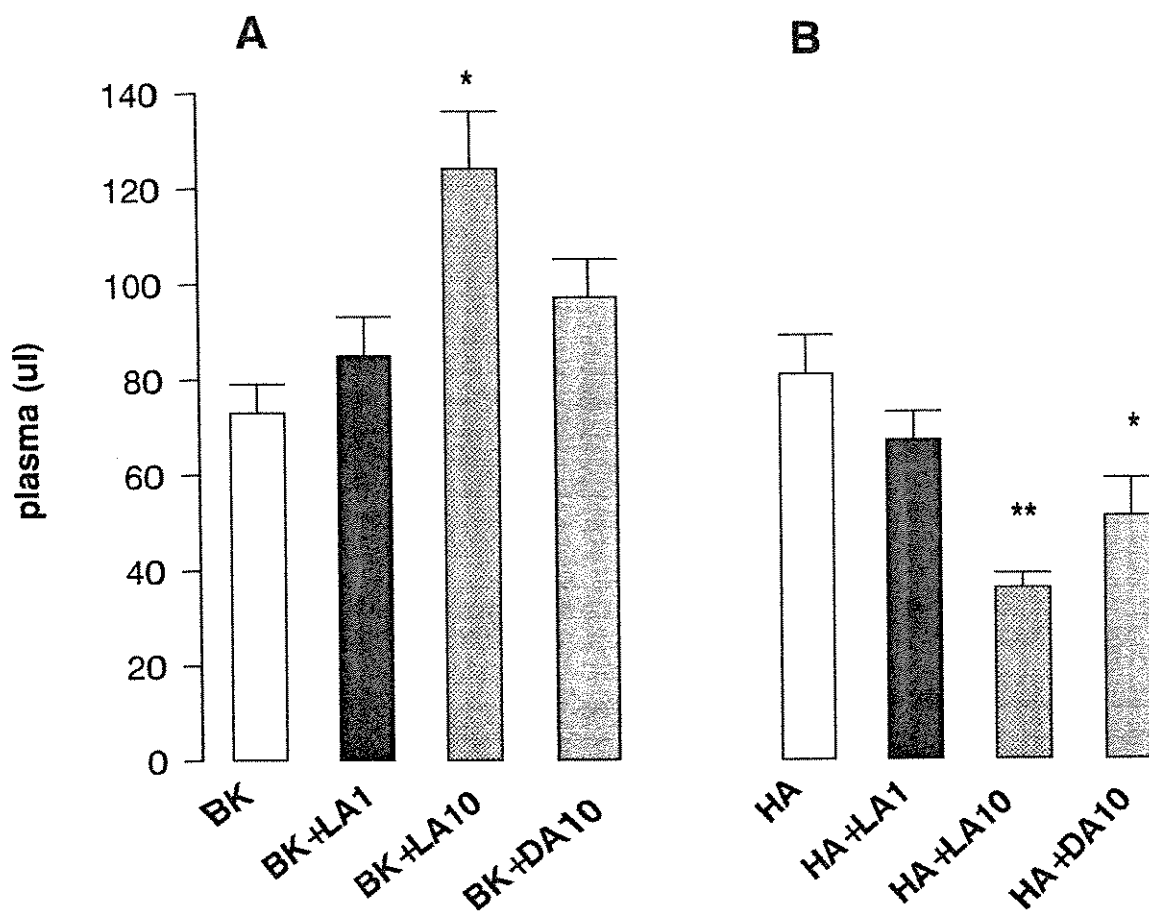


Figura 2 Efeitos de D- e L-arginina no extravasamento de proteína plasmática causado por (a) bradycinin (BK, 0.5 nmol/sítio, n=5) ou (b) histamina (HA, 4.5 nmol/sítio; n=5). Coluna aberta resposta ao mediador sozinho ou na presença de 1 μmol (BK+LA1 ou HA+LA1) ou 10 μmol/sítio de L-arginina (BK+LA10 ou HA+LA10) ou 10 μmol/sítio D-arginina (BK+DA10 ou HA+DA10). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média ± erro padrão da média.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparados com o mediador sozinho.

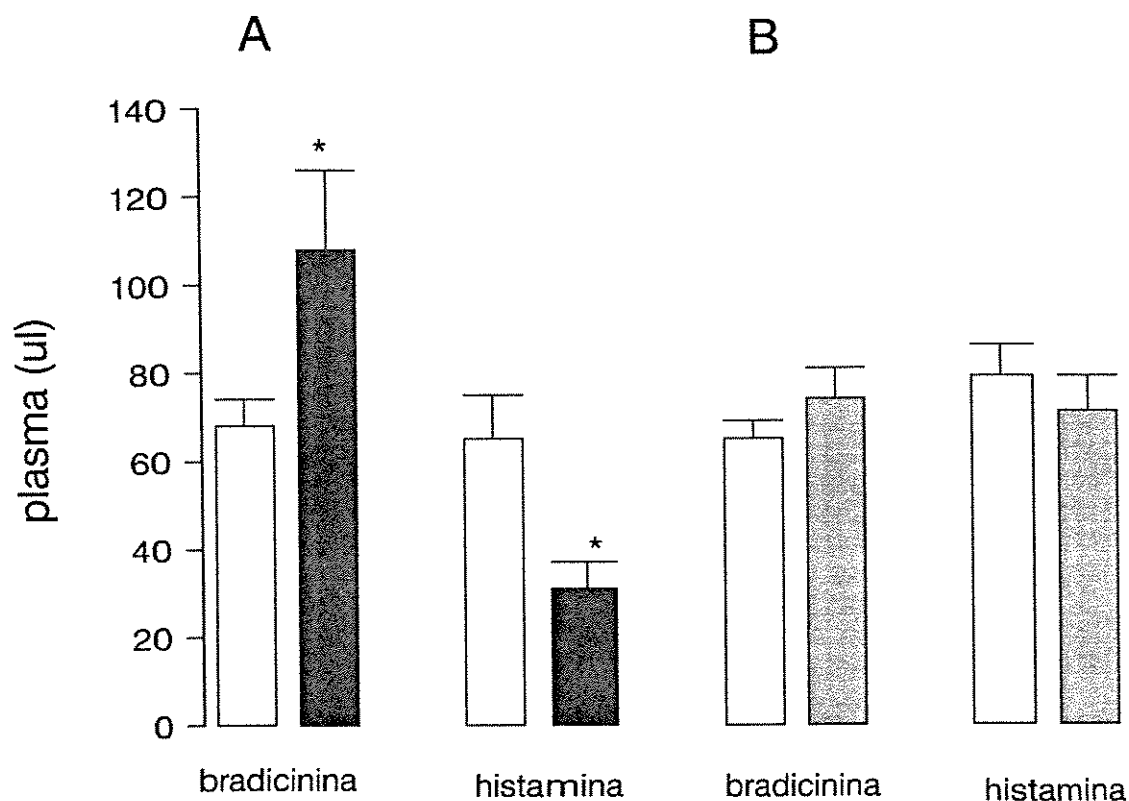


Figura 3 Comparação dos efeitos de (a) L-arginina (10 $\mu\text{mol/sítio}$, coluna sólida; $n=5$) ou (b) L-lisina 10 $\mu\text{mol/sítio}$, coluna hachurada; $n=6$) em extravasamento de proteína induzido por bradycininina (0.5 nmol/sítio) ou histamina (4.5 nmol/sítio). Coluna aberta mediador sozinho. Os resultados são expressos em μl de plasma, (valores corrigidos pelos seus devidos controles), média \pm erro padrão da média.

* $p < 0.05$, comparados com o mediador sozinho

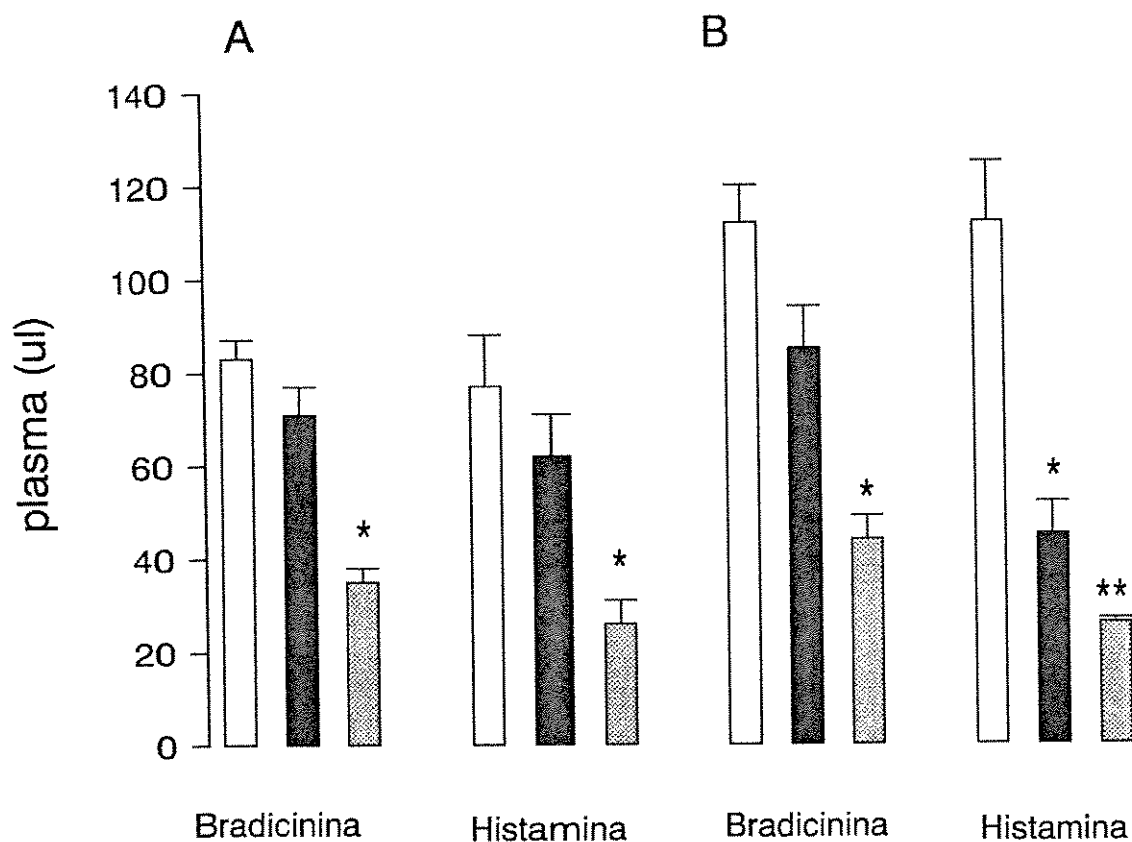


Figura 4 Comparação dos efeitos de (a) fenilefrina (0.3 ou 6 nmol/sítio; n=6) ou (b) isoprenalina (0.5 ou 10 nmol/sítio; n=6) em extravasamento de proteína induzido por bradicinina (0.5 nmol/sítio) ou histamina (4.5 nmol/sítio) Respostas ao mediador sozinho (coluna aberta) ou na presença de (a) 0.3 nmol/sítio (coluna sólida) ou 6 nmol/sítio (coluna hachurada) de fenilefrina ou (b) 0.5 nmol (coluna sólida) ou 10 nmol (coluna hachurada) de isoprenalina. Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média \pm erro padrão da média.
* p<0.05, ** p<0.01 comparados com o mediador sozinho.

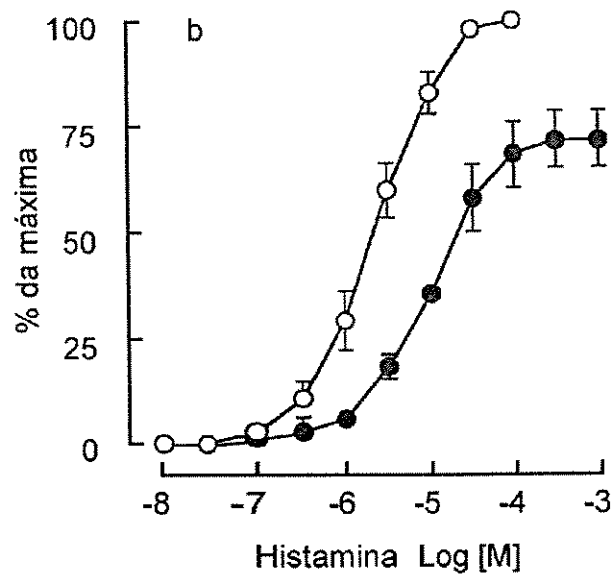
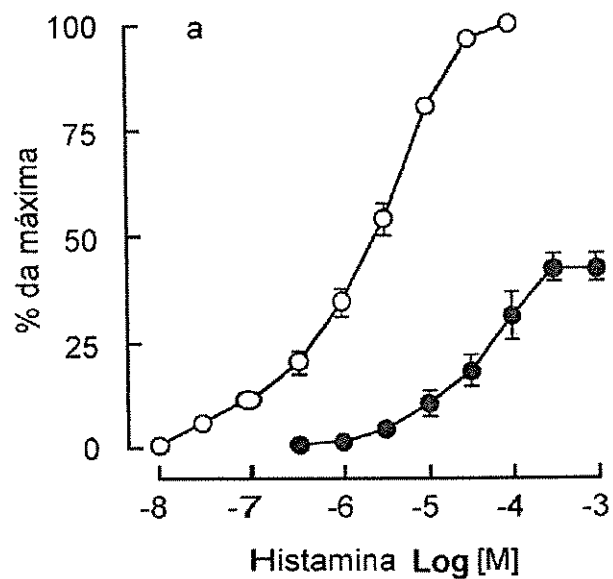


Figura 5 Curvas dose-efeito da histamina na ausência (círculos abertos) ou presença (círculos fechados) de (a) L-arginina (100 mM), (b) D-arginina (100 mM) na traquéia isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

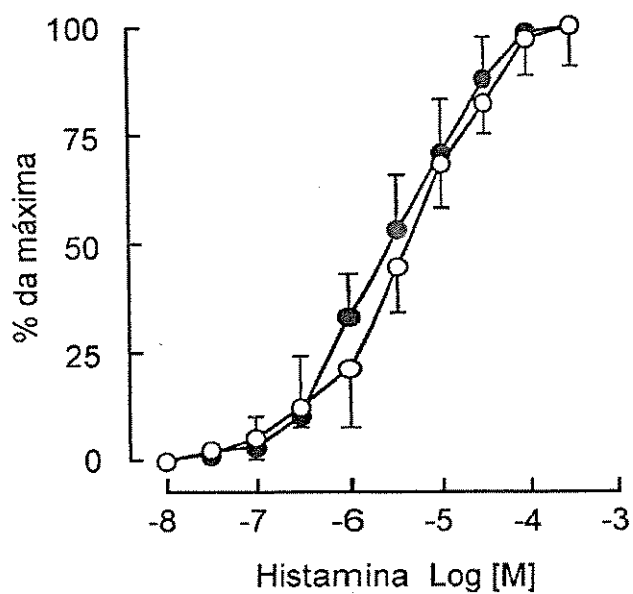


Figura 6 Curvas dose-efeito da histamina na ausência (círculos abertos) ou presença (círculos fechados) de L-lisina (100 mM) na traquéia isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 4 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

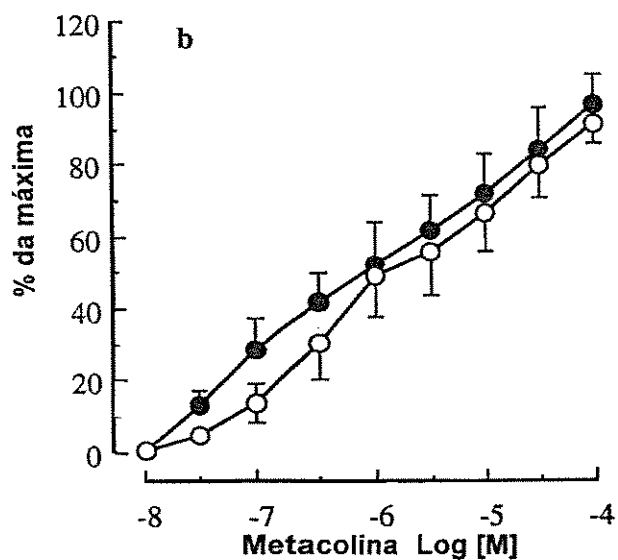
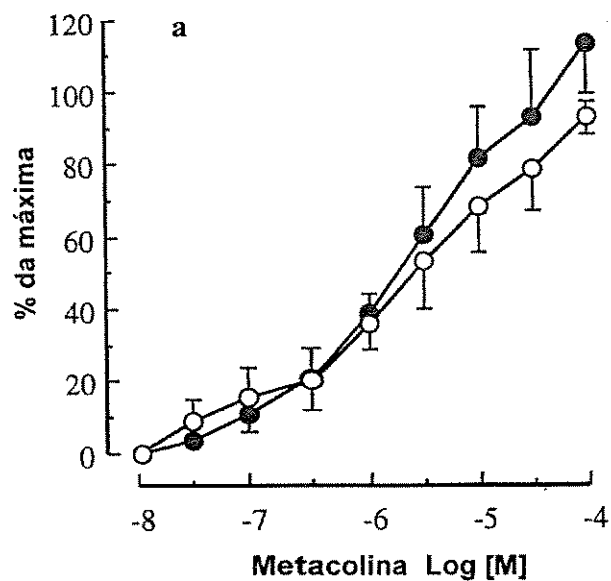


Figura 7 Curvas dose-efeito da metacolina na ausência (círculos abertos) ou presença (círculos fechados) de (a) L-arginina (100 mM), (b) D-arginina (100 mM) na traquéia isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 4 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

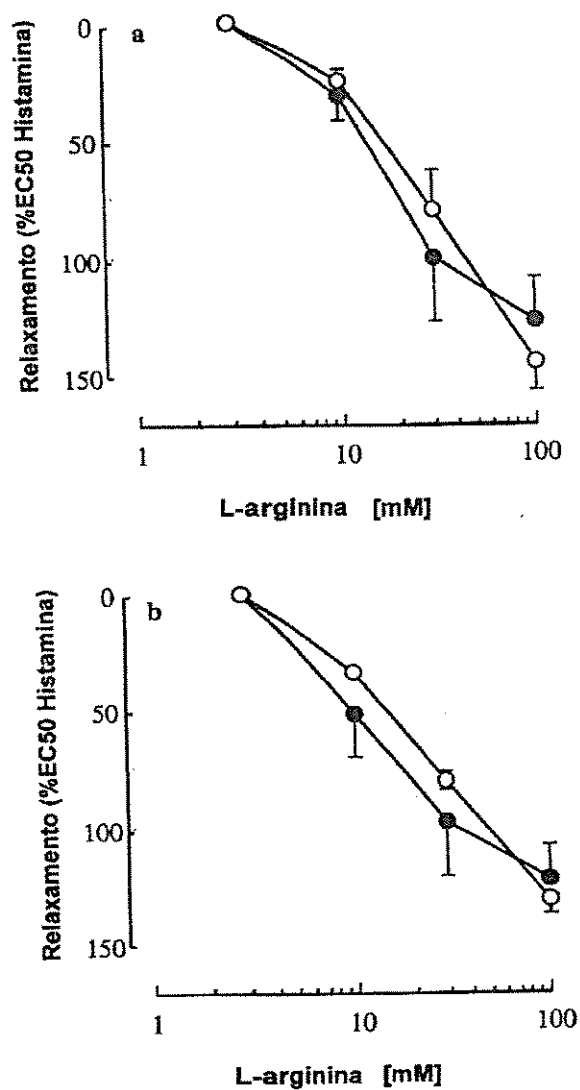


Figura 8 Curva de relaxamento da L-arginina na (a) ausência ou (b) presença de L-NAME (50 μ M) em traquéia isolada de cobaia pr -contraida com histamina (EC50) com epitélio (círculos abertos) ou sem epitélio (círculos fechados). Cada ponto representa a média de 6 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

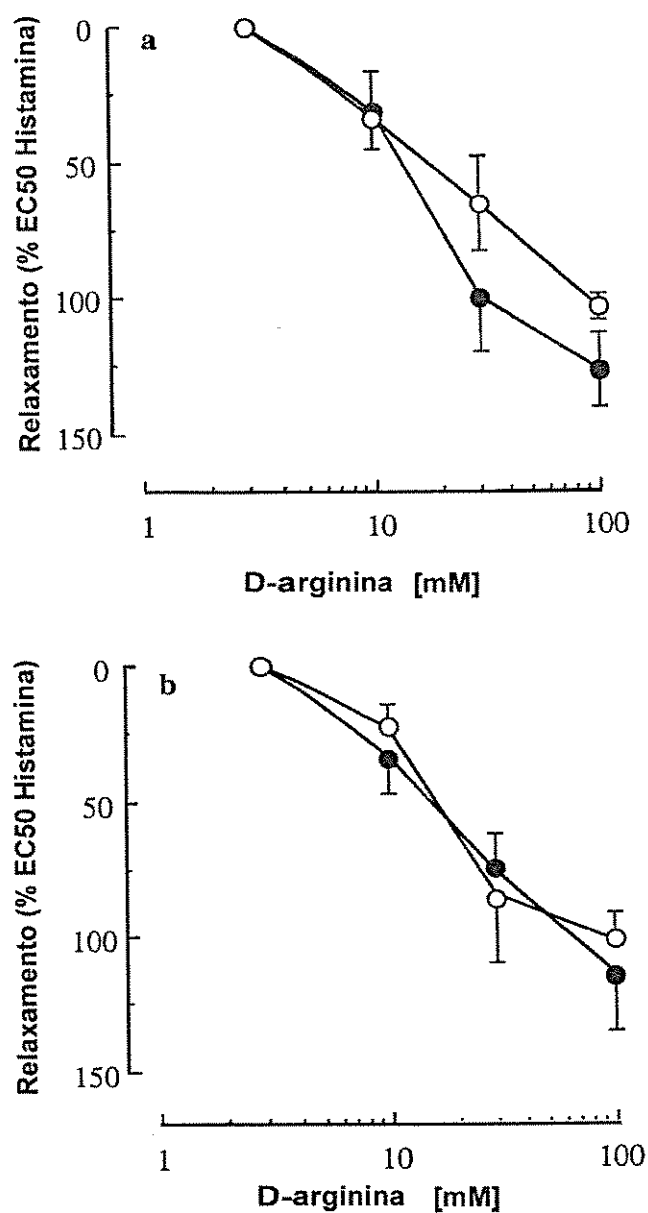


Figura 9 Curva de relaxamento da D-arginina na (a) ausência ou (b) presença de L-NAME (50 μ M) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída com histamina (EC50) com epitélio (círculos abertos) ou sem epitélio (círculos fechados). Cada ponto representa a média de 6-7 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

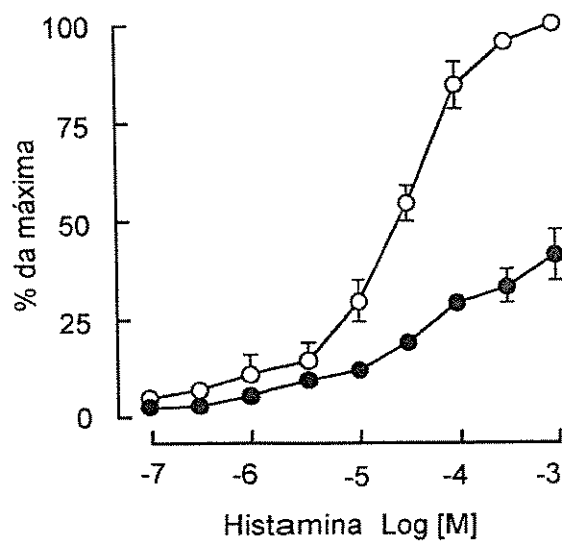


Figura 10 Curvas dose-efeito da histamina na ausência (círculos abertos) ou presença (círculos fechados) de L-arginina (100 mM), em brônquio isolado de coelho. Cada ponto representa a média de 8 experimentos \pm erro padrão da média. Indometacina (5 μ M) presente no Krebs.

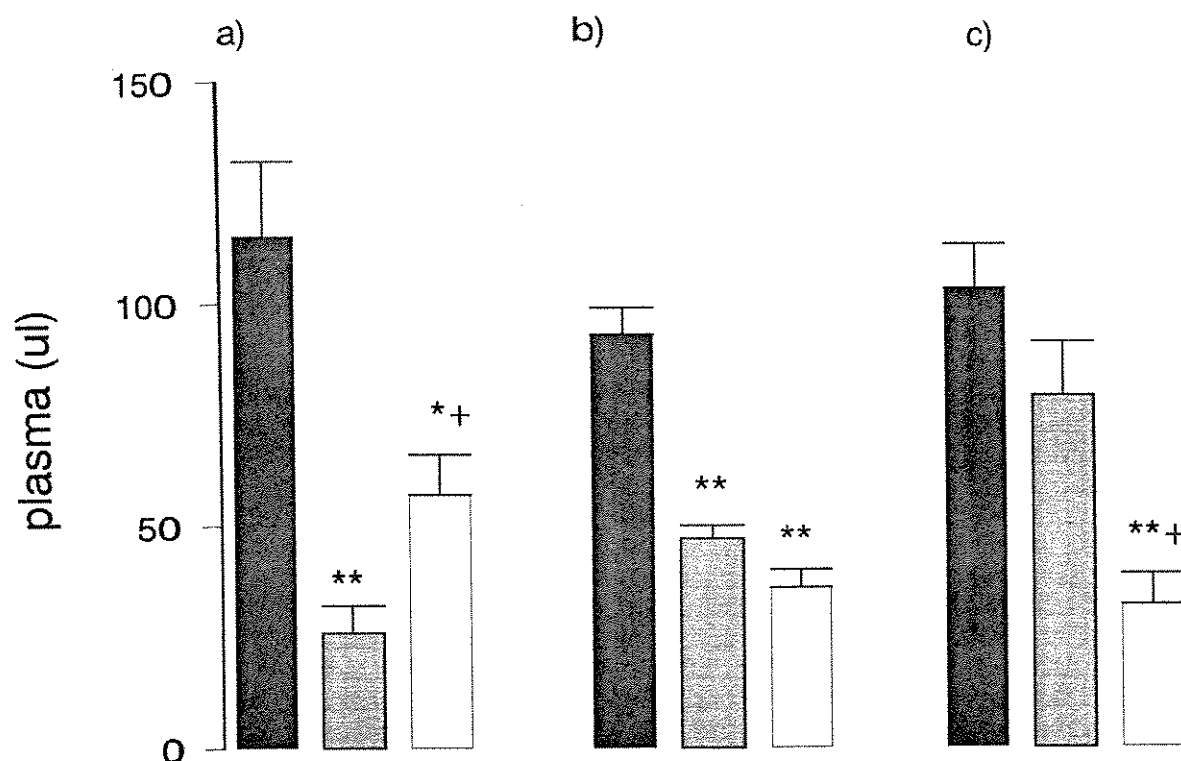


Figura 11 Duração dos efeitos inibitórios de L-NAME ($0.1 \mu\text{mol/sítio}$) no extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina (0.75 nmol/sítio). Respostas ao mediador sozinho (coluna cheia); ou L-NAME pré-injetado (a) 0.5 h (b) 4 h e (c) 16 h (coluna riscada) ou co-injetada com bradicinina (coluna aberta). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs controle; + $p < 0.05$ vs pré-injeção; $n=6$.

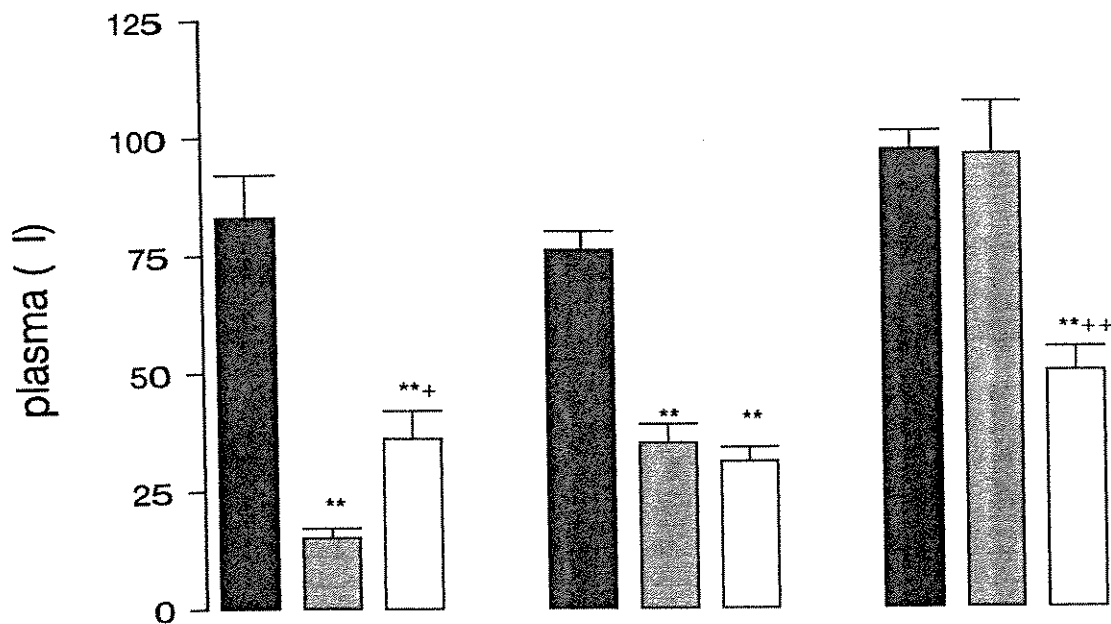


Figura 12 Duração dos efeitos inibitórios de L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) no extravasamento de proteína plasmática induzido por histamina (5.4 nmol/sítio). Respostas ao mediador sozinho (coluna cheia); ou L-NAME pré-injetado (a) 0.5 h (b) 4 h e (c) 16 h (coluna riscada) ou co-injetada com histamina (coluna aberta). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média \pm erro padrão da média.

** $p < 0.01$ vs controle; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs pré-injeção; $n=6$.

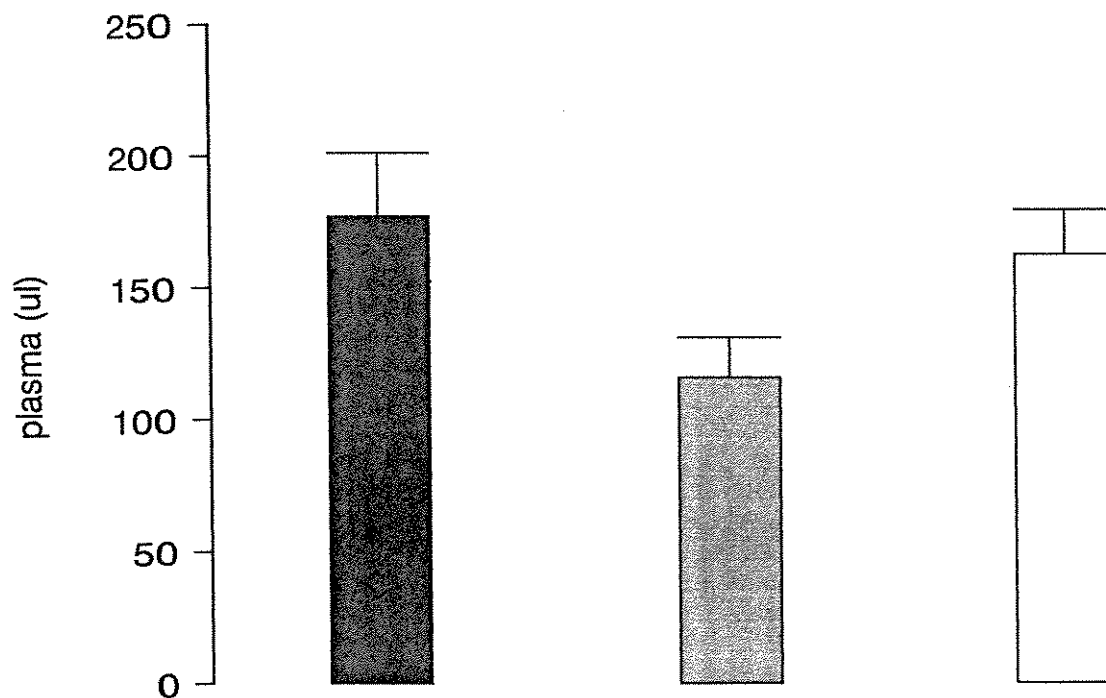


Figura 13 Efeitos de D-NAME ($0.1 \mu\text{mol/sítio}$) no extravasamento de proteína plasmática induzido por bradycininina (0.75 nmol/sítio). Respostas ao mediador sozinho (coluna cheia); ou D-NAME pré-injetado 0.5 h antes (coluna riscada) ou co-injetada com bradycininina (coluna aberta). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controlos, em média \pm erro padrão da média, $n=6$.

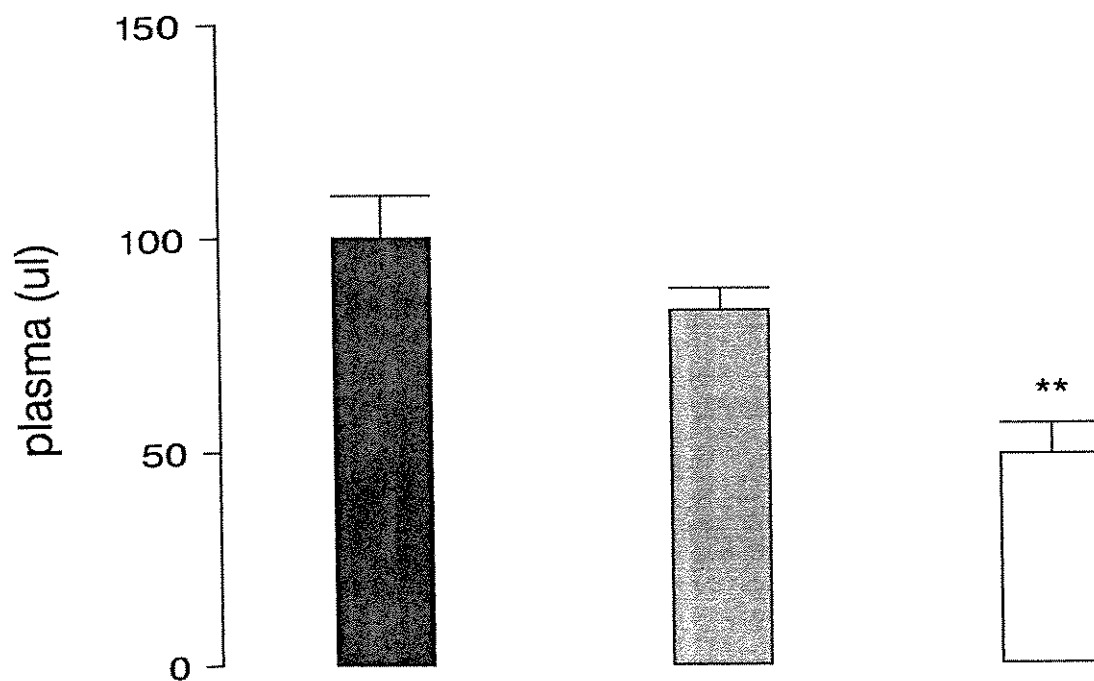


Figura 14 Efeitos da fenilefrina (5 nmol/sítio) no extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina (0.75 nmol/sítio). Respostas ao mediador sozinho (coluna cheia); ou fenilefrina pré-injetada 0.5 h antes (coluna riscada) ou co-injetada com bradicinina (coluna aberta). Os resultados são expressos como μl de plasma, corrigidos pelos seus devidos controles, em média \pm erro padrão da média. ** $p < 0.01$ vs controle, $n=4$.

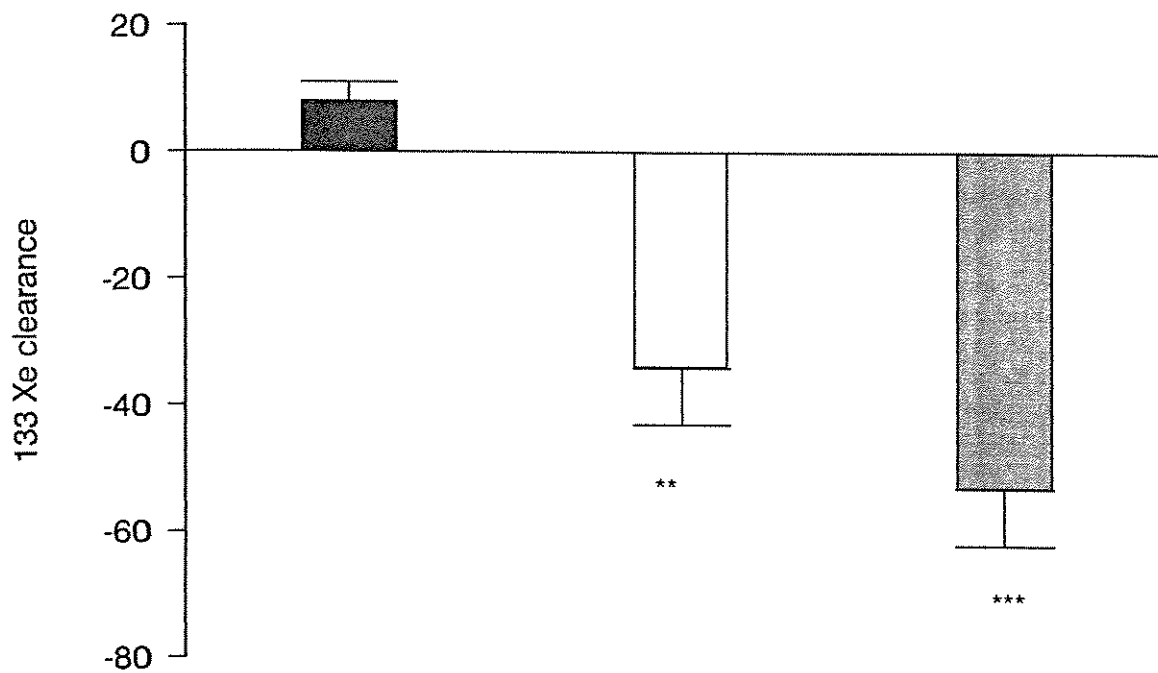


Figura 15 Efeitos de D-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; coluna sólida), L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; coluna aberta) e fenilefrina (5 n mol/sítio; coluna riscada) em fluxo sanguíneo medido como *clearance* do ^{133}Xe . Sítios foram injetados com um volume de 0.1 ml contendo a droga teste e 0.08 Mbq de ^{133}Xe , e medido após 15 minutos. Os valores são expressos em % quando comparados com salina (média \pm erro padrão da média), n=5.

** p<0.01, ***p<0.001 vs D-NAME.

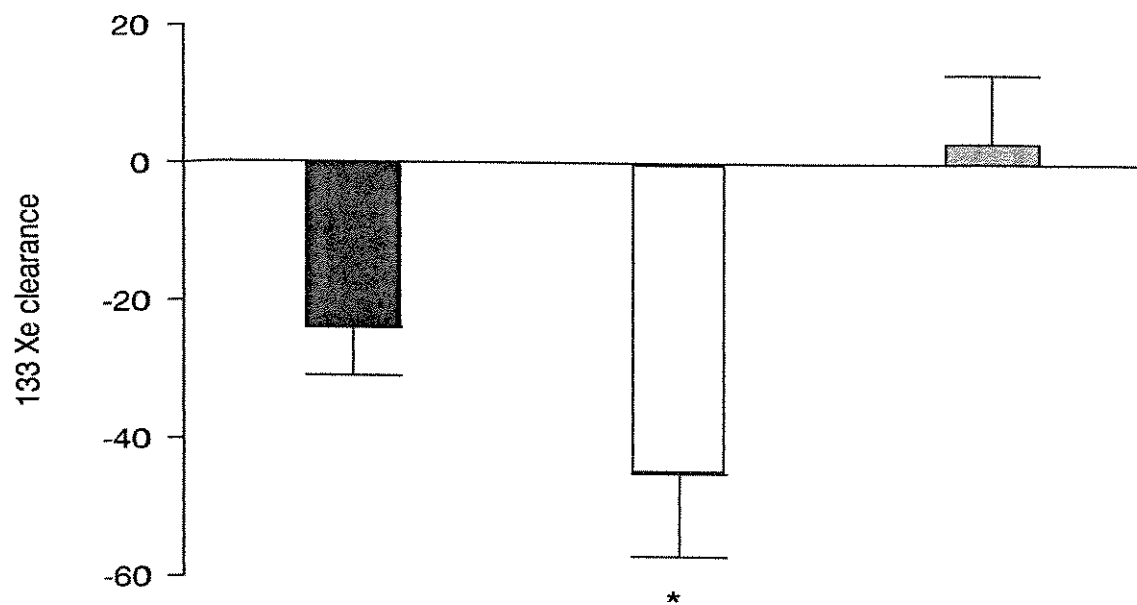


Figura 16 Efeitos da pré-injeção de D-NAME 0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; coluna sólida), L-NAME (0.1 $\mu\text{mol/sítio}$; coluna aberta) e fenilefrina (5 n mol/sítio; coluna riscada) em fluxo sanguíneo medido como *clearance* do ^{133}Xe . Sítios foram injetados com um volume (0.1 ml) de salina contendo 0.08 Mbq de ^{133}Xe , e medido após 15 minutos. Os valores são expressos em % quando comparados com salina (média + erro padrão da média), n=5.
* $p < 0.05$ vs fenilefrina.

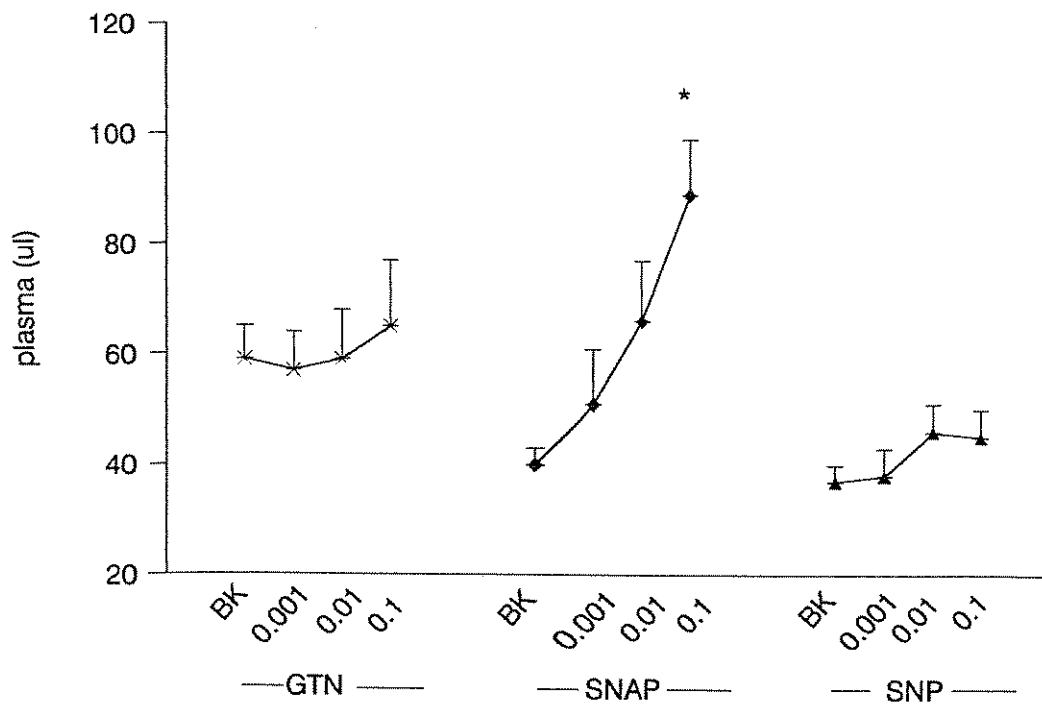


Figura 17 Efeitos de GTN, SNAP e SNP (0.001, 0.01 e 0.1 $\mu\text{mol/sítio}$) em extravasamento de proteína plasmática (μl) induzido por bradicinina (BK, 0.5 nmol/sítio). Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média, $n=6$, $*p<0.05$.

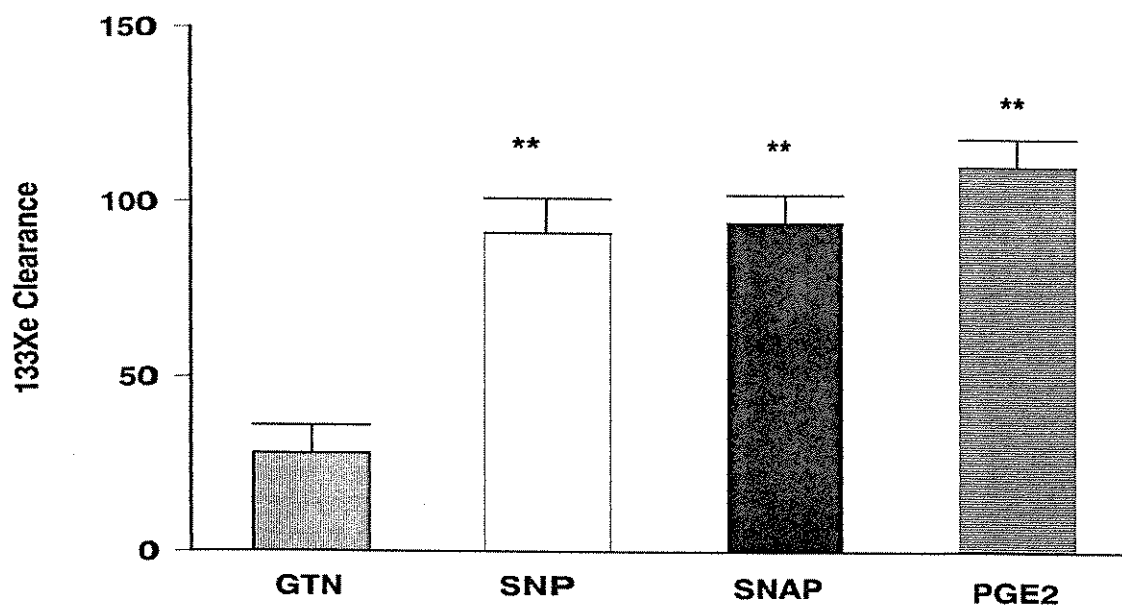


Figura 18 Efeitos de GTN, SNP, SNAP ($0.1 \mu\text{mol/sítio}$) e PGE₂ (0.3nmol/sítio) no fluxo sanguíneo, medido pelo *clearance* do ^{133}Xe . Os valores são média \pm erro padrão da média em porcentagem comparados com controle (salina). $n=6$, ** $p<0.01$.

DISCUSSÃO

AÇÃO DA BRADICININA E HISTAMINA NA PERMEABILIDADE CUTÂNEA DE COBAIAS.

A habilidade de L- mas não D-NAME, em inibir a permeabilidade cutânea induzida pela bradicinina e pela histamina em pele de cobaia amplia a observação de que o L-NAME inibe o extravasamento de proteína em pele de coelhos induzido por polication e antígenos (Paul *et al.*, 1992a).

Fica evidente, portanto, que os inibidores da NOS podem inibir edema induzido por vários outros estímulos (Antunes *et al.*, 1990; Hughes *et al.*, 1990; Antunes *et al.*, 1992; Ialenti *et al.*, 1992).

No rato, o L-NAME reduz o fluxo sanguíneo na pele em doses que inibem o extravasamento de proteínas causado pela substância P (Hughes *et al.*, 1990). Esse fato é compatível com o conceito de que o L-NAME pode reduzir a permeabilidade cutânea ao reduzir a produção de NO (basal ou induzida por mediadores), reduzindo assim o fluxo sanguíneo local.

Em nossos experimentos o L-NAME teve efeito inibidor maior com bradicinina do que com histamina. A isoprenalina, um agente anti-permeabilizante que age via receptores beta adrenérgicos, teve efeito inibidor maior nas resposta da histamina do que da bradicinina.

Existe ampla evidência de que a isoprenalina, assim como outros agonistas beta adrenérgicos, age de maneira contrária aos efeitos dos mediadores inflamatórios na contração das células endoteliais (Persson & Svensjo, 1985; Grega, 1986). O fato de o L-NAME e a isoprenalina terem efeitos contrários sugere diferentes mecanismos de ação.

As respostas do L-NAME também contrastam com os efeitos da fenilefrina, um vasoconstritor que age via receptores alfa adrenérgicos e que apresentou efeito semelhante com ambos mediadores. Como a fenilefrina não tem seletividade quanto ao agonista, os resultados com L-NAME sugerem que o NO tem papel

mais importante no extravasamento causado pela bradicinina do que pela histamina.

Pode ser também que o L-NAME atue por outros mecanismos além da redução do fluxo sanguíneo. Por exemplo, a endotelina-1 (que é um potente vasoconstritor na microcirculação; Brain *et al.*, 1988; 1989; Fortes *et al.*, 1989) inibe o edema induzido pelo PAF em doses que não têm efeito com bradicinina, 5 hidroxitriptamina ou histamina na pata de camundongo, sugerindo não estar agindo somente via vasoconstrição (Henriques *et al.*, 1992).

Os efeitos da L-arginina na potencialização das resposta da bradicinina podem ser o resultado do aumento de substrato, levando à maior produção de NO, embora os níveis de L-arginina intracelular já sejam relativamente altos (Mitchell *et al.*, 1990). A L-arginina, mas não a D-arginina, aumenta o extravasamento de proteína em pele de rato em resposta à carragenina e edema em pata de rato em resposta à carragenina ou ao dextram (Ialenti *et al.*, 1992). É interessante notar que a L-arginina e, em menor grau a D-arginina inibem resposta à histamina em pele e em íleo de cobaia.

Isto confirma trabalhos prévios que mostraram que L-arginina inibe resposta da histamina mais eficientemente do que a calidina em íleo e útero de cobaia (Frey *et al.*, 1977). Embora a concentração da arginina seja alta, a mesma concentração de L-lisina (outro aminoácido que possui carga catiônica) não tem efeito no extravasamento de proteína causado pela bradicinina ou pela histamina, ou na resposta contrátil de histamina em íleo.

O fato de a L-arginina aumentar a resposta da bradicinina na ausência de L-NAME pode ser devido ao efeito de que análogos da L-arginina degranulam mastócitos e potencializam edema em pata de rato (Giraldelo *et al.*, 1994). Isto também pode se aplicar à análise dos dados de Ialenti *et al.*, (1992). Hughes *et al.*, (1990), no entanto não reportam se a L-arginina tem efeito direto na exudação em resposta à substância P no rato.

O mecanismo de ação do L-NAME permanece ainda um pouco obscuro. As diferenças quantitativas do L-NAME e da isoprenalina podem estar relacionadas

com as diferenças, observadas por Schachter em 1960, em extravasamento de tintura produzido por bradicinina e histamina. Naquela época, esse autor notou que a bradicinina produzia lesões com cores mais intensas, porém de diâmetros menores do que as produzidas pela histamina. Essas observações foram confirmadas por Carr & Wilhelm (1964), que, adicionalmente mostraram diferenças também na camada de pele que produzia maior exudação. A bradicinina produzia maior exudação na derme superficial e a histamina na derme mais profunda. Estes achados morfológicos sugerem que a bradicinina e a histamina agem em microvasos em diferentes níveis da pele, e que esses vasos diferem quanto à responsividade a diferentes agentes, em especial o NO.

EFEITOS DE AMINOÁCIDOS EM MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS DE COBAIAS E COELHOS (*IN VITRO*).

Demonstramos a habilidade da L- e da D-arginina, mas não da L-lisina, antagonizarem não competitivamente contrações induzidas pela histamina em traquéias isoladas de cobaias.

Este efeito não é dependente da espécie pois a arginina também o produziu em brônquios isolados de coelhos, e também não é efeito de interação química, pois em nossos outros experimentos a L-arginina não inibiu o extravasamento de proteína em pele de coelho (Paul *et al.*, 1994a).

Em preparações de traquéia de cobaia, o efeito contrátil da histamina foi revertido pela L- e pela D-arginina de maneira dependente da dose, porém não relacionada com a ausência ou a presença de epitélio e não mediada pela via sensível ao L-NAME. Assim, parece que a L- e a D-arginina interagem com receptores histamínicos ou em seu microambiente e, seletivamente, atenuam as respostas contráteis induzidas pela histamina.

Já foi demonstrado, a capacidade da L- mas, não da D-arginina, em reverter o efeito de inibidores da NOS em extravasamento de proteína na pele (Paul *et al.*, 1994b), no relaxamento de músculo liso (Moncada *et al.*, 1991), em

potencializar contração colinérgica (Belvisi *et al.*, 1991). Como demonstramos que o L-NAME inibe o extravasamento de proteína induzido pela bradicinina e pela histamina em cobaia, e que a L-arginina (10 $\mu\text{mol/sítio}$) reverte o efeito inibidor do L-NAME nas respostas à bradicinina, mas não à histamina, e que a L- e a D-arginina inibem o extravasamento de proteínas na pele de cobaias e a contração de íleo de cobaias induzidos pela histamina, sugerimos que a L-arginina age de maneira não competitiva em receptores histamínicos.

Outros estudos demonstraram que os inibidores de NOS (L-NAME e L-NMMA) aumentaram a broncoconstrição induzida pela histamina em cobaia, e que este efeito era revertido pela L-, mas não pela D-arginina, na forma de aerosol (Nijkamp *et al.*, 1993). A diferença entre esses resultados e os nossos pode ser atribuída à diferença das concentrações utilizadas.

A resposta inibitória desse aminoácido não é dependente da carga (como demonstrado também em íleo de cobaia), porque a L-lisina não teve efeito em antagonizar contração induzida pela histamina. Isto também não parece ser efeito específico em músculo liso das vias aéreas pois a L-arginina não teve efeito quando o agonista usado foi o KCl ou a metacolina.

Nossos resultados sugerem que o NO não modula as respostas contráteis da histamina, visto que a D-arginina também as reverteu. Além disso a L- e a D-arginina não alteraram a potência contrátil da metacolina.

Nijkamp *et al.*, (1993) observaram que a resposta contrátil à metacolina em traquéia perfusada de cobaia foi aumentada na presença do L-NAME. A discrepância entre esses resultados deve-se, possivelmente, ao fato de que o NO (de origem epitelial) pode alterar a permeabilidade do epitélio das vias aéreas aos vários agentes espasmogênicos. Assim, na presença do L-NAME, a habilidade do epitélio em agir como barreira permeabilizante estaria comprometida, podendo então facilitar a passagem dos agentes espasmogênicos para o músculo liso das vias aéreas. Entretanto, as respostas contráteis à metacolina e ao carbacol, mas não à serotonina e ao leucotrieno D₄, em tubos traqueais perfusados de cobaia foram aumentadas na presença

do L-NAME (Nijkamp *et al.*, 1993). Não está claro se isto se deve a diferenças na lipossolubilidade (Jeppson *et al.*, 1989) ou na habilidade desses agentes em estimular a liberação de NO (Nijkamp *et al.*, 1993).

Como a L- e a D-arginina podem interagir com receptores histamínicos, nossos dados também sugerem que a utilização simultânea desses compostos deve ser cautelosa.

CINÉTICA DOS INIBIDORES DA ÓXIDO-NÍTRICO SINTASE EM COBAIA.

Respostas edematogênicas em inflamação cutânea são dependentes de interações entre os mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e os que produzem alterações no fluxo sanguíneo (Williams & Morley, 1973; Williams & Peck, 1977).

O endotélio pode gerar agentes vasodilatadores (prostaglandinas PGE₂, PGI₂ e óxido nítrico) e agentes constritores, como a endotelina (Yanagisawa *et al.*, 1988), que agem como moduladores locais na formação do edema.

Um papel pró-inflamatório do NO pode ser inferido a partir da habilidade dos inibidores da NOS em reduzir o extravasamento de proteínas e o edema em várias respostas inflamatórias (Antunes *et al.*, 1990; Hughes *et al.*, 1990; Ialenti *et al.*, 1992; Khalil & Helme, 1992; Kurose *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 1992; Paul *et al.*, 1992a; Teixeira *et al.*, 1993). Contudo, também foram reportados efeitos anti-inflamatórios de NO (Erjefalt *et al.*, 1994). Em outros leitos vasculares, como vias aéreas de ratos, fígado, baço, pâncreas, rim, estômago e duodeno (Filep & Foldes-Filep, 1993), circulação mesentérica de gatos (Kubes & Granger, 1992), circulação coronária de rato (Filep *et al.*, 1993) e vênulas mesentéricas de rato (Kurose *et al.*, 1993), o L-NAME aumenta o extravasamento de proteína, indicando que o NO tem efeito protetor no endotélio, minimizando a perda de fluido.

Em alguns trabalhos, os inibidores de NOS produziram redução de fluxo sanguíneo em doses que reduziram o extravasamento de plasma (Hughes *et al.*, 1990; Khalil & Helme, 1992; Teixeira *et al.*, 1993).

Portanto as evidências sugerem que o NO endógeno causa vasodilatação, aumentando a formação do edema, e que a inibição da NOS, bloqueando a produção do NO, reduz o fluxo sanguíneo local e exerce assim efeito anti-inflamatório. Contudo, alguns inibidores da NOS como o L-NAME e o 7-nitro indazole (7 NI, Moore *et al.*, 1993) inibiram o edema neurogênico em ratos sem afetar o fluxo sanguíneo (Kajekar *et al.*, 1994).

Já foi citado anteriormente (Teixeira *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1994b), que a co-injeção de inibidores da NOS, L-NAME, com bradicinina, produz inibição de extravasamento de proteínas plasmáticas em cobaias.

Efeitos inibitórios do L-NMMA e do L-NOArg já foram descritos em resposta à substância P, à carragenina (Hughes *et al.*, 1990; Ialenti *et al.*, 1992) e à bradicinina em ratos (Khalil & Helme, 1992).

Nossos dados mostraram que os efeitos do L-NAME e do L-NO Arg, mas não do L-NMMA, são maiores quando injetados 0.5 hora antes da bradicinina do que quando co-injetados com o nonapeptídeo.

O efeito do L-NAME persiste por 8 horas independentemente do estímulo ser a bradicinina ou a histamina. Mesmo em dose baixa (0.02 $\mu\text{mol/sítio}$), o efeito inibidor do L-NAME em extravasamento de proteínas induzido pela bradicinina persiste por 2 horas. O efeito da dose baixa de L-NAME com histamina é significativo quando pré-injetado.

Esse efeito inibidor do L-NAME não persiste quando o estímulo é o agonista de adenoceptores do tipo alfa, fenilefrina, e, portanto, não é propriedade de todos os vasoconstritores.

O envolvimento da via arginina-NO é indicado: a) pela falta de efeito do D-NAME e b) pela habilidade de um excesso de L-Arg reduzir os efeitos do L-NAME.

Em músculo retrator do pênis bovino, o L-NMMA não bloqueia o relaxamento não adrenérgico não colinérgico, mas inibe o bloqueio induzido pelo L-NO Arg ou pelo L-NAME (Martin *et al.*, 1993). Essas interações inibitórias não foram observadas em nossos experimentos.

A fase inicial de inibição do extravasamento de proteínas está correlacionada com os efeitos do fluxo sanguíneo. Os efeitos do L-NAME e do L-NO Arg em ambos - extravasamento de proteínas e fluxo sanguíneo - são maiores quando pré-injetados 0.5 hora antes do que quando co-injetados.

Os efeitos do L-NMMA e da fenilefrina no fluxo sanguíneo e no extravasamento de proteínas desaparecem 30 minutos após as injeções.

Contudo, o efeito do L-NAME no extravasamento de proteínas perdura por 8 horas, enquanto que no fluxo sanguíneo não é mais significativo após 4 horas. A habilidade da L-Arg em reverter o efeito do L-NAME no extravasamento de proteína após 4 horas sugere que o bloqueio já está fraco nesse tempo.

Injeções locais do agonista de adenoceptor do tipo beta 2 de longa duração, salmeterol, inibiram o extravasamento de proteínas induzido pela bradicinina em pele de cobaia por período demais de 6 horas (Whelan *et al.*, 1993). Esse efeito persistente resulta provavelmente da retenção do salmeterol nos sítios de ação.

No caso do L-NAME, a NOS pode ser irreversivelmente bloqueada e, assim, o extravasamento de proteína é reduzido até nova formação de NOS.

Efeitos persistentes do L-NAME também foram reportados em antinocepção em camundongos (Moore *et al.*, 1991), e no aumento de pressão arterial em cães (Persson *et al.*, 1992).

Concluindo, injeção local de L-NAME em pele de cobaia apresenta efeito prolongado de inibição de extravasamento de proteína ultrapassando os efeitos em fluxo sanguíneo. Isto pode ser atribuído ao fato de que foi medido o fluxo sanguíneo basal e não o induzido. Nossos dados porém, são consistentes com a possibilidade de que L-NAME está exercendo algum efeito independente de mudanças no fluxo sanguíneo, como foi reportado em estudos de edema

neurogênico (Kajekar *et al.*, 1994) ou por Mayhan (1992) em bochecha de hamster.

DOADORES DE NO

Dos 3 doadores de NO, somente o SNAP potencializou o extravasamento de proteína plasmática em resposta à bradicinina em cobaias. O SNAP também reverteu o efeito inibidor do L-NAME e da fenilefrina e aumentou o fluxo sanguíneo basal em cobaia.

O SNP teve perfil semelhante ao do SNAP, aumentando o fluxo sanguíneo e revertendo o efeito inibidor do L-NAME e da fenilefrina, sem afetar, porém, o extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina.

Por outro lado, o GTN não aumentou o fluxo sanguíneo nem o extravasamento de proteína plasmática induzido por bradicinina em cobaias. O GTN reverteu os efeitos inibitórios do L-NAME, apesar de essa reversão não ter sido total.

Parece que, apesar de atuarem pela liberação de NO, os efeitos dessas substâncias variam. Uma das razões para isto pode ser a diferença em potência, sendo o SNAP o mais potente (Ignarro *et al.*, 1980).

Tanto o SNAP como o SNP liberam o NO espontaneamente, degradando-se ao serem expostos ao oxigênio. Já o GTN requer grupos sulfidril para liberar o NO, sendo sua atividade biológica dependente da disponibilidade de grupos -SH (Gruetter *et al.*, 1980).

Também foi reportado que a liberação de NO a partir de GTN pode ser catalizada por proteínas presentes no soro. Assim o GTN tem que estar na circulação para que seus efeitos sejam notados (Chung & Fung, 1990).

Outra hipótese que explicaria tais resultados seria a diferença na estrutura química dos compostos. Todos os 3 são moléculas grandes em relação ao seu metabólito ativo. É possível que as cadeias laterais interajam com a atividade da droga. Kiedrowski *et al.*, (1991), investigando os efeitos do NO em neurotoxicidade induzida por glutamato, descobriram que o SNP apresentava

efeito protetor ao tecido, enquanto que isto não ocorria com o SNAP. Esta proteção não se devia à liberação do NO, mas sim ao ferricianeto da molécula, visto que o ferricianeto de potássio produzia o mesmo efeito.

Isto não se aplicaria ao SNAP pois sua cadeia lateral (acetil penicilamina) não teve efeito no extravasamento de proteína plasmática ou no fluxo sanguíneo em cobaias (Perez *et al.*, 1994).

Parece que os efeitos do SNP só se tornam evidentes em condições nas quais o fluxo sanguíneo local está reduzido, como na presença do L-NAME ou da fenilefrina.

O aumento do fluxo sanguíneo causado pelo SNAP e pelo SNP é evidente até mesmo em condições nas quais o fluxo sanguíneo é estimulado por bradicinina.

CONCLUSÃO FINAL

Arginina parece ter um efeito anti-histamínico nas concentrações utilizadas.

Os efeitos dos inibidores da NO sintase em extravasamento de proteína plasmática parece estar dissociado do seu efeito em fluxo sanguíneo.

Os nitrovasodilatadores, apesar de serem doadores de NO, têm mecanismos de ação diferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisaka, K., Gross, S.S., Griffith, O. W. and Levi, R. N^G-methylarginine an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure *in vivo*? **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **160**: 881-886, 1989.

Aisaka, K., Gross, S. S., Steinberg, C., Griffith, O. W. and Levi, R. N^G-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, abbreviates acetylcholine-induced vasodilatation in the guinea-pig, In **Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system**, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs, pp. 379-384, Elsevier, Amsterdam, 1990.

Antunes, E., Giraldeho, C. M. M., Cirino, G. and de Nucci, G. Effects of L-NMMA and D-NMMA on rat hind-paw oedema. In **Biology of Nitric Oxide**. Eds Hibbs, Marletta and Moncada, pp. 264-266, 1992.

Antunes, E., Mariano, M., Cirino, G., Levi, S. and De Nucci, G. Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 986-990, 1990.

Arfors, K. E., Rutili, G. and Svensjo, E. Microvascular transport of macromolecules in normal and inflammatory conditions, **Acta Physiol. Scand.**, **463** Suppl: 93-103, 1979.

Azuma, H., Ishikawa, M., and Sekizaki, S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. **Br. J. Pharmacol.** **88**: 411-415, 1986.

Barnes, P. J. Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. **Arch Int. Pharmacodyn.** **280**: 208-229, 1986.

Becker, C. G. and Nachman, R. L. Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle. **Am. J. Pathol.**, **71**: 1-22, 1973.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 1620-1624, 1990.

Beets, J. L. and Paul, W. Actions of locally administered adrenoceptor agonists on increased plasma protein extravasation and blood flow in guinea-pig skin, **Br. J. Pharmacol.**, **70**: 461-467, 1980.

Belvisi, M. G., Stretton, D. and Barnes, P. J. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. **Eur. J. Pharmacol.**, **198**: 219-221, 1991.

Brain, S. D. and Williams, T. J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, **86**: 855-860, 1985.

Brain, S. D., Tippins, J. R. and Williams, T. J. Endothelin induces potent microvascular constriction. **Br. J. Pharmacol.**, **95**: 1005-1007, 1988.

Brain, S. D., Crossman, D. C., Buckley, T. L. and Williams, T. J. Endothelin 1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13** Suppl 5: S147-149, 1989.

Bredt, D. S., and Snyder, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 682-685, 1990.

Bredt, D.S., Hwang, P. M. and Snyder, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, **347**: 768-770, 1990.

Burnstock, G. Past and current evidence for the purinergic nerve hypothesis. In **Physiological and Regulatory function of adenosine and adenine nucleotides**, ed. by H. P. Baer and G. I. Drummond, pp. 2-32, Raven Press, New York, 1979.

Busse, R., Trogisch, G. and Bassenge, E. The role of endothelium in the control of vascular tone. **Basic Res. Cardiol.**, **80**: 475-490, 1985.

Carr, J. and Wilhelm, D. L. The evaluation of increased vascular permeability in the skin of guinea-pigs. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **42**: 511-522, 1964.

Chung, S. J. and Fung, H. L. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **253**: 614-619, 1990.

Dale, H. H. and Laidlaw, P. P. The physiological action of B-imidazolylethylamine. **J. Physiol.**, **41**: 318-344, 1910.

Drenckhahn, D. Cell motility and cytoplasmic filaments in vascular endothelium. **Progr. Appl. Microcirc.** **1**: 55-70, 1983.

Drummond, G. I. Cyclic GMP. In: **Cyclic nucleotides in the nervous system**, pp. 40-125, Raven Press, New York, 1984.

Erjefalt, J. S., Erjefalt, I., Sundler, F. and Persson, C. G. A. Mucosal nitric oxide may tonically suppress airways plasma exudation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **150**: 227-232, 1994.

Feelisch, M. and Noack, E. A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **Eur. J. Pharmacol.**, **139**: 19-30, 1987.

Ferrendelli, J. A., Blank, A. C. and Gross, R. A. Relationships between seizure activity and cyclic nucleotide levels in brain. **Brain Res.**, **200**: 93-103, 1980.

Filep, J. G. and Foldes-Filep, E. Modulation by nitric oxide of platelet-activating factor-induced albumin extravasation in the conscious rat. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1347-1352, 1993.

Filep, J. G., Foldes-Filep, E. and Sirois, P. Nitric oxide modulates vascular permeability in the rat coronary circulation. **Br. J. Pharmacol.**, **108**: 323-326, 1993.

Fortes, Z. G., de Nucci, G. and Garcia-Leme, J. Effects of endothelin-1 on arterioles and venules *in vivo*. **J. Cardiovasc Pharmacol.**, **13**: S200-201, 1989.

Fox, J., Galey, F. and Wayland, H. Action of histamine on the mesenteric microvasculature. **Microvasc. Res.**, **19**: 108-126, 1980

Frey, E. K., Kraut, H. and Werle, E. In: **Kallikrein Padutin**. ed. Vogel, R. Translated Lemon, M. J. C. p.286. Munchen: F. Enke, 1977.

Furchgott, R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **24**: 175-197, 1984.

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376, 1980.

Furlong, B., Henderson, A. H., Lewis, M. J. and Smith, J. A. Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation. **Br. J. Pharmacol.**, **90**: 687-692, 1987.

Garg, U. C. and Hassid, A. Nitric Oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, **83**: 1774-1777, 1989.

Garrison, J. C. Histamine, bradykinin, 5HT and their antagonists. In: Goodman and Gilman, **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 8th Ed., Pergamon Press, pp 575-588, 1991.

Garthwaite, J. NMDA receptors, neuronal development and neuronal degeneration. In **The NMDA receptor**, ed. by J. C. Watkins and G. L. Collingridge, pp. 187-205, Oxford University Press, Oxford, England, 1989.

Gerard, C. and Hugli, T. E. C5a: a mediator of chemotaxis and cellular release reactions. In: **Biochemistry of acute allergic reactions**, Becker, Simon, Austen ed., New York, pp. 147-160, 1981.

Gillespie, J. S., Liu, X. and Martin, W. The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genytral system. In **Nitric Oxide from L-arginine: A bioregulatory system**, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs, pp. 147-164, Elsevier, Amsterdam, 1990.

Giraldelo, C. M. M., Zappellini, A., Muscara, M. N., De Luca, I. M. S., Hyslop, S., Cirino, G., Zatz, R., De Nucci, G. and Antunes, E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, **257**: 87-93, 1994.

Goldie, R. G., Papadimitriou, J. M., Paterson, J. W. , Rigby, P. J., Self, H.M. and Spina, D. Influence of the epithelium on responsiveness of guinea-pig isolated trachea to contractile and relaxant agonists. **Br. J. Pharmacol.**, **87**: 5-14, 1986.

Grega, G. J. Contractile elements in endothelial cells as potential targets for drug action. **Trends Pharmacol. Sci.**, **7**: 452-457, 1986.

Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C. and Henderson, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, **308**: 645-647, 1984.

Gruetter, D. Y., Gruetter, C. A., Barry, B. K., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J. and Ignarro, L. J. Activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside, and nitrosoguanidine - inhibition by calcium, lanthanum, and other cations, enhancement by thiol. **Biochem. Pharmacol.**, **29**: 2943-2950, 1980.

Gryglewski, R. J. Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, **320**: 454-456, 1986.

Henriques, M. G. M. O., Rae, G. A., Cordeiro, R. S. B. and Williams, T. J. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw oedema and pleurisy in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **106**: 579-582, 1992.

Hibbs, J. B., Jr., Vavrin, Z. and Taintor, R. R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cell. **J. Immunol.**, **138**: 550-565, 1987.

Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. and Vavrin, Z., Granger, D. L., Drapier, J. C., Amber, I. J. and Lancaster, J. R., Jr. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: **Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system**, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs, pp. 189-223, Elsevier, Amsterdam, 1990.

Hughes, S. R., Williams, T. J. and Brain, S. D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. **Eur. J. Pharmacol.**, **191**: 481-484, 1990.

Ialenti, A., Iannaro, A., Moncada, S. and Di Rosa, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, **211**: 177-182, 1992.

Ignarro, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Cir. Res.**, **65**: 1-21, 1989.

Ignarro, L. J., Edwards, J. C., Gruetter, D. Y., Barry, B. K. and Gruetter, C. A. Possible involvement of S-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compounds. **FEBS lett.**, **110**: 275-278, 1980.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, K. S. and Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **84**: 9265-9269, 1987.

Ishii, K., Gorsky, L. D., Forstermann, U. and Murad, G. Endothelium derived relaxing factor (EDRF): the endogenous activator of soluble guanylate cyclase in various types of cells. **J. Appl. Cardiol.**, **4**: 505-512, 1989.

Jeppson, A. B., Lofdahl, C. G., Waldeck, B. and Widmark, E. On the predictive value of experiments *in vitro* in the evaluation of the effect duration of bronchodilator drugs for local administration. **Pulmon. Pharmacol.**, **2**: 81, 1989.

Kajekar, R., Moore, P. K. and Brain, S. D. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the rat. **Br. J. Pharmacol.** **112**: 232P, 1994.

Khalil, Z. and Helme R. D. The quantitative contribution of nitric oxide and sensory nerves to bradykinin-induced inflammation in rat skin microvasculature. **Brain Research**, **589**: 102-108, 1992.

Kiedrowski, L., Maney, H., Costa, E. and Wroblewski, J. T. Inhibition of glutamate induced cell death by SNP is not mediated by nitric oxide. **Neuropharmacol.**, **30**: 1241-1243, 1991.

Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer. R. M. J. and Moncada, S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. **Biochem. J.** **269**: 207-210, 1990.

Kubes, P. and Granger, N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.**, **262**: H611-H615, 1992.

Kurose, I., Kubes, P., Wolf, R., Anderson, D. C., Paulson, J., Miyasaka, M. and Granger, D. N. Inhibition of nitric oxide production, mechanisms of vascular albumin leakage. **Circulation Res.**, **73**: 164-171, 1993.

Lawrence, E. and Brain, S. D. Responses to endothelins in the rat cutaneous microvasculature: a modulatory role of locally-produced nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, **106**: 733-738, 1992.

Lippe, I. T., Stabentheiner, A. and Holzer, P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. **Eur. J. Pharmacol.**, **232**: 113-120, 1993.

Majno, G. and Palade, G. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, **11**: 571-605, 1961.

Majno, G., Shea, S. M. and Leventhal, M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators. **J. Cell. Biol.**, **42**: 657-672, 1969.

Marletta, M. A. Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C.D. and Wishnok, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry** **27**: 8706-8711, 1988.

Martin, W., Smith, J. A. and White, D. G. The mechanisms by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide or bovine retractor penis inhibitory factor. **Br. J. Pharmacol.**, **89**:563-571, 1986.

Martin, W., Gillespie, J. S. and Gibson, I. F. Actions and interactions of N^G-substituted analogues of L-arginine on NANC neurotransmission in the bovine retractor penis and rat anococcygeus muscles. **Br. J. Pharmacol.**, **108**: 242-247, 1993.

Martin, W., Villani, G. M., Jothianandan, D. and Furchgott, R. F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **232**: 708-716, 1985.

Mayhan, W. G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, **10**: 295-305, 1992.

Mitchell, J. A., Hecker, M., Anggard, E. E. and Vane, J. R. Cultured endothelial cells maintain their L-arginine level despite the continuous release of EDRF. **Eur. J. Pharmacol.**, **182**: 573-576, 1990.

Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. Generation of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor from endothelial cells, In: **Biology and pathology of platelet-vessel wall interaction**, ed. by G. Jolles, J. Y. Legrand and A. Nurden, pp. 289-304, Academic Press, London, 1986.

Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, **12**: 365-372, 1988.

Moncada, S. Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.**, **38**: 1709-1715, 1989.

Moncada, S. Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. Nitric oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.

Moore, P. K., Al Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R. A. and Gibson, A. L-N^G-nitroarginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, **99**: 408-412, 1990.

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

Moore, P. K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S. L. and Babbedge, R. C. 7-nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits antinociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.**, **108**: 296-297, 1993.

Moore, P. K., Al Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R., Mirzazadeh, S. and Gibson, A. L-N^G-nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium dependent vasodilation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. **Br. J. Pharmacol.** **98**: 905P, 1989.

Mulligan, M. S., Moncada. S. and Ward, P. A. Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 1159-1162, 1992.

Nijkamp, F. P., Van Der Linde, H. J. and Folkerts, G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea pig *in vivo* and *in vitro*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **148**: 727-734, 1993.

Palacios, M., Knowles, R. G., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **165**: 802-809, 1989.

Palmer, R. M. J. and Moncada, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **158**: 348-352, 1989.

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**: 524-526, 1987.

Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. **Nature**, **333**: 664-666, 1988a.

Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S. and Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **153**: 1251-1256, 1988b.

Paul, W., Douglas, G. J., Lawrence, L., Page, C. P. and Shachter, M. L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) reduces plasma protein leakage in the skin of the guinea-pig and rabbit. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 404P, 1992A.

Paul, W., Lawrence, L., Douglas, G. J., Shachter, M. and Page, C. P. Modulators of the L-arginine-nitric oxide pathway: differential effects on cutaneous permeability to bradykinin and histamine in the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 287P, 1992b.

Paul, W., Perez, A. C., Page, C. P. and Schachter, M. L-arginine and plasma extravasation in rabbit skin: an effect on bradykinin but not on antigen or histamine. **Br. J. Pharmacol.**, **112**: 232P, 1994a,

Paul, W., Douglas, G. J., Lawrence, L. , Khawaja, A. M., Perez, A. C., Schachter, M. and Page, C. P. Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action. **Br. J. Pharmacol.**, **111**: 159-164, 1994b.

Perez, A. C., Khawaja, A. M., Page, C. P. and Paul, W. Effect of nitrovasodilators on plasma extravasation and blood flow in guinea pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, **113**: 74P, 1994.

Persson, C. G. A. and Svensjo, E. Vascular responses and their suppression: drugs interfering with venular permeability. In: **The pharmacology of inflammation**, ed. Bonta, I. L., Bray, M. A. & Parnham, M. J. pp. 61-82. Amsterdam: Elsevier, 1985.

Persson, P. B., Baumann, J. E., Ehmke, H., Nafy, B., Wittmann, U. and Kirchheim, H. R. Phasic and 24 h blood pressure control by endothelium-derived relaxing factor in conscious dogs. **Am. J. Physiol.**, **262**: H1395-1400, 1992.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br. J. Pharmacol.**, **92**: 181-187, 1987a.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, **92**: 639-646, 1987b.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **148**: 1482-1489, 1987c.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, **2**: 1057-1058, 1987d.

Raeburn, D., Hay, D. W. P., Robinson, V. A., Farmer, S. G., Flemming, J. W. and Fedan, F. S. The effect of verapamil on isolated airways smooth muscle preparations lacking in epithelium. **Life Sci.**, **28**: 809-816, 1986.

Rand, M. J. Nitrgenic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **19**: 147-169, 1992.

Rapoport, R. M. and Murad, F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ. Res.**, **52**: 352-357, 1983.

Rees, D. D., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **86**: 3375-3378, 1989.

Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, H. F. and Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 746-752, 1990a

Rees, D. D., Schulz, R., Hodson, H. F., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Identification of some novel inhibitors of the vascular nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. In: **Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system**, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs, pp 485-487, Elsevier, Amsterdam, 1990b.

Ross, C. A., Bredt, D. and Snyder, S. H. Messenger molecules in the cerebellum. **Trends Neurosci.**, **13**: 216-222, 1990.

Rothman, S. M. and Olney, J. W. Excitotoxicity and the NMDA receptor. **Trends Neurosci.**, **10**: 299-302, 1987.

Rubanyi, G. M. and Vanhoutte, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium derived relaxing factor. **Am. J. Physiol.**, **250**: H821-H827, 1986.

Salvemini, D., De Nucci, G., Gryglewski, R. J. and Vane, J. R. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 6328-6332, 1989.

Salvemini, D., Masini, E., Anggard, E., Mannaioni, P. F. and Vane, J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **169**: 596-601, 1990.

Schachter, M. Some properties of kallidin, bradykinin and wasp venom kinin. In: **Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels**. ed. Schachter, M. pp. 232-246. Oxford: Pergamon Press, 1960.

Schachter, M. Bradykinin and other capillary active factors. In: **Bradykinin and vasodilating peptides**. ed. Rocha e Silva, M. & von Euler, U. S. pp. 87-94. New York: MacMilan, 1963.

Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. **Science**, **258**: 1898-1902, 1992.

Teixeira, M. M., Williams, T. J. and Hellewell, P. G. Role of prostaglandin and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1515-1521, 1993.

Thomas, G., Cole, E. A. and Ramwell, P. W. N^G-monomethyl L-arginine is a non-specific inhibitor of vascular relaxation. **Eur. J. Pharmacol.**, **170**: 123-124, 1989.

Vallance, P., Collier, J., and Moncada, S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium-dependent dilatation in human vein. **Cardiovasc. Res.** **23**: 1053-1057, 1989.

Waldman, S. A. and Murad, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev.**, **39**: 163-196, 1987.

Warrem, J. B., Coughlan, M. L. and Williams, T. J. Endotoxin-induced vasodilatation in anaesthetized rat skin involves nitric oxide and prostaglandin synthesis. **Br. J. Pharmacol.**, **106**: 953-957, 1992.

Whelan, C. J., Johnson, M. and Vardey, C. J. Comparison of the anti-inflammatory properties of formoterol, salbutamol and salmeterol in guinea-pig skin and lung. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 613-618, 1993.

Whittle, B. J. R., Lopez-Belmonte, J. and Rees, D. D. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. **Br. J. Pharmacol.**, **98**: 646-652, 1989.

Williams, T. J. The pro-inflammatory activity of E-, A-, D- and F-type prostaglandins and analogues 16,16-dimethyl-PGE₂ and (15S)-15-methyl-PGE₂ in rabbit skin: the relationship between potentiation of plasma exudation and local blood flow changes. **Br. J. Pharmacol.**, **56**: 341-343P, 1976.

Williams, T. J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **65**: 517-524, 1979.

Williams, T. J. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E₂ as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. **Br. J. Pharmacol.**, **77**: 505-509, 1982.

Williams, T. J. and Morley, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, **246**: 215-217, 1973.

Williams, T. J. and Peck, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, **270**: 530-532, 1977.

Wright, D. C., Mulsch, A., Busse, R., and Osswald, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **160**: 813-819, 1989.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, **322**: 411-415, 1988.

ABSTRACT

NO synthesized from L-arginine, is responsible for various biological effects including oedema formation by plasma protein extravasation (PPE).

PPE responses have been measured using local accumulation of intravenously injected ^{125}I -human serum albumin and blood flow by means of a multiple ^{133}Xe Xenon (Xe) technique in guinea pig skin.

L-NAME reduced responses to bradykinin (BK) or histamine and that inhibitory effect was reversed by L-arginine on the response to BK but not on that to histamine. L-arginine alone enhanced the response to BK but inhibited that to histamine. It is therefore possible that NO may play a greater role in the extravasation response to BK than to that induced by histamine. The differential effects of L-NAME and isoprenaline on BK and histamine-induced PPE raise the possibility that BK and histamine may induce vascular permeability via different mechanisms in guinea-pig skin.

We also investigated the effect of the amino acids including L-arginine, D-arginine and L-lysine on airway smooth muscle responsiveness to spasmogen *in vitro*. Both L-arginine and D-arginine significantly reduced the contractile potency and maximal contractile response to histamine but not to methacholine or potassium chloride in guinea-pig epithelium denuded isolated trachea. In guinea-pig isolated trachea precontracted with histamine, both L-arginine and D-arginine produced a concentration-dependent relaxation. The relaxant response was not significantly altered by epithelium removal or by the presence of L-NAME. Thus, very high concentration of arginine non-competitively antagonizes histamine induced contraction of isolated airway preparations that are independent of the generation of nitric oxide and are not dependent on charge, as L-lysine had no effect.

The nitric oxide (NO) synthase inhibitors L-NAME, L-NMMA and L-NO Arg inhibited bradykinin induced PPE when co-injected with the peptide. The inhibitory effect of L-NAME on PPE lasted for 8 hours, whereas its effects on

blood flow lasted up to 4 hours, showing that L-NAME is acting by other means other than by only reducing blood flow.

In a new series of experiments the nitrovasodilators GTN, SNP and SNAP were tested for their ability to potentiate bradykinin induced PPE. Only SNAP produced significant increases in the BK response. When tested for their ability to increase skin blood flow, SNP, SNAP and PGE₂ produced similar increases in basal blood flow whereas GTN produced smaller responses. The effects of GTN, PGE₂ and SNAP on BK induced PPE correlate well with their ability to increase skin blood flow. In contrast, the effect of SNP on mediator induced PPE only becomes evident under conditions where local skin blood flow is reduced e.g. in the presence of L-NAME or phenylephrine.

In conclusion (1) arginine appears to have an anti-histaminic effect (2) the effects of NO synthase inhibitors on blood flow does not correlate well with its effects on PPE and (3) the nitrovasodilators utilized have different mechanism of action.