

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**Medida da atividade da Enzima Conversora de
Angiotensina I em órgãos de ratos tratados cronicamente
com L-NAME**

SIMONE APARECIDA TEIXEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. BENEDITO DE OLIVEIRA FILHO
Departamento de Bioquímica - Instituto de Biologia
UNICAMP

9614422

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Simone Aparecida Teixeira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

14/8/96

**Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências
Biológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração em Bioquímica.**

CAMPINAS - SP
1996



FADE	BC
CHAMADA:	UNICAMP
	T235m
Ex.	
SO BC/	28568
C.	667/96
☐ D ☒	
CO	R\$ 11,00
A	13/09/96
CPD	em.00096611-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

T235m

Teixeira, Simone Aparecida

Medida da atividade da enzima conversora de angiotensina I em órgãos de ratos tratados cronicamente com L-NAME / Simone Aparecida Teixeira. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Benedito de Oliveira Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Enzimas. 2. Óxido nítrico. 3. Sistema renina - angiotensina. 4. Hipertensão. I. Oliveira Filho, Benedito de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 14 de Agosto de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho



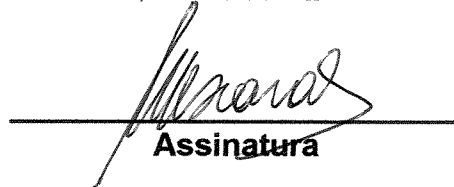
Assinatura

Prof. Dr. Gilberto de Nucci



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

“O começo da sabedoria consiste em perceber que temos e teremos as mãos vazias, na medida em que tenhamos ganho ou pretendamos ganhar o mundo.”

(De uma carta de Hélio Pellegrino.)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Teixeira e Maria de Lourdes, seres responsáveis por toda minha vivência.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhas pelo carinho. Em especial, à minha irmã Silvana Cristina Teixeira pelo apoio e sugestões durante a digitação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho pela confiança, orientação e incentivo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci e ao Departamento de Farmacologia da FCM pela oportunidade da realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará pelas sugestões, discussões, amizade e paciência. À sua esposa Ligia Maria Muscará pela tolerância.

Aos amigos Prof. Dr. Heitor Moreno Jr., Luciana Nathan e Wellington Ribeiro pela concessão de técnicas e materiais.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, Prof. Dr. José Camilo Novaes e Prof(a) Dra. Nilce C. Meirelles pelas sugestões finais.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela revisão em inglês.

Aos amigos Heidi B. Dias, Armindo A. Alves, Luzia Pando, Evandro L. Miranda, Cláudia F. de Oliveira, Maria Lúcia Martins, Pamela Molina, Marcos Pierossi, Luciana Bizeto e demais colegas pela amizade e constante incentivo.

À Dora M. Ponciano, Miguel Borges da Silva, Paulo Sérgio de Oliveira, Andréia A. Vigilato, Antonio Tadeu dos Santos e demais funcionários que criaram as condições de trabalho.

Finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e apoio financeiro para a execução desse projeto.

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
1.1. A Enzima Conversora de angiotensina I	3
1.2. O Óxido Nítrico	11
2. Objetivos	18
3. Materiais e métodos	19
3.1. Materiais	19
3.1.1. Reagentes.....	19
3.1.2. Animais.....	21
3.1.3. Aparelhos.....	21
3.2. Métodos	21
3.2.1. Padronização do método para dosagem da ECA tecidual.....	21
3.2.1.1. Ensaios preliminares.....	21
3.2.2. Dosagem da atividade da ECA tecidual.....	23
3.2.3. Dosagem de proteínas.....	24
3.2.4. Curvas de inibição da ECA.....	25
3.2.4.1. Obtenção de uma preparação semi purificada de ECA de pulmão de coelho.....	26
3.2.4.2. Preparação da solução de esterases hepáticas.....	27
3.2.4.3. Preparação das soluções de inibidores.....	27
3.2.5. Indução de hipertensão em ratos por inibição da síntese de NO.....	27
3.2.6. Pressão arterial média de cauda.....	28
3.2.7. Determinação da atividade da NOS cerebral.....	29
3.2.8. Análise estatística.....	30
4. Resultados	31
5. Gráficos e tabelas	34
6. Discussão	46
7. Referências bibliográficas.....	52
Apêndice.....	64

RESUMO

Uma interação entre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o óxido nítrico (NO) foi inicialmente observada por Ribeiro et al. (1992) quando verificaram que na hipertensão experimental causada pela inibição da síntese do NO por análogos da L-arginina, a elevação da pressão arterial era evitada pelo tratamento concomitante com losartan, um antagonista competitivo dos receptores do tipo I de angiotensina II, verificando-se também que os níveis de atividade da renina plasmática se encontravam elevados. No entanto, os resultados obtidos por outros autores sobre tal atividade são um tanto controversos.

Ao longo do presente trabalho de tese são mostrados os resultados obtidos sobre o desenvolvimento e padronização de um método para quantificar a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) tecidual proveniente de órgãos de ratos. Posteriormente, esta metodologia foi aplicada para avaliar o efeito do tratamento crônico com um inibidor da NOS em ratos (L-NAME, 20 mg/animal/dia, durante 1, 2, 4 e 8 semanas, v.o.) sobre a atividade da ECA proveniente de homogenatos de fígado, pulmão, coração e rim.

Ratos tratados com L-NAME mostraram valores de pressão arterial média elevados enquanto que o grupo de animais tratados prévia e simultaneamente com o inibidor competitivo da ECA, o maleato de enalapril, não desenvolveram hipertensão. A atividade da ECA medida em homogenatos de coração, fígado e pulmão não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado (controle) a qualquer tempo, mas uma queda na atividade da ECA renal foi observada após 8 semanas de tratamento com L-NAME.

Estes resultados sugerem que a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona decorrente da inibição da NOS não é acompanhada por aumento da atividade de ECA tecidual em ratos. Mecanismos de retroalimentação negativa poderiam explicar a diminuição observada na atividade da ECA renal após um período de 8 semanas de tratamento com L-NAME.

ABSTRACT

An interaction between the renin-angiotensin-aldosterone system and nitric oxide (NO) was initially observed by Ribeiro et al. (1992) when they verified that in experimental hypertension caused by NO synthesis blockade, the raise in arterial pressure could be prevented by concomitant treatment with losartan, a competitive type I angiotensin II receptor antagonist and that plasma renin activity was also increased. However, reports by other investigators have not always confirmed the latter observation.

The present work describes the development and standardization of a method for the *in vitro* quantification of angiotensin I converting enzyme (ACE) activity in rat organs. The method was used to evaluate ACE activity in liver, lung, heart and kidney homogenates from rats treated chronically with the NO synthase (NOS) inhibitor L-NAME (20 mg/animal/day, orally, for 1, 2, 4 or 8 weeks).

L-NAME-treated rats developed hypertension while the animals previously and simultaneously treated with enalapril maleate, a competitive ACE inhibitor, did not. The ACE activities of heart, liver and lung homogenates were not significantly different between the treated and non-treated groups at any time, but a significant decrease in renal ACE activity was observed in the L-NAME treated animals after eight weeks of treatment.

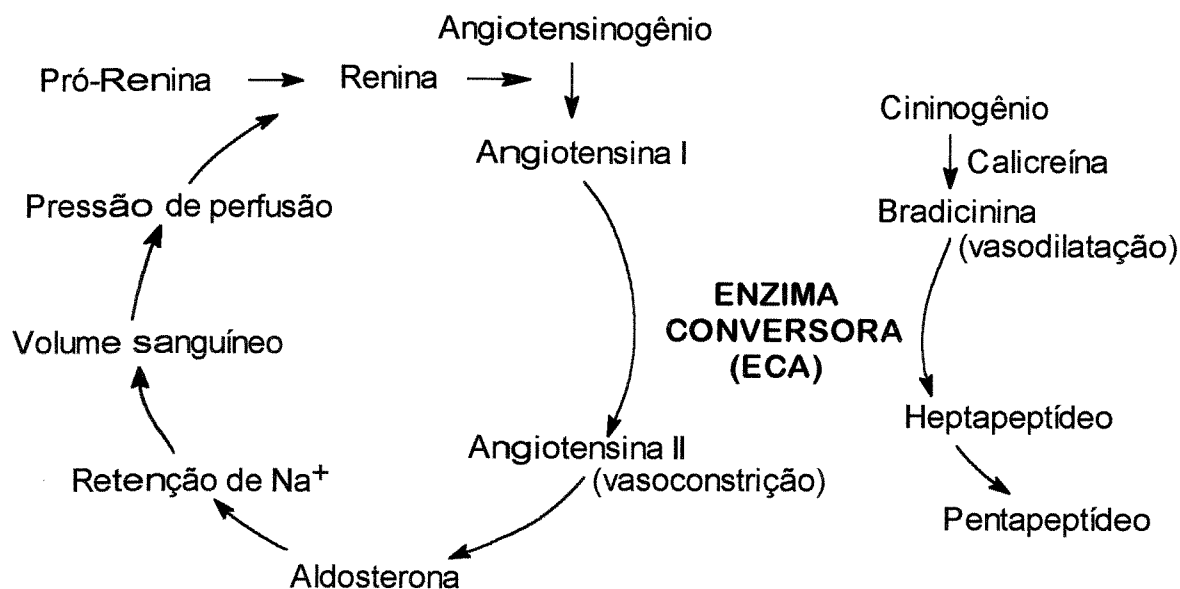
These results suggest that activation of the renin-angiotensin-aldosterone system in rats as a result of chronic NOS inhibition is not accompanied by an increase in tissular ACE activity. Negative feed-back mechanisms could explain the decrease in renal ACE activity observed after eight weeks of treatment with L-NAME.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (ECA)

A ECA (EC 3.4.15.1) é uma dipeptidil-carboxi-peptidase também conhecida como Cininase II por ser responsável pela degradação da bradicinina (Ferreira, 1967).

Seus dois substratos mais importantes e reconhecidos são a angiotensina I e a bradicinina como é esquematizado a seguir:



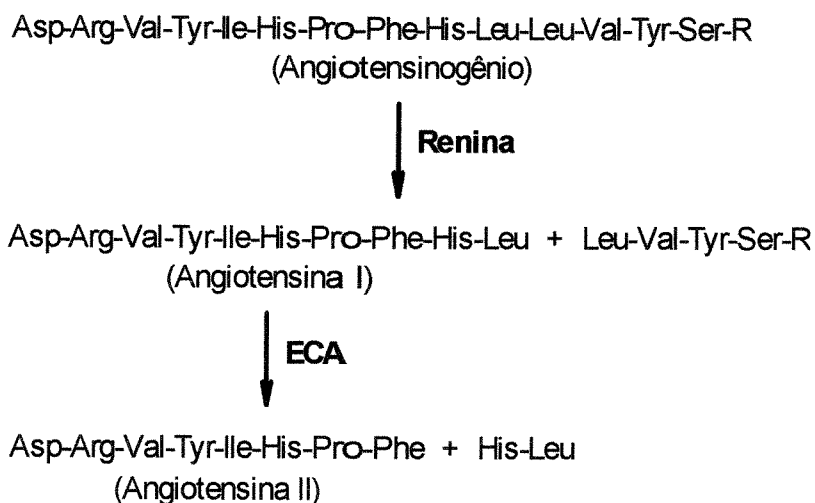
O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona possui uma importante função no sistema de regulação da pressão arterial e é composto por uma série de reações que inicia-se com a ação da enzima renina sobre uma globulina hepática, o angiotensinogênio, clivando 10 resíduos amino-terminais na ligação Leu-Leu liberando o decapeptídeo angiotensina I que por sua vez possui atividade biológica desprezível e é convertida pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) para angiotensina II. A renina é produzida nos rins por células pertencentes ao aparelho justaglomerular que é ativado em três condições: (1) quando há diminuição da pressão da arteríola renal; (2) com a diminuição da concentração de Na⁺ e (3) com a diminuição do volume extracelular percebido pelas células da mácula densa que

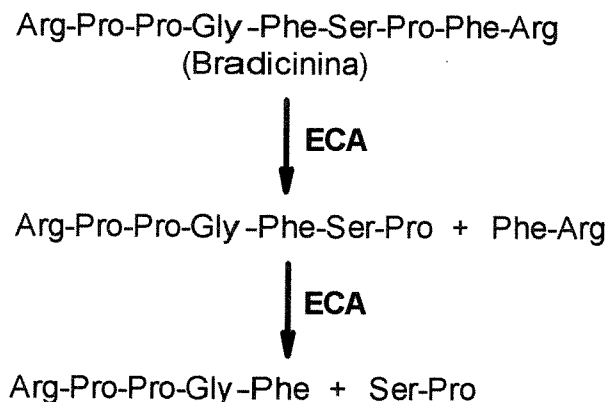
estão juntas às células justaglomerulares, ou seja, por estímulos nervosos que são transportados por nervos simpáticos renais, afim de estimular receptores β adrenérgicos das células justaglomerulares. No entanto, vários outros fatores podem influenciar a secreção da renina tais como hipercalemia, a ação de prostaciclina, prostaglandinas e catecolaminas (Smith et al., 1985; Ehlers e Riordan, 1989).

A angiotensina II além de possuir uma potente ação vasoconstritora, estimula a síntese de aldosterona, hormônio responsável pela reabsorção do íon sódio nos túbulos renais e consequente aumento do volume extracelular (Smith et al., 1986).

A ECA cliva o dipeptídeo His-Leu do C-terminal do decapeptídeo angiotensina I e produz o octapeptídeo angiotensina II (Helmer, 1957; Cushman e Cheung, 1971; Conroy e Lai, 1978).



Na bradicinina, a ECA cliva a seqüência dos dipeptídeos Phe-Arg e depois Ser-Pro do C-terminal, inativando esse potente agente vasodilatador. A hidrólise desse peptídeo é mostrada conforme o esquema seguinte:



No entanto, alguns trabalhos mostram a ação da ECA como tripeptidase com outros substratos, mas que até agora, nenhuma função óbvia para tais clivagens foi descrita (Hooper e Turner, 1985; Ehlers e Riordan, 1989; Hooper, 1991).

Histórico

Desde 1898 a ação da renina era percebida através de experimentos com extratos de rins injetados por via intravenosa. Tigerstedt e Bergman averiguaram o aumento da pressão arterial, mas foi Page e Helmer (1940) que concluíram que a interação da renina com um ativador de renina no plasma dava origem à uma substância vasopressora que chamaram de angiotonina, atualmente denominada angiotensina conforme adotado por Braun-Menendez e Page em 1958.

Em 1954, Skeggs et al., encontraram duas formas de angiotensina sendo que angiotensina I era convertida em angiotensina II por ação de uma substância desconhecida contida no plasma que requeria haletos ou íons nitrato. Seqüenciaram a angiotensina I e desenvolveram posteriormente um método para concentrar a ECA e separá-la de outras peptidases. Através do estudo da enzima de plasma de cavalos mostraram que sua atividade era inibida pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Skeggs et al., 1954, 1956).

Lentz et al. (1956) descreveram mediante o uso de carboxipeptidases, que a angiotensina II era um octapeptídeo que diferia do decapeptídeo angiotensina I no resíduo His-Leu C-terminal. Ainda descobriram que quando sujeitavam a

angiotensina II à ação dessa carboxipeptidase, o amino-ácido fenilalanina era liberado e o heptapeptídeo resultante não tinha atividade pressora.

Através dos trabalhos realizados por Skeggs e colaboradores, estabeleceram então, a existência da ECA bem como três de suas características, ou seja, sua natureza metaloproteica, sua dependência de ânions e a produção do octapeptídeo vasopressor angiotensina II por clivagem de His-Leu do C-terminal de seu substrato angiotensina I.

Produção de angiotensina II e localização da ECA

Até 1967, sabia-se que a conversão de angiotensina I para angiotensina II era efetuada principalmente no plasma (Skeggs et al., 1956). No entanto, esse conceito foi modificado por Ng e Vane (1967) que utilizando a técnica de superfusão de órgãos (Gaddum, 1953) com sangue arterial ou venoso, demonstraram que a angiotensina I era convertida para angiotensina II principalmente no pulmão e que a conversão no plasma era insignificante.

Em algumas espécies, como a cobaia, a atividade da ECA em plasma foi semelhante à dos pulmões (Bakhle, 1974; Vane, 1974; Soffer, 1976; Peach, 1977; Soffer, 1981; Ondetti e Cushman, 1982). Tal fato é explicado devido ao alto conteúdo dessa enzima nos pulmões (Roth et al., 1969; Cushman e Cheung, 1971; Cushman e Cheung, 1972) que provavelmente se reflete por toda a extensão de seu leito vascular e sua localização estratégica que recebe todo o débito cardíaco (Ng e Vane, 1967; Aiken e Vane, 1970).

Os resultados de Ng e Vane (1967) sobre a relação do contato direto da ECA pulmonar com o sangue circulante foram confirmados posteriormente por Ryan et al. (1976) que demonstraram através de técnica imuno-histoquímica que a ECA está localizada na membrana celular do endotélio vascular pulmonar. Essa observação foi confirmada por outros autores em diferentes leitos vasculares (Caldwell et al., 1976; Hall et al., 1976; Soffer, 1981; Rubinstein et al., 1992). A ECA também foi encontrada integrando o sistema renina-angiotensina circulante e em outros fluídos do corpo como na urina, fluído cerebrospinal, linfa, líquido

amniótico e plasma seminal (Ryan et al., 1975; Soffer, 1976; Erdos et al., 1986; Hopper et al., 1987, 1990; Johnston et al., 1992).

Na realidade, a ECA está presente no leito vascular de praticamente todos os tecidos. Curiosamente, a atividade da ECA plasmática se encontra aumentada em patologias que envolvem células das quais os monócitos são precursores, como a lepra (macrófagos), Sarcoidose (células epitelióides) e a doença de Gaucher (nas células de Gaucher; Lieberman, 1975; Friedland e Silverstein, 1976).

Mais recentemente, uma interação entre o sistema renina angiotensina aldosterona e o óxido nítrico foi relatada por Ribeiro et al. (1992). As conseqüências desta interação serão discutidas no item 1.2 e seguintes.

Características e propriedades da ECA

As propriedades físico-químicas, imunológicas e catalíticas da ECA purificada a partir de diferentes tecidos e espécies são semelhantes.

A ECA é uma glicoproteína composta por uma única cadeia polipeptídica (Soffer, 1976) que possui Zn^{2+} em seu centro ativo na proporção de 1 mol de zinco/mol de ECA (Das e Soffer, 1975; Soffer, 1976; Conroy et al., 1978; Soffer, 1981; Ondetti e Cushman, 1982; Erdos e Skidgel, 1987 e Ehlers e Riordan, 1989).

Conforme Das e Soffer (1975) a ECA de pulmão de coelho, possui um alto conteúdo de oligossacarídeos (em torno de 25%) e uma alta porcentagem de resíduos ácidos (21-22%), contribuindo para um baixo ponto isoelétrico, o qual foi determinado entre 4,3 e 5,2. A fração de resíduos hidrofóbicos é de 44% sugerindo um alto grau de hidrofobicidade. A enzima é relativamente rica em aminoácidos aromáticos, principalmente em triptofano. A treonina e a alanina são respectivamente o N e o C-terminal da ECA.

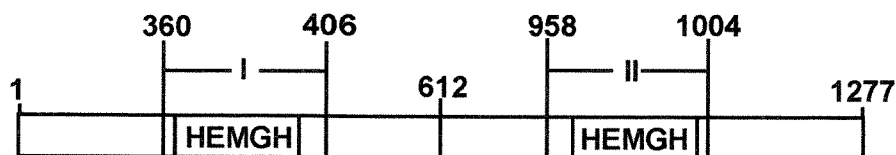
Devido o seu alto conteúdo de carboidratos e pelo seu formato grande (8-32% conforme Soffer, 1981; Ondetti e Cushman, 1982), a determinação de seu peso molecular por cromatografia em gel gerou algumas confusões iniciais que resultou em altos valores. Atualmente, duas formas tem sido descritas: uma forma somática (derivada do endotélio) e outra de origem testicular denominada forma germinal. A

ECA somática é uma glicoproteína composta por uma única cadeia polipeptídica de peso molecular em torno de 170 kD e contendo dois grandes domínios homólogos, cada um comportando um sítio catalítico ativo (Wei et al., 1991). A forma germinal da ECA possui um peso molecular menor que o da enzima de forma somática (90-110 kD; Lattion et al., 1989) e contém somente um sítio ativo, o qual corresponde ao domínio C-terminal (Ehlers e Riordan, 1991).

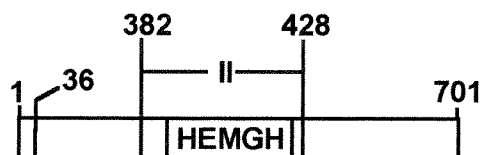
Clonagens moleculares do DNA da ECA de rins humanos demonstraram que essa enzima compreende 1306 resíduos de amino-ácidos. Alhenc et al. (1990) demonstraram que a seqüência dos primeiros 29 resíduos de aminoácidos é altamente hidrofóbica além de outra entre os aminoácidos 1231 e 1247, vizinho ao extremo C-terminal da enzima. Essa região da enzima comumente encontra-se ancorada à membrana plasmática pelo extremo C-terminal por um pequeno domínio transmembrânico. Possui dois domínios de alta homologia ($\geq 60\%$), o N-terminal (entre os resíduos 360 e 406) e o C-terminal (entre os resíduos 958 e 1277), sendo um deles o sítio ativo que contém o Zn^{2+} como indicam alguns experimentos (Alhenc e Soubrier, 1990). Essa observação sugere que o gene da ECA em humanos, é resultado da duplicação e fusão de mais de um gene ancestral. Portanto, a seqüência de aminoácidos expõe uma homologia interna entre dois grandes domínios circundados por uma pequena região não homóloga.

A seqüência de aminoácidos também indica que o número e a posição de resíduos de cisteína são idênticos nos dois domínios indicando possibilidades para o estabelecimento de pontes dissulfeto (das quais ainda desconhecem-se as posições), importantes para a mobilidade e interação entre os dois domínios.

Resultados recentes de clonagem molecular tem demonstrado que a ECA de origem testicular possui somente o domínio mais próximo ao extremo C-terminal, diferindo dos dois contidos em outros órgãos (Ehlers e Riordan, 1989, 1991). Como mostrado no esquema que segue, existe uma seqüência idêntica entre os resíduos 612 - 1277 das enzimas somáticas e 36 - 701 das de origem testicular. As regiões I e II (cuja seqüência de aminoácidos é HEMGH) são os supostos sítios ligantes do íon Zn^{2+} que possuem 89% de homologia (Ehlers e Riordan, 1991).



ECA Somática



ECA Testicular

Desde 1954, Skeggs et al. perceberam que a atividade da ECA dependia de Cl^- e de um cátion bivalente para mostrar sua atividade. Alguns experimentos demonstraram o envolvimento de um resíduo de lisina como seu sítio ligante (Ondetti e Cushman, 1982; Shapiro e Riordan, 1985; Ehrlers e Kirsch, 1988). Estudos à respeito do papel dos íons Cl^- e do Zn^{2+} têm demonstrado que são indispensáveis para a atividade catalítica da enzima.

Os quelantes de metais inibem a ECA por competição. Ocorre a formação da apoenzima livre do metal e a formação do complexo do metal quelado. Adicionando-se um íon metálico bivalente (Zn, Co, Mn) à enzima quelada, há uma restauração da atividade da enzima. No entanto, o zinco parece ser o mais ativo dos diferentes metais (Bünning e Riordan, 1985; Ondetti e Cushman, 1982).

Com base nessas observações, isto mostra claramente que tanto o íon cloreto quanto o íon zinco participam do mecanismo da ECA para a hidrólise do peptídeo. Também indica que o papel do zinco na ECA é similar aos encontrados nas enzimas carboxipeptidase A e termolisina.

Inibidores da ECA

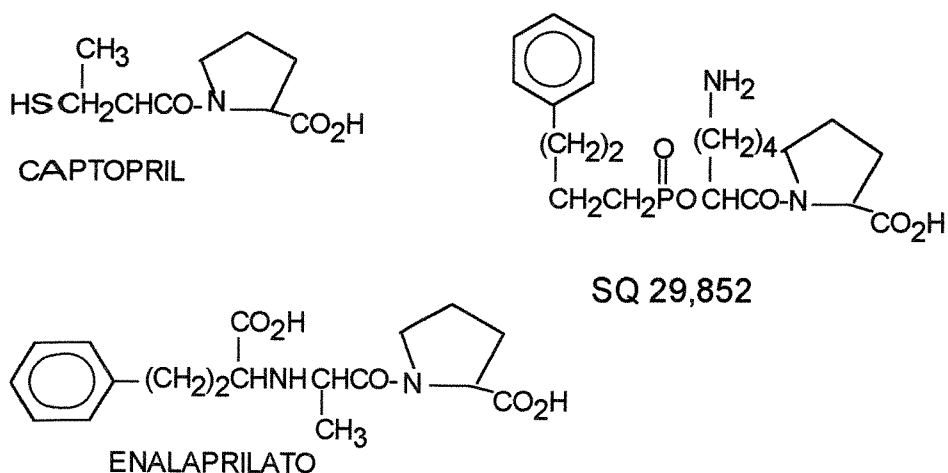
Em 1965, Ferreira observou que o veneno da serpente *Bothrops jararaca* inibia a inativação que a bradicinina sofre quando passa através da circulação pulmonar (Ferreira, 1965, 1967).

Bakhle (1968) descreveu que a mistura de peptídeos contida no veneno, inibia a inativação da bradicinina assim como a formação de angiotensina II (Soffer, 1976).

A maioria desses peptídeos foram descritos como inibidores competitivos da ECA (Ferreira, 1970). Seus efeitos foram atribuídos ou à alta afinidade que possuem com a enzima, ou pela presença do N-terminal bloqueado ou pelo dipeptídeo **Pro-Pro** na posição C-terminal. Essas características protegem-os da ação de aminopeptidases, carboxipeptidases e de enzimas conversoras que não clivam um peptídeo contendo o grupo imino do resíduo prolina.

A partir da estrutura dos peptídeos do veneno, uma série de inibidores foram sintetizados com potencial utilização nos tratamentos de hipertensão arterial e em doenças cardíacas (Soffer, 1976; Powell et al., 1989; Shioya et al., 1991; Unger et al., 1992).

Os inibidores sintéticos da ECA dividem-se quimicamente em três classes e todos já foram introduzidos na clínica: 1) os contendo o grupo sulfidril (captopril e análogos; Cushman et al., 1977), 2) os carboxialquil-peptídeos (enalapril e análogos; Patchett et al., 1980) e 3) os contendo o grupo fosfonilo (fosinopril e o derivado SQ 29582; Ondetti, 1988). Um exemplo de cada grupo é mostrado pela figura:



Entre os grupos há diferenças de peso molecular e polaridade que influenciam nas vias de eliminação e distribuição nos tecidos.

Medida da atividade da ECA

Vários métodos foram descritos para a determinação da ECA usando substratos fisiológicos ou não. As técnicas descritas baseiam-se na determinação do resíduo His-Leu liberado por ação da ECA por fluorimetria ou utilizam tripeptídeos sintéticos com o grupo N-terminal derivatizado medindo-se His-Leu por fluorimetria ou o resto, por espectrofotometria ou fluorimetria (Soffer, 1976).

O emprego de substratos naturais como a angiotensina I e a bradicinina, foi praticamente abandonado, devido ao fato desses substratos serem mais sensíveis à hidrólise, por outras peptidases (Bakhle, 1974). Além disso, o uso de substratos sintéticos são economicamente mais viáveis.

O substrato sintético mais usado é o hipuril-histidil-leucina (HHL), o qual a ECA hidroliza e libera ácido hipúrico que pode ser medido por espectrofotometria (Soffer, 1976; Hurst e Smith, 1981).



1.2. O ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma substância endógena que possui importante função na regulação do tonus vascular e como mediador de efeitos de vasodilatadores dependentes do endotélio de agonistas tais como a acetilcolina e a bradicinina (Furchgott, 1983).

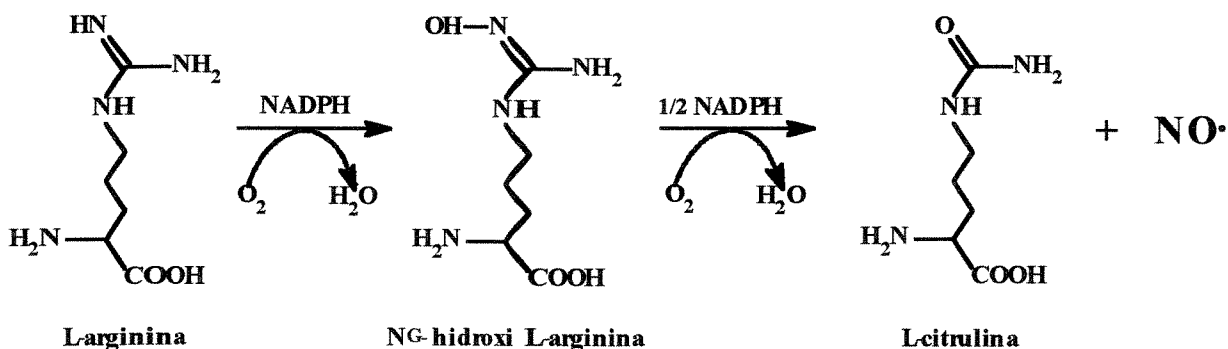
Histórico

O óxido nítrico foi identificado química e farmacologicamente como sendo um dos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) descrito por Furchgott e Zawadzki (1980); simultaneamente por Palmer et al. e Ignarro et al. em 1987. Marletta et al., em 1988, chegaram à mesma conclusão a respeito da origem dos íons nitrato e nitrito produzidos por macrófagos murinos imunoestimulados em cultura. De forma análoga às descobertas em culturas de macrófagos, o NO de origem endotelial foi confirmado como produto de oxidação da L-Arginina em uma reação catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS; Palmer et al., 1988).

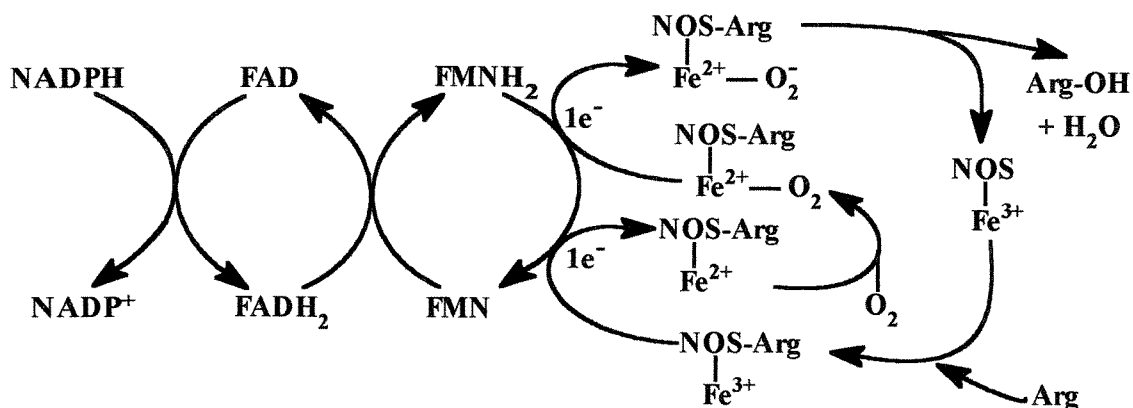
Do ponto de vista funcional, duas formas de NOS tem sido identificadas: uma constitutiva que se encontra nas células endoteliais e no cérebro (atividade dependente do íon Ca^{2+} e calmodulina) e outra, não dependente de Ca^{2+} e calmodulina exógena, cuja síntese é induzida por tratamento com interleucinas (interferon gamma ($\text{Ifn-}\gamma$), interleucina-1 (IL-1), etc) e inibida por corticóides (para revisão vide Moncada et al., 1991).

A biossíntese de NO

A reação consiste na oxidação por oxigênio molecular (O_2) de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal a NO (Leone et al., 1991). Esta oxidação envolve uma transferência de cinco elétrons e ocorre em duas etapas, conforme é ilustrado a seguir:



Na primeira etapa forma-se, por transferência de dois elétrons, o produto intermediário N^o-hidroxi L-arginina (Stuher et al., 1991), o qual se mantém firmemente unido à enzima, mas que sob determinadas condições pode ser isolado como produto (Klatt et al., 1993). Esta primeira reação assemelha-se às clássicas oxidações mediadas pelas redutases do sistema de citocromo P450 (RCP) dependentes de NADPH (forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida e fosfato de adenina). Nestas reações um equivalente eletrônico é transferido do NADPH à flavoproteína FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), esta reduz o FMN (mononucleotídeo de flavina), a qual por sua vez reduz o Fe³⁺ a Fe²⁺ do grupo heme (protoporfirina IX nas NOS de cérebro e macrófagos), conforme o esquema:



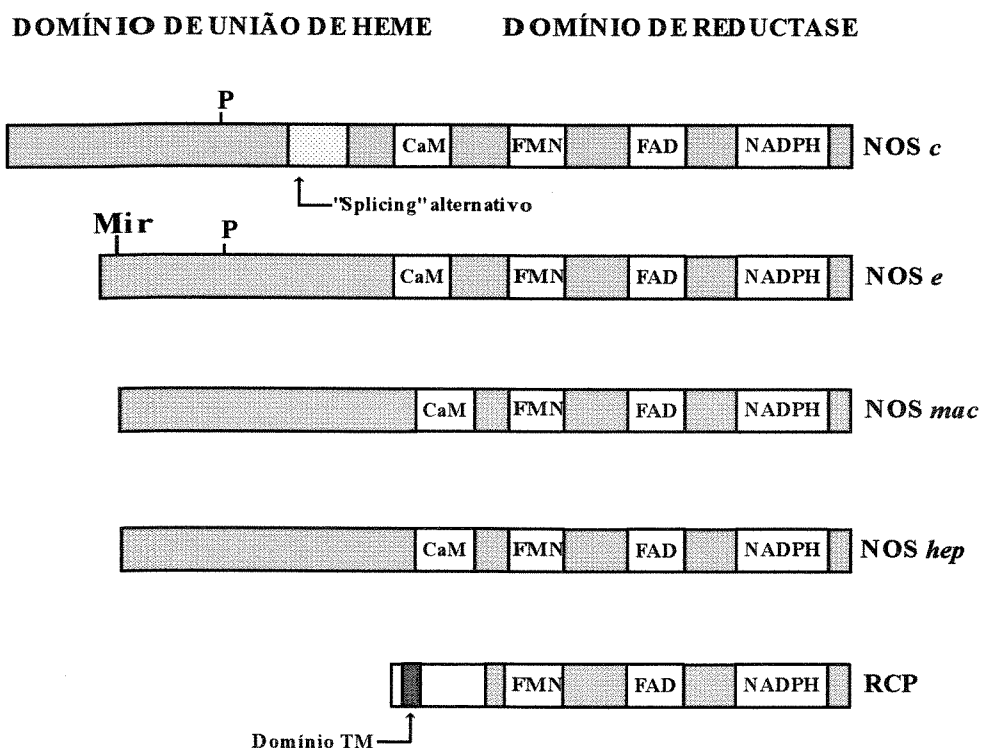
O monóxido de carbono (CO) bloqueia essa etapa de hidroxilação, o qual é consistente com a participação de um grupo heme tipo citocromo P450. O próprio NO parece exercer algum tipo de inibição por retroalimentação pelo mesmo mecanismo (Rengasamy e Johns, 1993; Assreuy et al., 1993). A reação é acelerada por tetrahydrobiopterina (H₄B) e requer calmodulina (CaM; Stuhler et al., 1991; White e Marletta, 1992; Klatt et al., 1993).

A segunda etapa, isto é, a oxidação da N^g-hidroxi L-arginina a NO e L-citrulina ocorre por transferência de mais três elétrons. Esta reação não está tão bem caracterizada quanto a primeira, já que qualquer mecanismo que tente explicá-la deverá dar conta dos seguintes achados experimentais: a) utiliza 0.5

equivalente de NADPH; b) requer O_2 e CaM; c) é acelerada por H_4B ; d) é inibida por CO e análogos da L-arginina, mostrando dessa forma um comportamento farmacológico semelhante àquele observado na etapa de hidroxilação (Stuher et al., 1991; White e Marletta, 1992; Klatt et al., 1993). Modelos de mecanismos desta reação deveriam explicar o fato de que duas reações de oxidação da L-arginina (sucessivas e independentes) ocorrem num sítio ativo comum da enzima (Bredt e Snyder, 1994).

As isoformas da NOS e suas propriedades bioquímicas

Diferentes isoformas da NOS tem sido localizadas em cérebro (NOS_c), endotélio (NOS_e), macrófagos (NOS_{mac}) e fígado (NOS_{hep}). No seguinte esquema são mostradas e comparadas com a redutase do citocromo P450 (RPC):



NOS constitutivas

NOS cerebral

A NOS cerebral é de localização citossólica como descrita por Gorsky et al. (1989), e requer NADPH como cofator, é regulada pelas concentrações fisiológicas de Ca^{2+} e é dependente de CaM. O cerebelo é a área de maior atividade dessa enzima (Förstermann et al., 1990).

Clonagens moleculares dessa isoforma isolada demonstraram um polipeptídeo de 160 kD que apresentava em seu C-terminal (domínio de reductase) 36% de homologia com a RCP (Bredt et al., 1991).

Na ausência de L-arginina, o domínio de reductase pode transferir elétrons do NADPH para o O_2 , e formar assim ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Com base nesses fatos, Bredt e Snyder, 1994, propõem que a NOS seja um resultado evolutivo da RCP.

NOS endotelial

Estudos realizados por Förstermann et al. (1991), com frações intracelulares de cultura de células endoteliais revelaram uma atividade da NOS endotelial como 95% unida à fração particulada, e o restante 5% citossólica. O mesmo resultado foi obtido em células endoteliais nativas (Mitchell, 1991).

Eletroforese em SDS-PAGE mostrou um peso molecular de 135 kD para a NOS particulada procedente tanto de células nativas como em cultura.

A NOSe particulada foi clonada e a sequência predita pelo cDNA mostra 60% de homologia com a NOSc (Lamas et al., 1992; Sessa et al., 1992; Janssens et al., 1992). Existe alto grau de conservação entre os domínios para a união com FAD, FMN, NADPH, CaM e de fosforilação (P) por uma kinase dependente de AMPc (PKA). Há também uma sequência para miristoilação (Mir) que explica a localização da proteína na fração particulada da célula endotelial. Mutações nessa região dão origem a uma NOSe solúvel (Busconi e Michel, 1993).

NOS induzíveis

Em 1985, Stuhler e Marletta descobriram que macrófagos murinos em cultura podiam ser induzidos com lipopolissacarídeos (LPS de parede de *Escherichia coli*) para produzir quantidades significantes de nitrato e nitrito. Em 1987, Hibbs et al. deram origem enzimática a esta produção e, no mesmo ano, Stuhler e Marletta obtiveram a mesma indução de NO em macrófagos murinos com a citocina interferon- γ (Ifn- γ).

A enzima responsável pela liberação de NO em macrófagos estimulados por LPS/Ifn- γ (NOSmac) foi encontrada na fração citossólica (Marletta et al., 1988) e posteriormente clonada (Xie et al., 1992; Lyons et al., 1992; Lowenstein et al., 1992).

O cDNA revelou uma seqüência de aminoácidos com 50% de homologia com a NOSc e 51% com a NOSe. O peso molecular encontrado foi de 133 kD e apresenta domínios para união de NADPH, FAD, FMN e CaM.

Em humanos, a NOSmac ainda não foi clonada. Contudo, o tratamento *in vitro* com LPS, Ifn γ , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL - 1 β) induz a síntese de NOS em hepatócitos (NOShep; Geller et al, 1993), e a IL - 1 β a induz em condrócitos.

Os cDNA das NOS induzíveis de hepatócitos e condrócitos são idênticos e apresentam 82% de homologia com a da NOSmac de camundongo, sugerindo que há duas isoformas diferentes (Geller et al., 1995).

Inibição da síntese de NO / Modelo de hipertensão arterial

Sendo a hipertensão arterial (HA), em humanos, uma patologia de etiologia, provavelmente, multifatorial, vários são os modelos animais que visam reproduzir as características da doença. Os mais estudados são: o modelo renovascular (Goldblatt II ou 2K-1C; Goldblatt, 1934), o de hipertensão geneticamente determinada (SHR; Okamoto e Aoki, 1963) e o decorrente da administração crônica de acetato de dioxycorticosterona e sal (DOCA/Salt; Gavras et al., 1975).

Mais recentemente, um novo modelo fisiopatológico de HA, foi descrito (Ribeiro et al., 1992; Jover et al., 1993; Sigmon e Beierwaltes, 1993), tendo por mecanismo principal a inibição crônica da síntese de óxido nítrico (NO), utilizando-se inibidores farmacológicos da NOS como o L-NAME, éster metílico da N^ω-nitro-L-arginina (Rees et al., 1990); L-NMMA, N_g-monometil-L-arginina (Hibbs et al., 1987; Palmer, 1988); L-NIO, N_g-iminoetil-L-ornitina (Rees et al., 1990). Estas substâncias são análogas da L-Arginina que inibem a NOS por competição. (Moore et al., 1990; Rees et al., 1990). A administração desses ou de outros análogos substituem a L-arginina para inibir a síntese de NO induzindo uma elevação da pressão arterial. Essa hipertensão pode ser parcialmente revertida pela administração aguda de L-arginina, mas não pela D-arginina (Rees et al., 1990) e pode estar envolvida ao sistema renina-angiotensina. Em fases mais avançadas, o modelo é caracterizado por uma disfunção renal (Baylis et al., 1991, Ribeiro et al., 1992; Navarro et al., 1994; Roger et al., 1994). Uma série de estudos tem sido realizados sugerindo a existência de uma interação funcional entre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a inibição da síntese de NO no controle do fluxo de sangue renal (Navarro et al., 1994; Johnson et al., 1994; Roger et al., 1994; John et al., 1995). Tais estudos no entanto, são controversos em relação à liberação de renina no plasma. Alguns autores como Elsner et al. (1991) e Tresham et al. (1991) observaram que não há alteração na atividade da renina no plasma. Para outros essa atividade é diminuída em função do efeito inibitório dos análogos da L-arginina (Gardes et al., 1992; Danamberg et al., 1993; Johnson et al., 1992; Naess et al., 1993; Navarro et al., 1994). Johnson et al. (1994) descreveram a atividade da renina plasmática dependente da pressão de perfusão renal.

Outro efeito importante envolvido nesse sistema é a atenuação da hipertensão pelos inibidores da ECA e pelos antagonistas de angiotensina II (Ribeiro et al., 1992; Nafrialdi et al., 1994; Cachofeiro et al., 1995). Tais envolvimento ainda estão sendo pesquisados e não estão claros.

2. OBJETIVOS

Visto a importância da atuação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o NO na fisiopatologia da pressão arterial, o presente trabalho tem por objetivos:

1) Estabelecer e padronizar um método para a dosagem da atividade de ECA em homogenatos de tecidos de rato (coração, rim, fígado e pulmão).

2) Com base nas observações relatadas na introdução, investigar se o tratamento crônico de ratos com o inibidor da NOS, o éster metílico da N^o-nitro-L-arginina (L-NAME) modula a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona mediante a alteração da atividade da ECA tecidual proveniente de homogenatos de coração, rim, fígado e pulmão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho estão descritos abaixo com as respectivas procedências:

Reagente	Procedência
2,4,6 Tricloro- 1,3,5 triazina	Sigma Chem. Co, EUA
Ácido bórico	Merck, RJ
Ácido clorídrico	Merck, RJ
Ácido enalaprílico injetável (Renitec)	MS & D; Prodome, SP
Ácidoetilenodiaminotetracético (EDTA sal dissódico)	Merck, RJ
Ácido hipúrico	Sigma Chem. Co, EUA
Albumina de Soro Bovino	Sigma Chem. Co, EUA
Azida sódica	Carlo Erba, Itália
Bicarbonato de sódio	Riedel-de-Haën, Alemanha
Captopril	Sigma Chem. Co, EUA
Cloreto de cálcio	Merck, Alemanha
Cloreto de sódio	Reagen,RJ
Dimetil POPOP (1,4-di-(2-(4-metil-5-feniloxazolil) benzeno	Koch-Light Lab., Inglaterra
Dioxano	Merck,RJ
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Sigma Chem. Co, EUA
Dowex 50W (X-200/ forma ácida)	Sigma Chem. Co, EUA
Éster metílico da N ^o nitro-L-arginina hidrocloreto (L-NAME)	Sigma Chem. Co, EUA

Etanol Absoluto	Merck, RJ
Fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF)	Sigma Chem. Co, EUA
Fosfato de potássio	J.T. Baker, SP
Hidróxido de sódio em lentilhas	Merck,RJ
Hipuril-Histidil-Leucina (HHL)	Sigma Chem. Co, EUA
L-[2,3,4,5- ³ H] Arginina.HCl	Amersham, Alemanha
L-Arginina.HCl	Sigma Chem. Co, EUA
L-Citrulina.HCl	Sigma Chem. Co, EUA
Maleato de enalapril	Sigma Chem. Co, EUA
N,N,N',N'-Ácido tetracético etileno glicol-bis (β-amino etil éter) (EGTA)	Sigma Chem. Co, EUA
N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etano sulfônico) HEPES	Sigma Chem. Co,EUA
β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)	Sigma Chem. Co, EUA
PPO (2,5 - difenil - oxazole)	Sigma Chem. Co, EUA
Reagente para fenol de Folin-Ciocalteau (2N)	Qeel, SP
Sulfato cúprico pentahidratado	BDH, Inglaterra
Sulfato de amônio	J.T. Baker, SP
Sulfato de zinco	Reagen, RJ
Tartarato de sódio e potássio	Reagen, RJ
Tetraborato de sódio decaidratado	Merck,RJ
Tolueno	Nuclear, SP
Tris (hidroxi-metil) amino metano (TRIZMA)	Sigma Chem. Co, EUA
Triton X-100	Nuclear, SP

3.1.2. Animais

Ratos Wistar, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, machos, com o peso corpóreo compreendido entre 150 e 200 g foram utilizados para a padronização do método para a dosagem da ECA tecidual e para o tratamento crônico com L-NAME.

Os animais utilizados neste trabalho foram mantidos e manipulados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3.1.3. Aparelhos

- Homogeneizador JANKE & KUNKEL - IKA® Labortechnik - ULTRA TURRAX T25 - Alemanha
- Centrífuga-refrigerada HERMLE - Z 360 K - Alemanha
- Centrífuga eppendorf Mod. 5412 - Alemanha
- Espectrofotômetro Kontron, Mod. UVIKON®810 - Suíça
- Espectrômetro de Cintilação, BECKMAN - E.U.A

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Padronização do método para a dosagem da ECA tecidual

O método utilizado para a dosagem da atividade da ECA tecidual está baseado no descrito por Hurst e Lovell-Smith (1981) com modificações, e consiste na reação do ácido hipúrico resultante da hidrólise do substrato HHL com o reagente cromogênico 2, 4, 6 - tricloro - 1, 3, 5 triazina, que forma um composto colorido de máxima absorbância a 382 nm. Esta reação foi aplicada a todas as amostras biológicas analisadas. A técnica geral descreve-se a seguir.

Preparação dos homogenatos

Os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por exsanguinação. A seguir, seus rins, coração, pulmão e fígado foram retirados e o excesso de sangue foi retirado por sucessivos lavados com solução salina fria (0,9% de NaCl) e tampão borato de sódio 50 mM, pH 7,4 contendo 300 mM de cloreto de sódio e 1 μ M de sulfato de zinco. Os tecidos foram dissecados, picados e lavados duas vezes, e por último homogeneizados em homogeneizador Ultra-Turrax, no mesmo tampão durante aproximadamente 30 segundos a 4°C.

Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 g, por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes obtidos foram utilizados como fonte da ECA.

3.2.1.1. Ensaios preliminares:

Com a finalidade de se determinar o volume de homogeneização dos tecidos e o tempo de incubação, alguns ensaios preliminares foram realizados.

Num primeiro ensaio os tecidos foram homogeneizados utilizando-se 1 ml de tampão borato pH 7,4 para o rim e fígado, e 2 ml para o coração. A quantidade de ácido hipúrico liberada a partir do substrato HHL nesses homogenatos foi medida a diferentes tempos de incubação (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min) afim de se verificar a linearidade da reação.

Após verificação da linearidade da curva de hidrólise do substrato em função do tempo, ensaiaram-se outras proporções de volume de tampão de homogeneização para cada órgão. Assim, cada rim foi homogeneizado em 3 ml, o fígado em 4 ml e o coração em 1 ml de tampão borato de sódio pH 7,4.

Afim de caracterizarmos farmacologicamente a atividade enzimática observada, utilizamos um inibidor específico de ECA, o ácido enalaprilico (enalaprilato). A absorbância devida ao ácido hipúrico foi medida paralelamente em tubos contendo 1) homogenatos + HHL, 2) homogenatos + HHL + 10 μ l de

solução de enalaprilato ($110 \mu\text{M}$) e 3) homogenatos desprovidos de HHL durante os tempos de 30, 60 e 120 min.

Extração da ECA da membrana

Com a finalidade de aumentar a atividade específica de ECA tecidual, nesse ensaio acertamos e padronizamos o volume de tampão Borato de sódio pH 7,4 para os tecidos de interesse: 15 ml para cada rim, 10 ml para o fígado e 1 ml para coração. Após serem homogeneizadas e centrifugadas a $3.000 g$, 4°C , os sobrenadantes foram incubados com Triton X-100 (Rubinstein et al., 1992) a uma concentração final de 0,5% (para cada $900 \mu\text{l}$ de amostra foram adicionados $100 \mu\text{l}$ de solução tampão Borato de sódio pH 7,4 usado para homogeneização dos tecidos com 5% de Triton X-100, V/V) as quais foram agitadas vigorosamente e incubadas durante uma noite a 4°C . Na manhã seguinte, foram centrifugadas a $10.000 g$ por 10 minutos. Nos sobrenadantes foram ensaiados a atividade de ECA. Nos ensaios realizados com pulmão decidimos homogeneizá-lo em 15 ml de tampão borato pH 7,4 por grama de pulmão visto que sob estas condições a geração de ácido hipúrico é linear com o tempo.

3.2.2. Dosagem da atividade da ECA tecidual

Todas as amostras foram processadas paralelamente em duplicata. Os tubos usados foram de vidro e após cada pipetagem os tubos foram agitados em vórtex.

Vinte microlitros de amostra (homogenato de órgão) foram incubados a 37°C na presença de $60 \mu\text{l}$ de tampão borato de sódio 150 mM pH 8,3 contendo 1250 mM de cloreto de sódio, e $20 \mu\text{l}$ do substrato sintético HHL. O tempo de incubação variou de 30 a 120 min, modificando-se no caso particular de cada uma conforme a atividade da enzima.

Cada amostra teve seu respectivo branco contendo 10 µl do inibidor específico ácido enalaprílico 110 µM junto ao substrato. A reação foi interrompida pela adição de 600 µl de um tampão contendo HEPES 100 mM, EDTA 2,5 mM e 0,1% de azida sódica.

O ácido hipúrico liberado do substrato HHL reagiu com 300 µl do reagente cromogênico 2, 4, 6 - tricloro - 1, 3, 5 triazina a 2,5% em dioxano resultando na formação de um composto amarelo.

Após a adição do reagente cromogênico esperou-se 10 min para que a reação se completasse e a seguir as amostras foram centrifugadas a 1.500 g durante 5 min para remoção das proteínas precipitadas pelo dioxano.

As leituras de absorbâncias produzidas pelos sobrenadantes foram lidas em espectrofotômetro a 382 nm contra água destilada num período de até 30 min após a centrifugação.

Padrões aquosos de ácido hipúrico contendo 0,5% de Triton X-100 (de concentrações compreendidas entre 18 e 1120 µM) foram processados em paralelo às amostras biológicas, e a quantidade de ácido hipúrico liberado foi obtida por cálculo a partir da curva padrão de absorbância em função das concentrações de ácido hipúrico, sendo as leituras corrigidas pelos respectivos brancos.

Os valores de atividade da ECA tecidual foram expressos relativizando-se a quantidade de ácido hipúrico obtido pelo tempo de incubação e pelo conteúdo de proteínas de cada amostra (**nmol de ác. hipúrico/min/mg de proteína**).

3.2.3. Dosagem de proteínas

O método utilizado para a quantificação das amostras biológicas foi o de Peterson (1977). Este método está baseado no descrito por Lowry (1951) e introduz o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) para a solubilização de possíveis interferentes lipídicos das amostras. O método é descrito a seguir.

Todas as soluções foram usadas em temperatura ambiente. Os tubos foram agitados em vórtex após cada pipetagem. Todas as amostras foram processadas em duplicata.

As amostras biológicas foram diluídas em água destilada ou em tampão de homogeneização para os homogenatos.

Quinhentos microlitros da amostra devidamente diluída foram incubados em temperatura ambiente e durante 10 min junto à 500 µl do reagente I (mistura de um volume de uma solução que continha 0,2% de sulfato cúprico pentahidratado, 0,4% de tartarato de sódio e potássio e 20% de bicarbonato de sódio; e um volume das demais soluções: hidróxido de sódio 0,8N, SDS 10% e água destilada).

A seguir, a mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 40 min com 250 µl do reagente II (reagente para fenol de Folin Ciocalteau 2N diluído em dois volumes de água destilada).

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 700 nm contra água destilada.

Uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) de concentrações compreendidas entre 5 e 50 µg/ml foi processada paralelamente às amostras biológicas.

Os valores do conteúdo de proteína foram expressos em mg/ml e calculados a partir da reta obtida por mínimos quadrados entre as inversas das absorbâncias corrigidas e as inversas das concentrações de proteínas ($[BSA]^{-1}$ vs. $[A]^{-1}$).

3.2.4. Curvas de inibição da ECA

Afim de se verificar a capacidade de inibição dos inibidores ácido enalaprilico, maleato de enalapril (enalapril) e captopril, algumas curvas de dose-resposta foram processadas *in vitro* seguindo-se o mesmo método descrito para a dosagem de ECA tecidual.

Vinte microlitros de cada inibidor foram pré-incubados com vinte microlitros de uma preparação semi-purificada de pulmão de coelho (preparada segundo em 3.2.4.1), durante 15 minutos a 37°C e depois junto ao substrato (30 minutos para o ácido enalaprilico e 120 minutos para o captopril e maleato de enalapril). No caso do maleato de enalapril, a atividade da enzima foi determinada na presença e na ausência de esterases hepáticas (responsáveis pela desesterificação e ativação do maleato de enalapril). As diferentes concentrações de amostras desse inibidor foram tratadas com 10 µl de esterases e quando na ausência dessas esterases somente com 10 µl de solução salina 0,9% a temperatura ambiente durante toda uma noite antes de sua incubação junto à enzima. A preparação das esterases é descrita em 3.2.4.2.

Também foram analisados o potencial de inibição *in vitro* do ácido enalaprilico na atividade da ECA dos tecidos em estudo (coração, rins, pulmão e fígado) de ratos controles. Os homogenatos foram processados como descrito anteriormente.

3.2.4.1. Obtenção de uma preparação semi purificada de pulmão de coelho:

Um coelho (New Zealand, 2,5 kg) foi sacrificado por overdose de Pentobarbital sódico i.v. (Sagatal®), a seguir o pulmão foi retirado e homogeneizado em 500 ml de solução fria de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8,3) contendo 1 µM de sulfato de zinco. A mistura foi congelada e descongelada duas vezes. Adicionou-se então Triton X-100 até uma concentração final de 0,5%. Esta mistura ficou sob agitação a 4°C por 24h e depois foi submetida a uma centrifugação (2000 rpm - 20 min.). O sobrenadante foi estocado a -15°C. Uma alíquota de 100 ml foi fracionada duas vezes com sulfato de amônio, primeiro entre 30% e 75% de saturação e depois entre 50% e 70% de saturação. Em ambos procedimentos os precipitados foram dissolvidos em tampão Fosfato de potássio (10 mM, pH 8,3) contendo 1 µM de Zn²⁺ e

dializado por toda a noite contra 1 litro do mesmo tampão (o qual foi trocado duas vezes durante esse período). O extrato resultante foi dividido em alíquotas e estocado em freezer.

Esse extrato foi utilizado em uma diluição de 1:200 (atividade = 10 nmol/min/ml), nas curvas de inibição *in vitro* descritos no ítem anterior.

3.2.4.2. Preparação da solução de esterases hepáticas

A preparação de esterases foi proveniente de um homogenato de fígado de rato (homogeneizado em 10 volumes, peso/volume, de salina fria 0,9%). Esse homogenato foi centrifugado por 30 min. a 4800g e 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20°C.

3.2.4.3. Preparação das soluções dos inibidores

Os inibidores foram diluídos em solução salina 0,9% para atingir concentrações de 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 ng/ml.

3.2.5. Indução de hipertensão em ratos por inibição da síntese de NO

Numa primeira etapa de nosso trabalho, os animais foram divididos em 2 grupos (n=5-7) e receberam:

- **Controle:** água de torneira.
- **L-NAME:** 20 mg/animal/dia de L-NAME em água de torneira. Considerando que cada rato ingere 50ml de água, por dia, a concentração da solução foi de 400 µg/ml de L-NAME.

Os animais foram tratados durante 1, 2, 4 e 8 semanas. A cada sete dias de tratamento, valores de pressão arterial média (PAM) de cauda e peso corpóreo foram registrados. Após cada período de tratamento, os animais foram submetidos à anestesia com éter etílico e foram retirados: os rins, coração, fígado e pulmão para a dosagem da atividade da ECA, conforme anteriormente descrito.

Numa segunda etapa de trabalho, outro grupo de animais (com características similares dos já descritos) foram divididos em 4 grupos (n = 5), tratados via oral (v.o.) e denominados como segue:

A - A: água de torneira durante 10 semanas;

A - L-NAME: água de torneira durante 2 semanas e L-NAME 20 mg/dia/animal durante as 8 semanas seguintes;

Ena - Ena: maleato de enalapril 25 mg/kg/dia durante 10 semanas;

Ena - L-NAME: maleato de enalapril 25 mg/kg/dia durante 10 semanas e concomitante L-NAME 20 mg/dia/animal durante as últimas 8 semanas.

A PAM desses animais também foram registradas a cada semana de tratamento.

No final do período de 10 semanas, os animais foram anestesiados com éter etílico, e tiveram seus cérebros retirados para a medida da atividade da NOS cerebral (conforme descrito em 3.2.7).

3.2.6. Pressão Arterial Média (PAM) de cauda

A técnica utilizada para o registro das PAM de cauda dos animais foi segundo o método não invasivo descrito por Zatz (1990), brevemente descrito a seguir.

Um pequeno microfone foi usado para a detecção das pulsações da artéria caudal do rato através de uma mangueira de borracha (20 a 30 cm). O sinal elétrico do microfone é registrado na tela de um osciloscópio. Para atenuar possíveis perdas de ar, a mangueira de borracha foi vedada com graxa lubrificante.

Um manguito de borracha, ligado a um manômetro foi colocado na base da cauda do animal (antes do microfone). As leituras de pressão foram obtidas através da observação de três valores similares de pressão e expressos em mmHg.

3.2.7. Determinação da Atividade da NOS cerebral

Após anestesia com éter, os animais foram decapitados e os cérebros foram retirados e imediatamente pesados e homogeneizados em 5 volumes de tampão pH 7,4, frio, contendo 50 mM em TRIS e 1 mM de L-citrulina e 1 mM de PMSF (peso/volume).

Cinquenta microlitros de homogenato foram incubados a temperatura ambiente (25-27°C) na presença de 1 mM de NADPH, 5 mM de CaCl₂ e 10 µM de L-arginina contendo 100.000 dpm de [2,3,4,5-³H] L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100 µl, durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão TRIS 50 mM pH 7,4. A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5,4, contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados durante 5 min. a 10.000 rpm e os sobrenadantes foram aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (Dowex 50W/X-200, do tipo aniônica forte). Os eluatos foram recolhidos em tubos de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados com os anteriores. Após a adição de 10 ml do líquido de cintilação (tolueno+Triton X-100 + PPO + POPOP) a radioatividade foi medida durante 1 min. em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas pelos respectivos brancos (homogenato foi adicionado após a parada da reação). Os resultados das atividades enzimáticas foram dados através da relação das contagens obtidas (cpm) com a atividade total (no qual os tubos receberam a [³H]L-arginina direto nos tubos de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-citrulina/min} = 1000 \times (\text{cpm amostra} - \text{cpm branco}) / \text{cpm totais} / 30$$

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação em min.

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Peterson (1977) e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por min. por mg de proteína.

Para cada cérebro foram realizados em paralelo controles farmacológicos da atividade enzimática que consistiram na omissão de CaCl_2 e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (NOS cerebral é dependente de Ca^{+2}) e na adição de 1 mM de L-NAME (inibidor da NOS).

3.2.8. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Caracterização da ECA tecidual

A figura 1 mostra valores do consumo de substrato pela ECA tecidual de homogenatos de fígado, coração e rim de ratos em relação ao tempo de incubação. A ECA de coração e fígado apresentam um consumo <10% de substrato enquanto que para a de rim esse consumo é um pouco maior. Note que a curva de consumo de substrato pela ECA renal começa a perder sua linearidade a partir dos 60 min de incubação.

A figura 2 mostra que a atividade da ECA tecidual de homogenatos de coração, fígado e rim é inibida na presença de enalaprilato 10 μ M, que é um inibidor específico dessa enzima. Esse valor se equipara ao obtido pela ECA na ausência de substrato, mostrando que a conversão de HHL para ácido hipúrico é, nas nossas condições, especificamente devida a ECA.

Conforme o exemplo de curva de calibração de ácido hipúrico mostrada na figura 3, as retas obtidas por regressão linear apresentaram uma inclinação média de $1,71 \pm 0,02$ (n=20) sendo que os interceptos não foram significativamente diferentes de zero, as curvas foram forçadas a passar pela origem.

Como ilustrado na figura 4, as curvas de calibração para as dosagens de proteínas (utilizando-se BSA em concentrações de 10 a 100 μ g/ml) mostraram que uma melhora na linearidade dessas curvas foi obtida quando as inversas da [BSA] foram plotadas em função das inversas dos valores de absorbância a 700 nm. A inclinação média dessas curvas foi de $8,02 \pm 0,31$ com valores de intercepto de -0.0032 ± 0.0005 (n=13).

As curvas de inibição da ECA tecidual realizadas *in vitro* são mostradas nas figuras 5 e 6. A figura 6 mostra a atividade da ECA de homogenatos de: a) coração, b) rim, c) fígado e d) pulmão de ratos na presença de diferentes concentrações de enalaprilato. Os valores de pl_2 , isto é, $-\log$ da concentração molar do inibidor que inibe a enzima em 50% de sua atividade total, encontrados para esses homogenatos situaram-se na mesma faixa de

concentração, ou seja, $7,84 \pm 1,12$ em coração, $7,78 \pm 1,05$ em rim, $7,82 \pm 0,50$ em fígado e $8,20 \pm 0,77$ em pulmão.

A efetividade do enalaprilato também foi estudada na inibição da atividade da ECA proveniente de uma preparação semi-bruta de pulmão, assim como a pró-droga maleato de enalapril, na presença e ausência de esterases hepáticas, e ao captopril. Os valores de pl_2 obtidos foram $9,13 \pm 0,58$ para o enalaprilato, $8,83 \pm 0,54$ para o maleato de enalapril na presença de esterases, $7,12 \pm 0,61$ para o maleato de enalapril na ausência de esterases e $8,37 \pm 0,73$ para o captopril. Esses valores indicam que o enalaprilato é o mais potente dos inibidores testados em ECA pulmonar de coelho.

Efeitos do tratamento crônico de ratos com L-NAME

A figura 7 mostra os valores de PAM dos ratos tratados com água (controle) e com L-NAME durante 1, 2, 4 e 8 semanas. Nota-se que os ratos tratados com L-NAME apresentam um aumento de PAM já na primeira semana de tratamento ($155,6 \pm 9,3$ vs. $121,7 \pm 3,8$ mmHg do controle, $p < 0,05$). Essa hipertensão se acentua ao longo das sete semanas seguintes ($166,0 \pm 5,3$ vs. $108,0 \pm 5,6$ do controle com 8 semanas de tratamento, $p < 0,001$).

Como mostrado no gráfico 8, os ratos tratados com L-NAME apresentam uma significativa perda de peso corpóreo a partir da quarta semana de tratamento ($230,6 \pm 11,8$ vs. $257,1 \pm 10,0$ g do controle para 4 semanas, $p < 0,05$ e $283,3 \pm 8,9$ vs. $340,0 \pm 10,4$ do controle para 8 semanas, $p < 0,001$).

As atividades da ECA tecidual desses animais são mostradas na Tabela 1. Nenhuma alteração ocorre na atividade ECA tecidual de homogenato de coração, fígado e pulmão dos ratos tratados com L-NAME quando comparados aos controles. Contudo, observa-se diminuição da ECA renal após 8 semanas de tratamento (L-NAME = $2,48 \pm 0,16$ vs controle = $1,76 \pm 0,13$. nmol/min/mg de prot. do, $p < 0,01$).

A figura 9 mostra que os valores de PAM aumentados pela inibição da síntese de NO com L-NAME no período de 8 semanas são controlados com o tratamento prévio e simultâneo com enalapril, não diferindo do grupo controle

($126,7 \pm 3,3$ vs. $121,6 \pm 0,5$ mmHg, respectivamente). Ratos tratados somente com enalapril tornam-se hipotensos em relação ao grupo controle ($107,0 \pm 1,9$ vs. $121,0 \pm 0,3$, respectivamente, com 8 semanas de tratamento).

Resultados das atividades das NOS cerebral desses animais são mostradas na figura 10. Ratos tratados com L-NAME durante 8 semanas tiveram cerca de 98% de inibição na atividade da NOS (controle = $8,21 \pm 0,02$ vs. L-NAME = $0,42 \pm 0,02$ pmol/min/mg, $p < 0,001$). Uma inibição semelhante também foi observada na atividade da NOS dos ratos que tiveram um pré-tratamento com enalapril (controle = $8,88 \pm 0,41$ vs. L-NAME + ENA = $0,70 \pm 0,07$, $p < 0,001$). Não se observou qualquer alteração na atividade da NOS cerebral do grupo tratado somente com enalapril em relação ao grupo controle (controle = $8,21 \pm 0,02$ vs. enalapril = $8,88 \pm 0,41$, $p > 0,05$).

5. FIGURAS E TABELAS

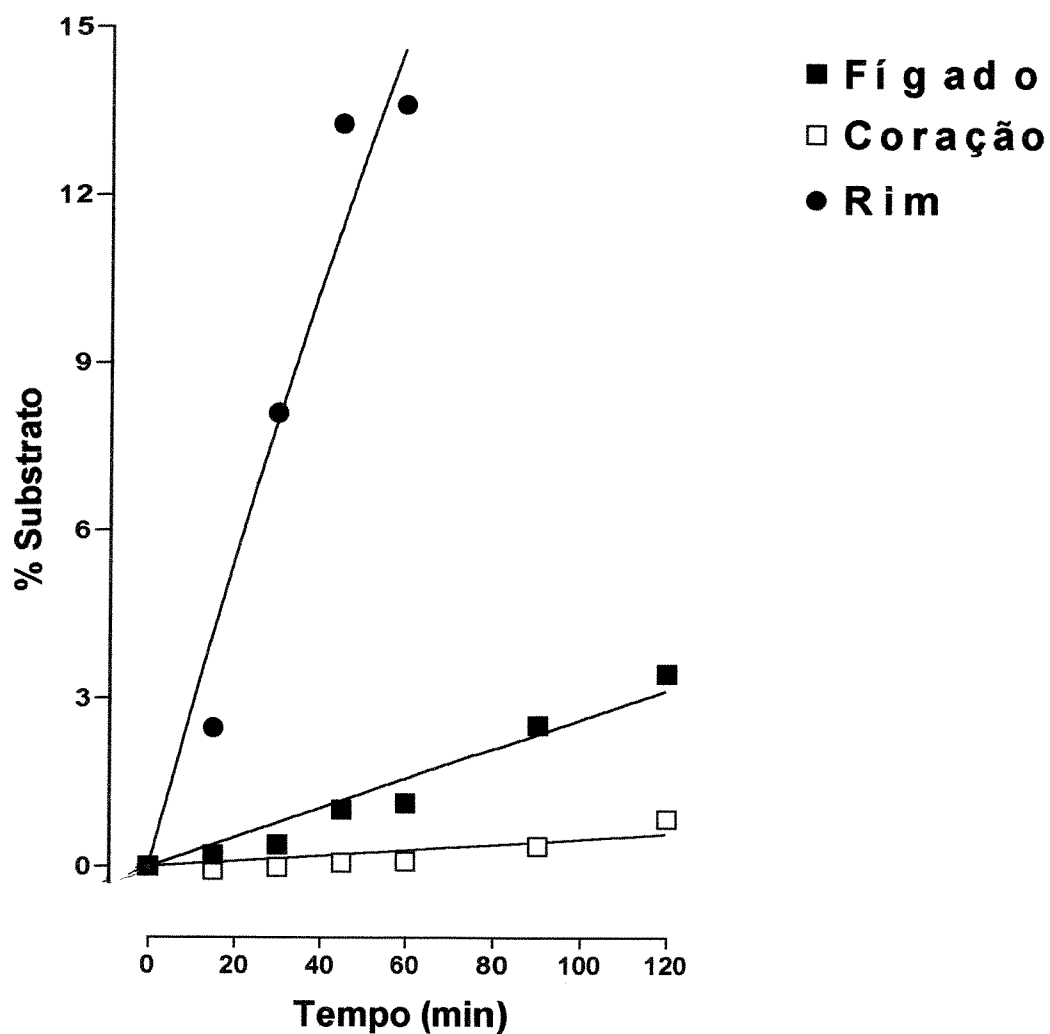


Figura 1: Valores do consumo de substrato pela ECA tecidual de homogenatos de coração, fígado e rim (respectivamente homogeneizados em 2, 1 e 1 ml de tampão borato, pH 7,4, contendo 300 mM em NaCl e 1 μ M de Zn^{2+}) em função do tempo de incubação.

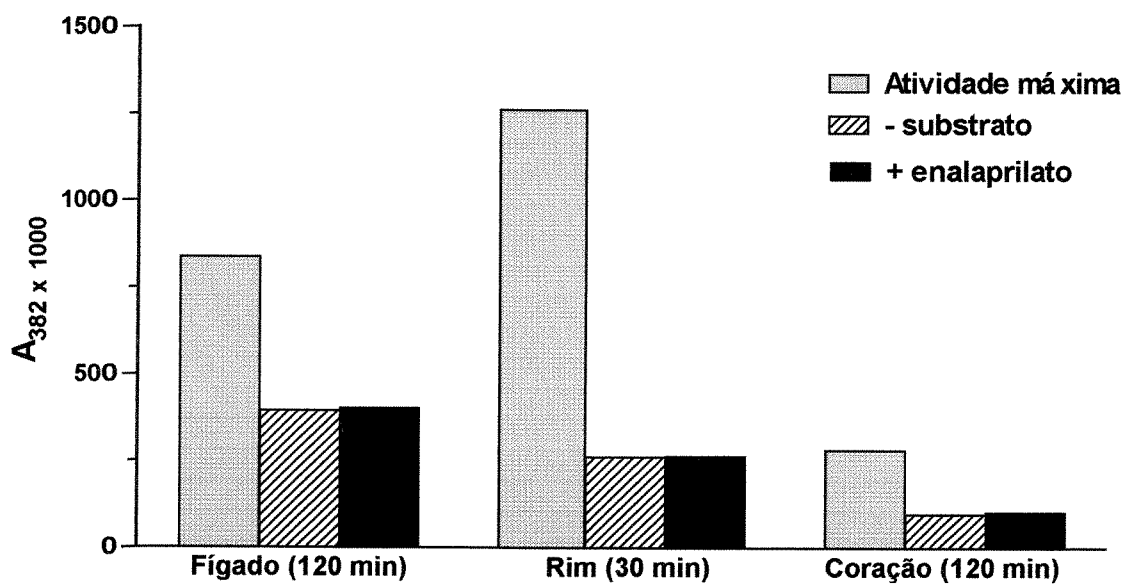


Figura 2: Valores das absorbâncias produzidas pela ECA tecidual de homogenatos de fígado, rim e coração (respectivamente homogeneizados em 4, 3 e 1 volume de tampão borato pH 7,4 contendo 300 mM em NaCl e 1 μ M em Zn^{2+}) na omissão do substrato e na presença do enalaprilato em relação à atividade máxima.

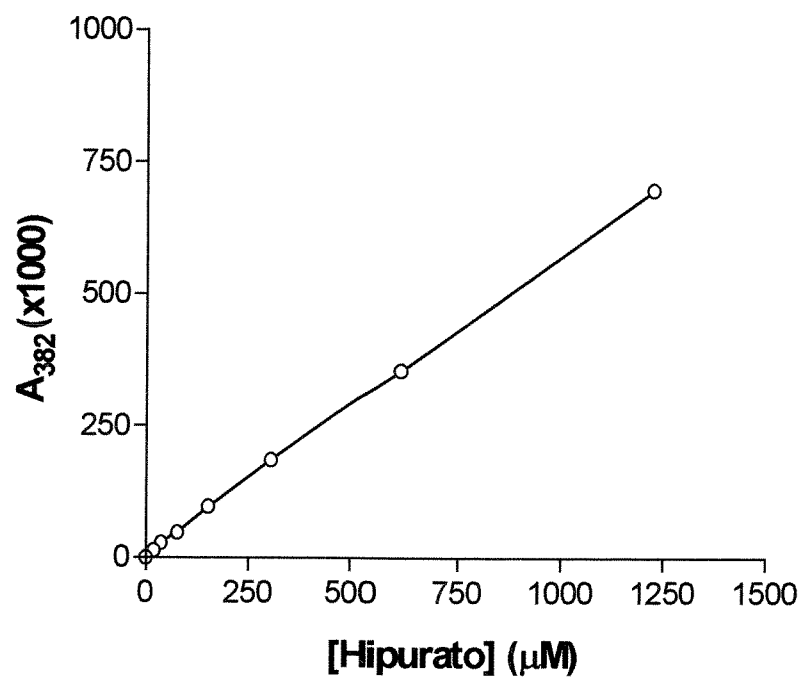


Figura 3: Exemplo de curva de calibração de ácido hipúrico utilizada nas determinações da atividade da ECA tecidual de ratos.

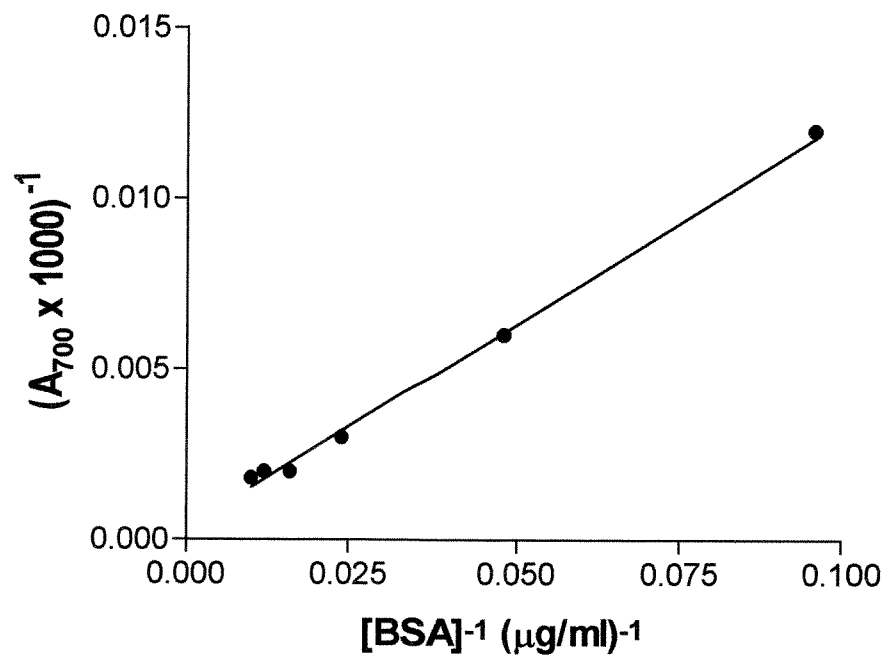


Figura 4: Exemplo de curva de calibração de proteínas utilizada nos ensaios de dosagem de proteínas dos homogenatos de órgãos de ratos.

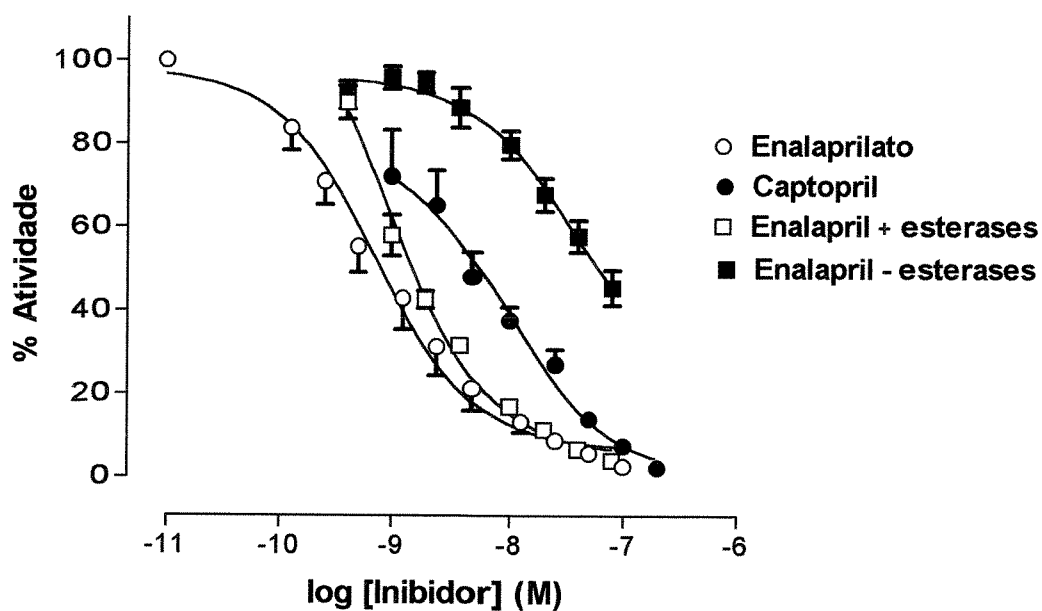
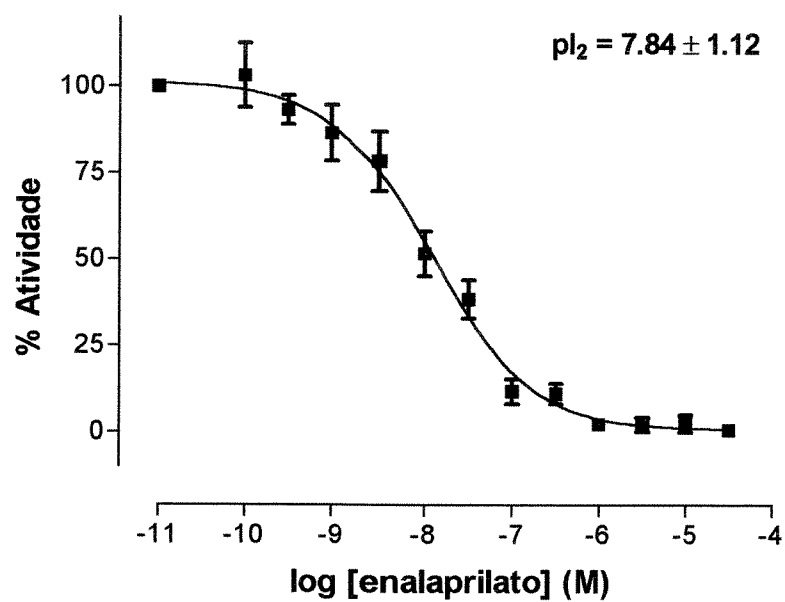
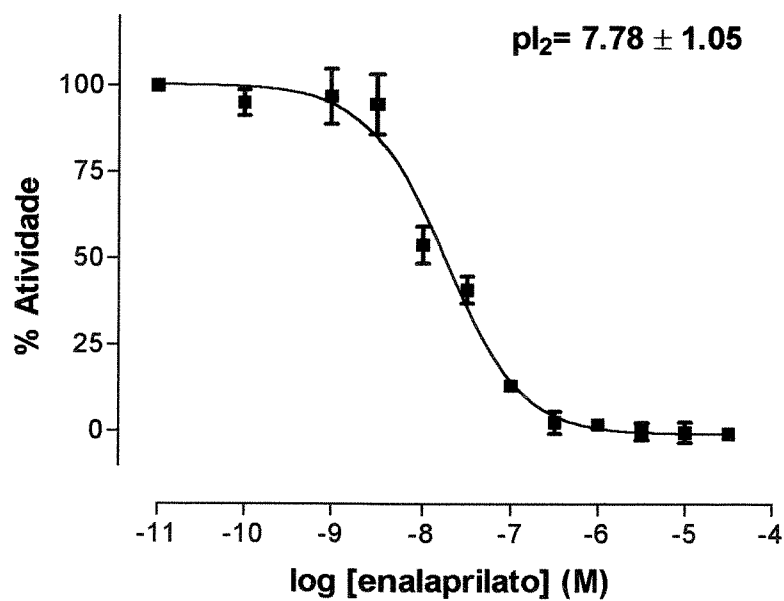


Figura 5: Curvas de atividade da ECA tecidual de uma preparação semi purificada de pulmão de coelho *in vitro* em função dos inibidores: enalaprilato ($pl_2 = 9,13 \pm 0,58$), captopril ($pl_2 = 8,37 \pm 0,73$), enalapril na presença ($pl_2 = 8,83 \pm 0,54$) e ausência ($pl_2 = 7,12 \pm 0,61$) de esterases hepáticas ($n=04$).

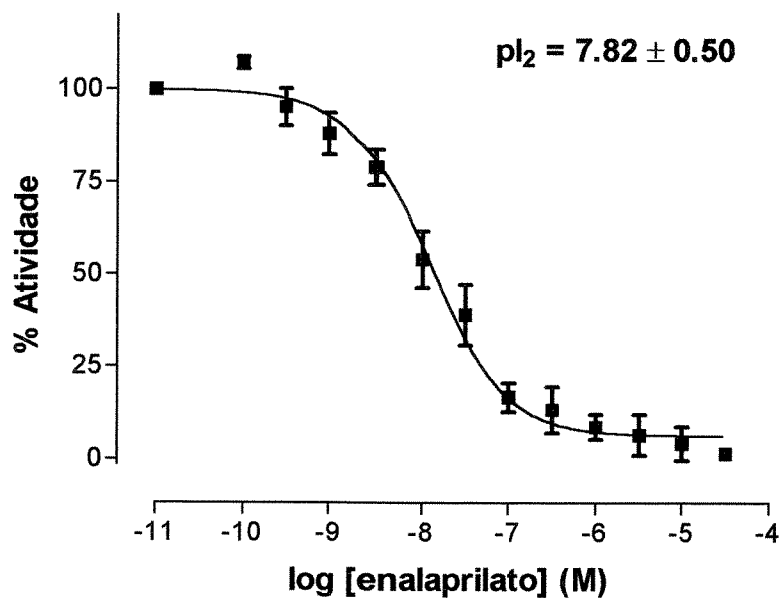
a)



b)



c)



d)

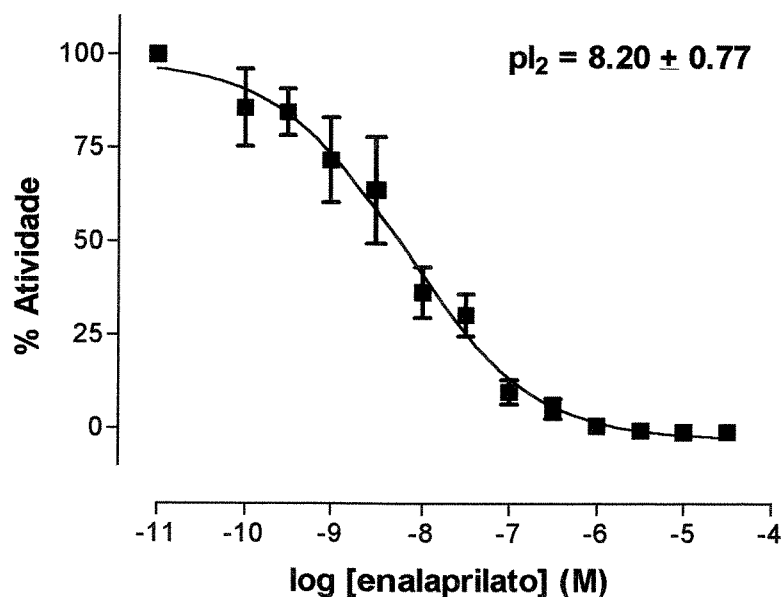


Figura 6: Curva de atividade da ECA tecidual medida em homogenatos de **a)** coração ($pI_2 = 7,84 \pm 1,12$), **b)** rim ($pI_2 = 7,78 \pm 1,05$), **c)** fígado ($pI_2 = 7,82 \pm 0,50$), e **d)** pulmão ($pI_2 = 8,20 \pm 0,77$) de rato *in vitro* em função das concentrações de enalaprilato (n=04).

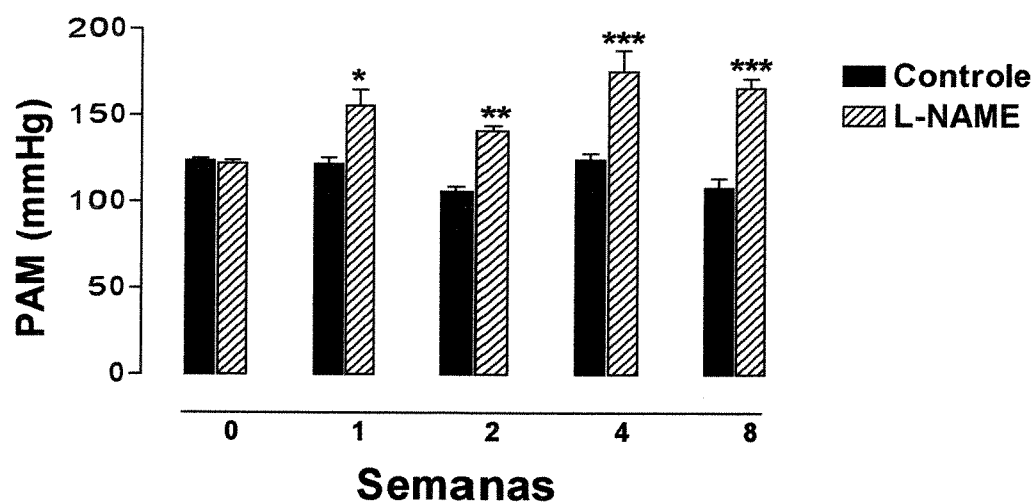


Figura 7: Valores de pressão arterial média (PAM; mmHg) de ratos controles e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, v.o.) durante 1, 2, 4 e 8 semanas (n= 5 - 7).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ vs. o respectivo controle.

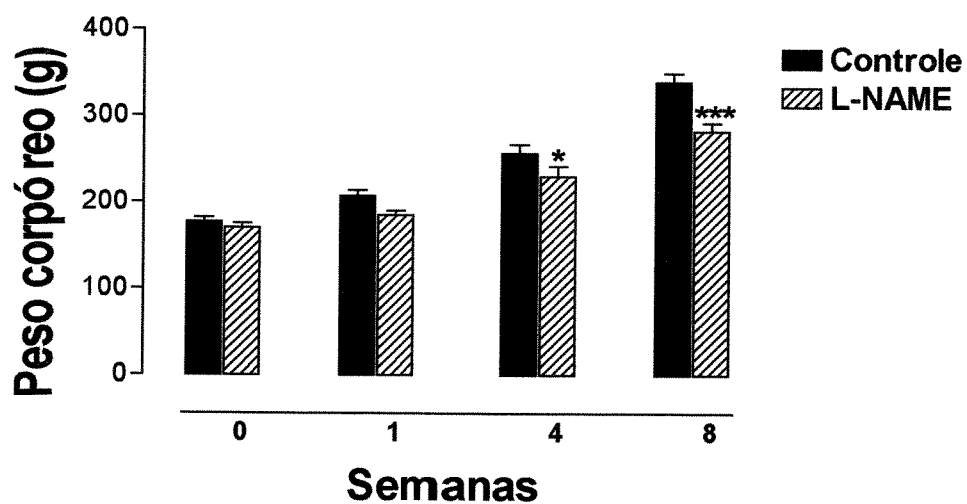


Figura 8: Valores de peso corpóreo (g) de ratos controles e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, v.o.) durante 1, 4 e 8 semanas (n= 5 - 7).

* = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$ vs. o respectivo controle.

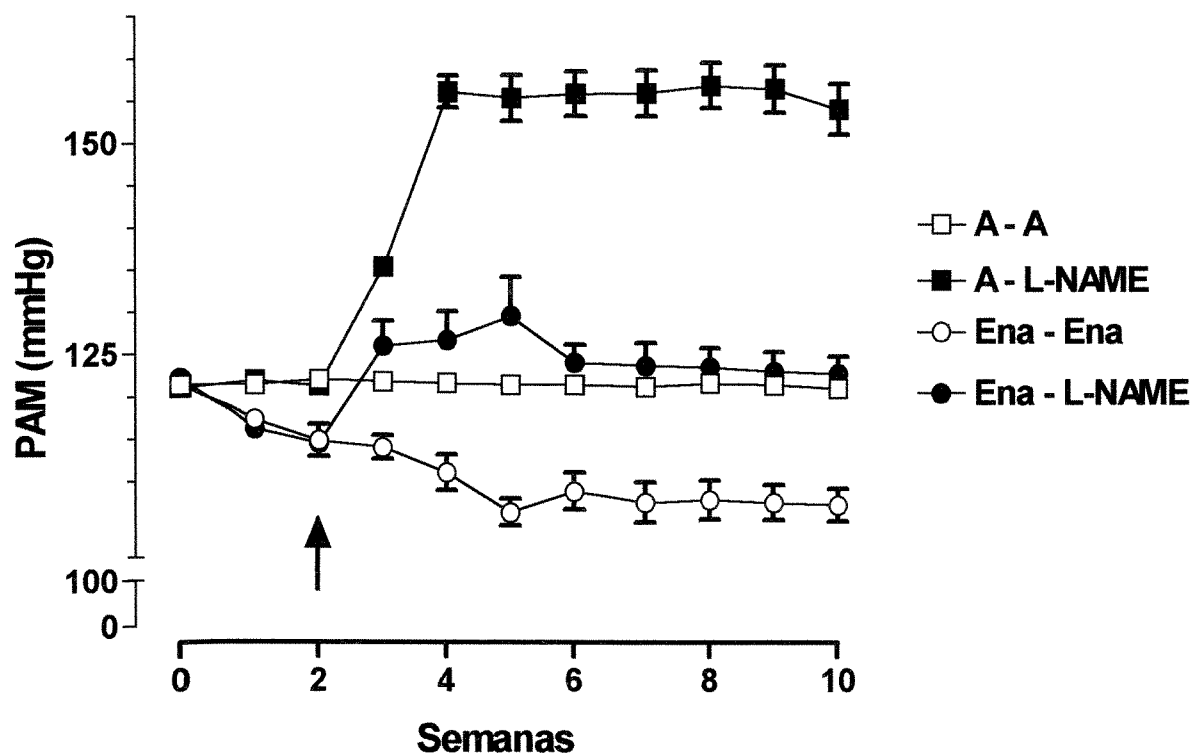


Figura 9: Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) de ratos tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, v.o.) com e sem pré-tratamento com enalapril (25 mg/kg/dia, v.o., grupos A - L-NAME e Ena - Ena, respectivamente). Os grupos controle dos tratamentos com enalapril e sem qualquer tratamento estão representados por Ena - Ena e A - A, respectivamente. A seta indica o tempo ao qual se iniciou o tratamento com L-NAME.

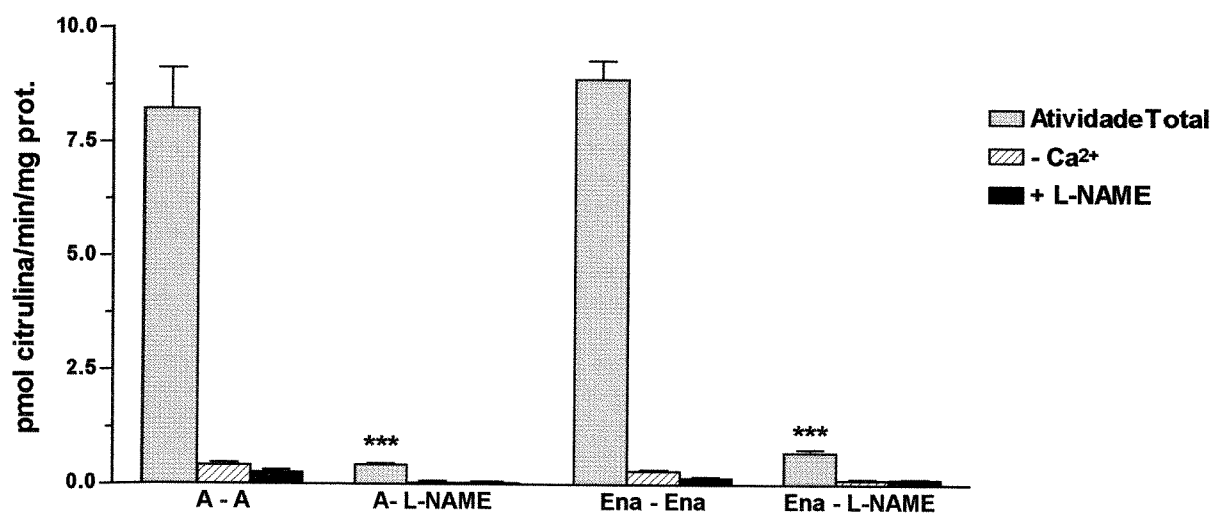


Figura 10: Valores da atividade da NOS cerebral *ex vivo* de ratos tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, v.o.) ou água (controle) com e sem pré tratamento com enalapril (25 mg/kg/dia).

***= $p < 0,001$ vs. o respectivo controle.

Tabela 1: Atividade da ECA tecidual medida em homogenatos de rim, coração, pulmão e fígado de ratos controles e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, v.o.) durante 1, 2, 4 e 8 semanas (n= 5 - 7).

Tratamento	Rim	Coração	Pulmão	Fígado
Controle 7 dias	1,71 ± 0,09	1,51 ± 0,28	2,20 ± 0,27	0,049 ± 0,007
L-NAME 7 dias	1,38 ± 0,16	1,85 ± 0,27	2,73 ± 0,69	0,061 ± 0,006
Controle 14 dias	1,75 ± 0,17	ND	ND	ND
L-NAME 14 dias	1,56 ± 0,11			
Controle 28 dias	1,36 ± 0,16	1,51 ± 0,11	2,27 ± 0,36	0,135 ± 0,015
L-NAME 28 dias	1,07 ± 0,09	1,16 ± 0,21	2,35 ± 0,24	0,122 ± 0,016
Controle 56 dias	2,48 ± 0,16	1,59 ± 0,12	2,11 ± 0,22	0,086 ± 0,010
L-NAME 56 dias	1,76 ± 0,13**	1,69 ± 0,36	2,01 ± 0,24	0,117 ± 0,014

** : $p < 0,01$ com respeito ao respectivo Controle (Student's *t* test para dados não pareados)

ND = não determinado.

6. DISCUSSÃO

O método de Hurst e Lovell-Smith (1981) originalmente descrito para dosagem da ECA sérica é um método prático e sensível. Portanto, decidimos utilizá-lo na quantificação da atividade de ECA tecidual em ratos. Esse método já foi aplicado para a dosagem da ECA pulmonar de ratos (Hayakari et al., 1978).

Com a finalidade de adequar esse método para outras fontes de ECA tecidual, decidimos realizar alguns ensaios preliminares para padronizarmos a relação de tampão de homogeneização para cada órgão (figura 1). Nesses ensaios também avaliamos o tempo de incubação junto ao substrato e o uso de um controle farmacológico para efetivamente caracterizar a enzima medida pela hidrólise do substrato HHL.

Incubando-se a enzima tecidual de coração (homogeneizado em 2 ml de tampão borato pH 7,4 na presença de 300 mM em cloreto de sódio e 1 μ M em Zn^{2+}), de fígado e de rim (homogeneizados em 1 ml do mesmo tampão usado para coração) em diferentes tempos até 120 min, obtivemos uma linearidade no consumo de substrato (HHL) com exceção no caso de rim que, como mostra a figura 1, começa a ser perdida após 60 min. Esse consumo não ultrapassou 10% para coração e fígado e foi um pouco superior para o homogenato de rim. Conforme Rubinstein et al. (1990) um consumo de substrato <10% permite assegurar que a velocidade de aparecimento de ácido hipúrico é máxima. Por isso, decidimos utilizar 3 ml de tampão na homogeneização do rim, 4 ml para fígado e 1 ml para coração.

Em um novo ensaio, a presença de enalaprilato no meio de incubação permitiu caracterizar a enzima dosada, pois o enalaprilato é um inibidor específico da ECA (Patchett et al., 1980). E como observado na figura 2 a presença de enalaprilato 10 μ M causa a mesma inibição que a omissão do substrato no meio de incubação. A uma concentração de 10 μ M observou-se uma total inibição conforme mostrado pelas curvas de inibição (figuras 6a, 6b,

6c e 6d) realizadas com ECA tecidual de homogenatos de coração, fígado, rim e pulmão de ratos. Essa inibição foi confirmada também nas curvas realizadas com ECA pulmonar semi-purificada (figura 5).

Através das curvas de inibição realizadas utilizando a preparação semi-bruta de ECA pulmonar de coelho, podemos observar que o enalaprilato é aproximadamente dez vezes mais potente que o captopril, outro inibidor da ECA com um pl_2 médio de 8,77, conforme descrito por Ondetti e Cushman (1982). Esses dados refletem também a efetividade do maleato de enalapril, pró droga do ácido enalaprílico, que sofre de-esterificação *in vivo* pelas esterases hepáticas. Podemos observar que esse potencial é menor na ausência de esterases (pl_2 de $8,83 \pm 0,54$ para $7,12 \pm 0,61$) no entanto, eficaz. O captopril apresenta um potencial de inibição menor que do enalapril devido a presença de um grupo sulfidríla em sua estrutura que é facilmente oxidado. Por estas razões, o enalapril foi escolhido como controle negativo (branco) na totalidade das dosagens de ECA tecidual.

Os resultados obtidos com este método foram comparáveis aos reportados por outros autores, que se valeram de outras metodologias.

A maioria dos autores utilizam um método radiométrico para a determinação das baixas atividades da ECA tecidual. Nesse método o tampão para a homogeneização das amostras é o Hepes pH 8,0, e o [3H]-hipuril-glicil-glicina é utilizado como substrato. A reação é interrompida com HCl e a extração do [3H]-ácido hipúrico liberado é feita com acetato de etila que está sujeito à perdas devido a volatilidade do solvente (Cohen e Kurz, 1981). Rubinstein et al. (1990) também utilizaram um método radiométrico já que os valores de atividade são muito mais baixos dos que por nós obtidos (ex: obtiveram atividades médias de 1,7, 18,0 e 14,0 nmol/h/mg de prot. para coração, rim e pulmão, respectivamente; enquanto nossos dados se encontram ao redor de 70,0, 111,0 e 130,0 para ratos controles).

No entanto, Pedraza-Chaverri et al. (1992) demonstraram maior expressão da atividade pulmonar (36 μ mol/min/mg de prot. vs. 0,002 por nós obtido) utilizando o método radiométrico descrito por Arévola et al. (1990) empregando

a Glicina-1- $[^{14}\text{C}]$ -HHL como substrato e a enzima de membrana foi solubilizada com o detergente Nonidet P-40. Estas diferenças metodológicas talvez expliquem as divergências nos resultados.

Chen et al. (1992) descreveram um método fluorimétrico para a dosagem da ECA de fluído cerebrospinal. Apesar de não ser um método para dosagem em tecidos não parece se adequar para tal. O método exige uma incubação muito prolongada com o HHL (24h) e utiliza EDTA para as amostras em branco que é quelante do íon Zn^{2+} , mas não é um inibidor específico. Os métodos fluorimétricos no qual se mede His-Leu após sua reação com um reagente fluorescente (Friedland e Silverstein, 1976; Conroy e Lai, 1978), estão sujeitos a erros porque His-Leu pode ser hidrolizado novamente por outras peptidases.

Um trabalho descrito por Oparil et al. (1995) compara a atividade enzimática da ECA em homogenatos de coração de cães pelo método de Chushman e Cheung (1976) com por eles desenvolvido que utiliza a detecção do ácido hipúrico por HPLC. Obtiveram diferenças significantes entre a atividade do ventrículo direito com o esquerdo que não foi observado pelo método tradicional de Chushman e Cheung (1976). Apesar de ser um método de alta precisão, Oparil et al. (1995) utilizam tampão fosfato para a homogeneização dos tecidos e uma alta concentração de zinco para restabelecer a atividade da enzima, visto que o fosfato já foi descrito como inibidor da ECA (Persson et al., 1977) possivelmente por seqüestrar o Zn^{2+} formando fosfato insolúvel. No entanto, usa Triton X-100 para solubilizar a ECA de membrana, HHL como substrato e captopril nas amostras em branco. Apesar de serem dados obtidos de ECA de coração de cães os nossos resultados de atividade da ECA em coração de ratos se assemelham com os dados por eles obtidos.

Os principais inconvenientes do método proposto por Chushman e Cheung (1976) foram corrigidos por Hurst e Lovell-Smith (1981) com o uso de 2,4,6 triclora 1,3,5 triazina que forma um cromóforo amarelo com o ácido hipúrico liberado de absorção em 382 nm, o qual evita a extração deste com solventes orgânicos e a medida de absorbância a baixos comprimentos de onda. O uso do dioxano (que precipita as proteínas) permite que os brancos apresentem valores

de absorvância baixos e a obtenção de sobrenadantes límpidos. Em geral, podemos concluir que o método original de Hurst e Lovell-Smith (1981) por nós adaptado foi suficientemente sensível e reprodutível para quantificar a atividade da ECA tecidual sem a utilização de substratos radioativos, técnicas custosas ou demoradas e passos de ultracentrifugação na preparação das amostras.

O tratamento com L-NAME, análogo da L-arginina, produz uma vasoconstrição renal e uma consequente hipertensão sistêmica (Ribeiro et al., 1992; Beierwaltes e Carretero, 1992) por inibição da síntese de NO. Em tratamentos crônicos, essa hipertensão foi revertida pela administração de um antagonista de receptores tipo I de angiotensina II, o losartan (Ribeiro et al., 1990; Jover et al., 1993), mas não de forma aguda (Nafriald et al., 1993). Também foi observado que, em tratamentos crônicos, essa hipertensão pode ser abolida pelo tratamento prévio e simultâneo com inibidores da ECA (Pollock et al., 1992; Nafrialdi et al., 1995; Nakamoto et al., 1995). A partir desses dados, conclui-se a interação da inibição da síntese de NO com a ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona. Vários trabalhos investigaram a atividade da renina plasmática e no entanto, ainda são controversos.

Existem dados de uma elevação (Ribeiro et al., 1992; Sigmon et al., 1992; Jover et al., 1993), de uma diminuição (Johnson e Freeman, 1992; Gardes et al., 1992; Danamberg et al., 1993; Navarro et al., 1994) e ainda de nenhuma alteração (Treshman, 1991; Elsner et al., 1992) na atividade da renina plasmática.

Navarro et al. (1994) explicam tais dados controversos como resultado do equilíbrio ou desequilíbrio de dois mecanismos que parecem afetar a atividade da renina plasmática: o aumento de pressão pela vasoconstrição tendendo a reduzir a liberação de renina e a inibição da síntese de NO tendendo a aumentar a liberação de renina.

No trabalho realizado por Ribeiro et al. (1992), tratamentos crônicos com L-NAME (60 mg/Kg v.o.) durante 2 e 4 semanas mostraram um aumento da atividade de renina plasmática de ratos não anestesiados. Jover et al. (1993),

confirmaram essa elevação da atividade da renina plasmática e a prevenção da hipertensão induzida pelo L-NAME (20 mg/Kg, administrado por gavagem) pelo tratamento prévio e simultâneo com o losartan. A atividade da renina plasmática desses animais se encontraram em níveis da do controle.

Sigmon e Bierwaltes (1993) averiguaram a alteração da atividade da renina plasmática em ratos com hipertensão sistêmica, causada pela inibição do NO com L-NAME, não anestesiados e anestesiados. Demonstraram que em ratos anestesiados ocorre um aumento e em ratos não anestesiados uma diminuição da renina plasmática apresentando uma resposta menor de angiotensina II na vasoconstrição renal devido a inibição do NO.

No entanto, Navarro et al. (1994) não observaram nenhuma alteração na renina com tratamentos de 5, 7,5 e 10 mg/100 ml de L-NAME durante 5 semanas. Uma diminuição só foi observada com uma dose de 30 mg/100 ml. Observaram que o grau de hipertensão é dependente da dose de L-NAME ou outros análogos da L-arginina. Tratamentos com baixas doses de L-NAME resulta em pequena elevação da pressão arterial.

Conforme os nossos resultados, o tratamento de ratos induz a uma hipertensão. Em relação à atividade da ECA, nenhuma alteração foi observada a nível tecidual, com exceção da atividade da ECA renal que sofreu uma diminuição após 8 semanas de tratamento com L-NAME. A hipertensão pode ser revertida pela administração prévia e concomitante de enalapril resultando em níveis de PAM semelhantes aos do grupo controle, após 4 semanas de tratamento.

Como pode ser observado, variadas e controversas são as conclusões a respeito da liberação da renina. Contudo, não existem resultados disponíveis na literatura sobre o efeito da inibição de síntese de NO sobre a atividade de ECA. Visto a importância cada vez mais crescente que diversos autores estão atribuindo ao sistema renina-angiotensina local (tecidual) sobre o circulante, é de se esperar que ainda venha a aparecer trabalhos que apoiem ou contradigam os nossos resultados.

A prevenção do estado de hipertensão obtido com antagonistas de receptores do tipo I de angiotensina II ou inibidores da ECA pode ser explicado também pela exclusão de um dos mais importantes vasoconstritores endógenos, a angiotensina II. Deste modo, a retirada de um fator vasodilatador como o NO poderia ser compensado pela retirada inespecífica de um fator vasoconstritor (como a angiotensina II) sem qualquer implicância fisiológica específica entre ambos os sistemas.

De qualquer forma, a diminuição da atividade de ECA renal após 8 semanas de tratamento com L-NAME pode refletir um mecanismo de retroalimentação negativa, objetivando que o organismo possa se sobrepor ao estado hipertensivo patológico. Sendo o rim o grande órgão encarregado da manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico e pressor, não é contraditório que esta diminuição da atividade de ECA tenha sido observada somente neste órgão e não em outros como coração, pulmão ou fígado.

Um efeito bioquímico direto do NO a nível de biossíntese da ECA não pode ser descartado, visto a alta reatividade do NO frente a muitos sistemas enzimáticos tais como enzimas da cadeia respiratória (Kosaka et al., 1989; Ignarro, 1992), RNA-polimerase (para revisão vide Henry et al., 1993), metaloproteínas (Lancaster Jr et al., 1992) e outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhenc, G.F.; Soubrier, F.; Hubert, C.; Allegrini, J.; Lattion, A.L. and Corvol, P.(1990): The angiotensin I converting enzyme (Kininase II): Progress in molecular and genetic structure. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** **15**: suppl 6, S 25-S 29.
- Assreuy, J.; Cunha, F.Q.; Liew, F.Y. and Moncada, S. (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide **Br. J. Pharmacol.** **108**: 833-7.
- Bakhle, Y.S. (1968): Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. **Nature** **220**: 919-925.
- Baylis, C.; Mitruka, B. and Deng, A. (1992): Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest.** **90**: 278-281.
- Braun-Menendez, E. and Page, I. (1958): Suggested revision of the nomenclature. **Science** **127**: 242-244.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann. Rev. Biochem.** **63**: 175-95.
- Bredt, D.S.; Hwang, P.M.; Glatt, C.; Lowenstein, C.; Reed, R.R. and Snyder, S.H. (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structually resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature** **351**: 714-718.
- Bünning, P. and Riordan, J.F.(1985): Zinc in angiotensin converting enzyme. **J. Inorg. Biochem.** **24 (3)**: 193-197.
- Busconi, L. and Michel, T. (1993): Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **J. Biol. Chem.** **268**: 8410-8413.

- Bush, P.A.; Gonzalez, N.E.; Griscavage, J.M. and Ignarro, L.J. (1992): Nitric Oxide Synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. **Biochim. Biophys. Res. Comm.** **185**: 960-966.
- Caldwell, P.R.B., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M. and Soffer, R.L. (1976): Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. **Science** **191**: 1050-1051.
- Chen, B.Z. and Mendelsohn, F.A.O. (1992): Effect of acute and chronic administration of ceronapril on angiotensin converting enzyme in plasma, kidney, lung, brain regions and cerebrospinal fluid of rats. **Neuropharmacology** **31 (9)**: 929-935.
- Cohen, M.L. and Kurz K.D. (1981): Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rats after treatment with captopril or MK-421. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **220 (1)** : 63-69.
- Conroy, J.M. and Lai, C.Y. (1978): A rapid and sensitive fluorescence assay for angiotensin-converting enzyme. **Anal. Biochem.** **87**: 556-561.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. (1971): Spectrofotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochem. Pharmacol.** **20**: 1637-1648.
- Cushman, D.W.; Cheung, H.S.; Sabo, E.F. and Ondetti, M.A. (1977): Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry** **16**: 5484-5491.
- Dananberg, J.; Sider, R.S. and Grekin, R.J. (1993): Sustained hypertension induced by orally administred nitro L-arginine. **Hypertension** **21 (3)**: 359-363.
- Das, M. and Soffer, R.L. (1975): Pulmonary angiotensin-converting enzyme. Structural and catalytic properties. **J. Biol. Chem.** **250 (17)**: 6762-6768.

- Ehlers, M.R.W. and Kirsch, R.E. (1988): Catalysis of angiotensin I hydrolysis by human angiotensin-converting enzyme: effect of chloride and pH. **Biochemistry** **27**: 5538-5544.
- Ehlers, M.R.W. and Riordan, J.F. (1989): Angiotensin converting enzyme: New concepts concerning its biological role. **Biochemistry** **28**: nº 13, 5311-5318.
- Ehlers, M.R.W. and Riordan, J.F. (1991): Angiotensin converting enzyme: Zinc and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis enzymes. **Biochemistry** **30**: 7118-7126.
- Elsner, D.; Muntze, A.; Kromer, E.p. and Riegger, G.Aj. (1992): Inhibition of synthesis of endothelium-derived nitric oxide in conscious dogs. Hemodynamic, renal, and hormonal effects. **Am. J. Hypertens.** **5 (5 I)**: 288-291.
- Erdos, E.G. and Skidgel, R.A. (1986): The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensin I converting enzyme. **Hypertension** **8 (suppl)**: I-34.
- Evans, R.G.; Rankin, A.J. and Anderson, W.P. (1994): Interactions of blockade of nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme on renal function in conscious rabbits. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** **24**: 542-551.
- Ferreira, S.H. (1965): A bradykinin potentiating factor (BPF) in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol. Chemother** **24**: 163-169.
- Ferreira, S.H. (1967): The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular. **Br. J. Pharmacol. Chemother** **30**: 417-424.
- Förstermann, U.; Gorsky, L.D.; Pollock, J.S.; Schmidt, H.H.H.W.; Heller, M. and Murad, F. (1991) Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **168**: 727-732.

- Förstermann, U.; Pollock, J.S.; Schmidt, H.H.H.W.; Heller, M. and Murad, F. (1991): Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 1788-1792.
- Friedland, J. and Silverstein, E. (1976): A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **Am. J. Clin. Pathol.** **66**: 416-424.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** **288**: 373-6.
- Gaddum, J.H. (1953): The technique of perfusion. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** **8**: 321-326.
- Gardes, J.; Poux, J. M.; Alhenc-Gelas, F. and Menard, J. (1992): Decreased renin release and constant Kallikrein secretion after injection of L-NAME in isolated perfused rat kidney. **Life Sci.** **50 (14)**: 987-993.
- Gavras, H.; Brunner, H.R.; Laragh, J.R.; Vaughan, E.D.; Koss, M.; Cote, L.J. and Gavras, I. (1975): Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess. **Circ. Res.** **36**: 300-309.
- Geller, D.A.; Lowenstein, C.J.; Shapiro, R.A.; Nussler, A.K.; Di Silvio, M.; Wang, S.C.; Nakayama, D.K.; Simmons, R.L.; Snyder, S.H. and Billiar, T.R. (Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**: 3491-3495.
- Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F. and Summerville, W.W. (1934): Studies on experimental hypertension. The blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med.** **59**: 347-379.
- Gorsky, L.D.; Förstermann, U.; Ishii, K. and Murad, F. (1989): Production of an EDRF-like activity in the cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells. **FASEB J.** **4**: 1494-1500.

- Guan, S.; Fox, J.; Mitchell, K.D.; and Navar, L.G. (1992): Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertension rats. **Hypertension** **20**: 763-767.
- Helmer, O.M. (1957): Differentiation between two forms of Angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.** **188**: 571-577.
- Henry, Y.; Leproive, M.; Drapier, J.C.; Ducrocq, C.; Boucher, J.L. and Guissani, A. (1993): EPR characterization of molecular for NO in mammalian cells and organelles. **FASEB J.**, **7**: 1124-1134.
- Hibbs Jr., J.B.; Vavrin, Z. and Taintor, R.R. (1987): L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol.** **138**: 550-565.
- Hibbs, J.B.; J.R.; Taintor, R.R.; and Vavrin, Z. (1987): Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science** **235**: 473-476.
- Hooper, N.M. (1991): Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. **Int. J. Biochem.** **23 (7/8)**: 641-647.
- Hopper, N.M. (1991): Angiotensin converting enzyme: implication from molecular biology for its physiological functions. **Int. J. Biochem.** **23**: 641-647.
- Hopper, N.M.; Keen, J.; Pappin, D.J.C. and Turner, A.J. (1987): Pig kidney angiotensin converting enzyme: purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. **Biochem. J.** **247**: 85-93.
- Hurst, P.L. and Lovell-Smith, C.J. (1981): Optimized assay for serum angiotensin-converting enzyme activity. **Clin. Chem.** **27/12**: 2048-2052.

- Ignarro, L.; Byrns, R.; Buga, G. and Wood, K.(1987): Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. **Circ. Res.** **61**: 866-879.
- Janssens, S.P.; Shimiouchi, A.; Quertermous, T.; Bloch, D.B. and Bloch, K.D. (1992): Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** **267**: 6370-6374.
- Johnson, R.A. and Freeman, R.H. (1994): Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.** **266 (6)**: R 1723-R 1729.
- Johnston, C.I.; Burrell, L.M.; Perich, R.; Jandeleit, K. and Jackson, B. (1992): The tissue renin-angiotensin system and its functional role. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** **19**: suppl 19, 1-5.
- Jover, B.; Herizi, A.; Ventri, F.; Dupont, M. and Mimran, A. (1993): Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. **Hypertension** **21**: 944-948.
- Klatt, P.; Schmidt, K.; Uray, G. and Mayer, B.(1993): Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N^o-hydroxy-L- arginine as an intermediate. **J. Biol. Chem.** **268**: 14781-14787.
- Kosaka, H.; Uozumi, M. and Tyuma, I. (1989): The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-derived relaxing factor. **Free Rad. Biol. Med.** **7**: 653-658.
- Lamas, S.; Marsden, P.A.; Li, G.K.; Tempst, P. and Michel, T. (1992): Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 6348-6352.

- Lanzillo, J.J.; Stevens, J.; Dasarathy, Y.; Yotsumoto, H. and Fanburg, B.L. (1985): Angiotensin converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic, and immunological properties. **J. Biol. Chem.** **260 (28)**: 14938-14944.
- Lattion, A.L.; Soubrier, F.; Allegrini, J.; Hubert, C.; Corvol, P. and Alhenc-Gelas, F. (1989): The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicate form of the enzyme. **FEBS Lett.** **252 (1,2)**: 99-104.
- Lentz, K.E.; Skeggs, L.T. and Woods (1956): The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. **J. Exp. Med.** **104**: 183-191.
- Lieberman, J. (1974): A new confirmatory test for sarcoidosis. Serum angiotensin-converting enzyme: Effect of steroids and chronic lung disease. **Am. Rev. Res. Dis.** **109**: 743, Abstr.
- Lieberman, J. (1975): Elevation of serum angiotensin enzyme (ACE) level in sarcoidosis. **Am. J. Med.** **59**: 365-372.
- Lowenstein, C.J.; Glatt, S.; Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1992): Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 6711-6715.
- Lyons, C.R.; Orloff, G.J. and Cunningham, J.M. (1992): Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **J. Biol. Chem.** **267**: 6370-6374.
- Marletta, M.A.; Yoon, P.S.; Iyengar, R.; Leaf, C.D. and Wishnok, J.S. (1988): Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, **27**: 8706-8711.
- Meng, Q.C.; Balcells, E.; Della'Italia, L.; Durand, J. and Oparil, S. (1995): Sensitive method for quantitation of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in tissue. **Biochem. Pharmacol.** **20**: 1445-1450.

- Nafrialdi, N.; Jover, B. and Mimran, A. (1994): Endogenous Vasoactive systems and pressor effect of acute N^ω-nitro-L-arginine methyl ester administration. **J. Cardiovasc. Pharmac.** **23**: 765-771.
- Nafrialdi, N.; Jover, B. and Mimran, A. (1993): Renin-angiotensin system in the pressor effect of acute N-omega-nitro-L-arginine methyl ester. **J. Hypertens.** **11** (suppl 5): S324-325.
- Navarro, J.; Sanchez, A.; Sáiz, J.; Ruilope, L.M.; García-Estañ, J.; Romero, J.C.; Moncada, S. and Lahera, V. (1994): Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. **Am. J. Physiol.**(36): R1516- R1521.
- Ng, K.K.F. and Vane, J.R. (1967) : Conversion of angiotensin I to angiotensin II. **Nature** **216**: 762-766.
- Ng, K.K.F. and Vane, J.R. (1968): Fate of angiotensin I in circulation **Nature** **218**: 144-150.
- Okamoto, K. and Aoki, K. (1963): Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.** **27**: 282-293.
- Ondetti, M.A. and Cushman, D.W. (1982): Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Annu. Rev. Biochem.** **51**: 283-308.
- Ondetti, M.A.(1988): Structural relationships of angiotensin-converting enzyme inhibitors to pharmacologic activity. **Circulation, part II**, **77/6**: 174-178.
- Page, I.H. and Helmer, O.M.; (1940): Angiotonin-activator, renin and angiotonin-inhibitor and the mechanism of angiotonin tachyphylaxis in normal, hypertensive and nephrectomized animals. **J. Exp. Med.** **71**: 485-519.
- Palmer, R.; Ferridge, A. and Moncada, S.(1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** **327**: 524-526.

- Palmer, R.M.J.; Rees, D.D.; Ashton, D.S.; and Moncada, S. (1988): L-arginine is the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **153**: 1251-1256.
- Patchett, A.A.; et al (1980): A new class of angiotensin-converting enzyme Inhibitors. **Nature** **288**: 280-283.
- Peach, M.J. (1977): Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol. Rev.** **57 (2)**: 313-316.
- Pedrazza-Chaverri, J.; Maciel, A.H.; Cruz, C. and Peña, J.C. (1992): Captopril magnifies the increase in angiotensin I-converting enzyme activity in rats with aminonucleoside nephrosis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** **19**: 439-445.
- Persson, A. and Wilson, I.B. (1977): A fluorogenic substrate for angiotensin-converting enzyme. **An. Biochem.** **83**: 296-303.
- Peterson, G.L. (1977) : A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. **An. Biochem.** **83**: 346-356.
- Pollock, D.M.; Polakowski, J.S.; Divish, B.J. and Opgenorth, T.J. (1993): Angiotensin blockade reverses Hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension** **21**: 660-666.
- Pollock, J.S.; Forstermann, U.; Mitchell, J.A.; Warner, T.D., Schmidt, H.H.H.W.; Nakane, M. and Murad, F. (1991): Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Biochemistry** **88**: 10480-10488.
- Powell, J.; Clozel, J.P.; Müller, R.; Kuhn, H.; Hefti, F.; Hosang, M. and Baumgartner, H.R. (1989): Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. **Science** **245**: 186-188.
- Rees, D.D.; Palmer, R.M.; Schulz, R.; Rodson, H.F. and Moncada, S. (1990): Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** **101**: 746-752.

- Rees, D.D.; Schulz, R.; Hodson, H.F.; Palmer, R.M.J.; and Moncada, S. (1990): 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, p.485-487, Elsevier, Amsterdam.
- Rengasamy, A. and Johns, R.A. (1993): Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. **Mol. Pharmacol.** **44**: 124-128.
- Ribeiro, M.O.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lorisolo, S.M. and Zatz, R. (1992): Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension** **20**: 298-303.
- Roth, M.; Weitzmann, A.F. and Piquilloud, Y. (1969): Converting enzyme content of different tissues of the rat. **Experientia** **25**: 1247.
- Rubinstein, I.; Houssee, M.; Davis, R.G. and Veshwanatha, J.K. (1992): Tissue angiotensin I converting enzyme activity in spontaneously hypertensive hamsters. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **183 (3)**: 1117-1123.
- Ryan, J.W.; Ryan, U.S.; Schultz, D.R.; Whitaker, C.; Chung, A. and Dorer, F.E.(1975): Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (Kininase II). **Biochem. J.** **146**: 497-499.
- Sessa, W.C.; Harrison, J.K.; Barber, C.M.; Zeng, D.; Durieux, M.E.; D'Angelo, D.D.; Lynch, K.R. and Peach, M.J. (1992): Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** **267**: 15274-15276.
- Shioya, H.; Shimoio, M. and Kawahara, Y. (1991): Determination in plasma of angiotensin converting enzyme inhibitor by inhibitor assay. **J. Chrom.** **568**: 309-314.
- Sigmon, D.H. and Beierwaltes, W.H. (1993): Angiotensin II: nitric oxide interaction and distribution of blood flow. **Am. J. Physiol.** **(34)**: R1276 - R 1283.

- Sigmon, D.H. and Beierwaltes, W.H. (1993): Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. **Hypertension** **22**: 237-242.
- Simmons, J.C. and Freeman, R.H. (1995): L-arginine analogues inhibit aldosterone secretion in rats. **Am. J. Physiol.** (37): R1137 - R1142.
- Skeggs, L.T.; Marsh, W.H.; Kahn, J.R. and Shumway, N.P. (1954): The purification of hypertensin I. **J. Exp. Med.** **100**: 363-370.
- Skeggs, L.T.; Marsh, W.H.; Khan, J.R. and Shumway, N.P. (1956): Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J. Exp. Med.** **103**: 295-299.
- Smith, E.L.; Hill, L.R.; Lehman, I.R.; Lefkowitz, R.J.; Handler, P. and White, A. (1985): **Principles of Biochemistry - Mammalian**. Ed. Guanabara Koogan S.A., 7a ed., RJ, pag 140-149.
- Soffer, R.L. (1976): Angiotensin converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. **Ann. Rev. Biochem.** **45**: 73-94.
- Stuher, D.J. and Marletta, M.A. (1985): Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**: 7738-7742.
- Stuher, D.J.; Kwon, N.S.; Nathan, C.F.; Griffith, O.W.; Feldman, P.L. and Wiseman, J. (1980) N^ω-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J. Biol. Chem.** **266**: 6259-6263.
- Suzuki, S.; Hachimori, Y. and Yaoeda, U. (1970): Spectrophotometric determination of glycine with 2,4,6-Trichloro-s-Triazine. **An. Chem.** **42 (1)**: 101-103.
- Treshman, J.J.; Dusting, G.J.; Coghlan, J.P. and Whitworth, J.A. (1991): Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, in sheep. **Clin. Exp. Pharmacol.** **18 (5)**: 327-330.

- Unger, T.; Mattfeldt, T.; Lawberty, V.; Bock, P.; Mall, W.; Scholkens, B.A. and Gohlke, P. (1992): Effect of early onset angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. **Hypertension** **20**: 478-482.
- Vane, J.R. (1974): The fate of angiotensin I. In Angiotensin ed. I.H. Page and F.M. Bumpus, Springer-Verlag, 81.
- White, L.A. and Marletta, M.A. (1992): Nitric oxide synthase is a cytochrome P450 type hemoprotein. **Biochemistry** **31**: 6627-6631.
- Xie, Q.W.; Cho, H.J.; Swiderek, K.M.; Lee, T.D.; Ding, A.; Troso, T. and Nathan, C. (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophage. **Science** **256**: 225-228.
- Zatz, R. (1990): A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab. Anim. Sci.** **40 (2)**:198-201.

APÊNDICE



MANUSCRITOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

Faria, M.S.; Muscará, M.N.; Moreno, Jr.H.; Teixeira, S.A.; Dias, H.B.; de Oliveira, B.; Graeff, F.G. and de Nucci, G. (1996). Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. *Submetido ao European Journal of Pharmacology*.

Zappellini, A.; Teixeira, A.T.; Muscará, M.N.; Antunes, E. and de Nucci, G. (1996). The renin-angiotensin system does not modulate the haemodynamic changes induced by acute inhibition of nitric oxide synthesis in anaesthetised dogs. *Submetido ao European Journal of Pharmacology*.

2 July 1996

The Editorial Office of
The European Journal of Pharmacology,
Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht,
The Netherlands

Dear Sir / Madam

Please find enclosed four copies of the manuscript entitled "Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test", by Faria et al. A 3½" diskette containing the file **maze.doc** (compatible with Word for Windows, version 6.0) is also being sent.

We would like to submit this manuscript for publication in the *European Journal of Pharmacology*.

I would appreciate if you could acknowledge the receipt of the manuscript by fax, if possible.

I hope you find the manuscript suitable for publication.

I look forward to hearing from you in due course.

Yours sincerely

Moacir S. Faria,
Department of Pharmacology,
Faculty of Medical Sciences, UNICAMP,
P.O. Box 6111, 13081-970, Campinas, SP,
Brazil.
fax 55-19-2340065

ACUTE INHIBITION OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS INDUCES ANXIOLYSIS IN THE PLUS-MAZE TEST

**Moacir S. Faria^{1,2}, Marcelo N. Muscará¹, Heitor Moreno Jr¹,
Simone A. Teixeira³, Heidi B. Dias¹, Benedito de Oliveira³,
Frederico G. Graeff⁴ and Gilberto de Nucci¹**

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP; ²Department of Pharmaceutical Sciences, CCBPS, UNIMEP, Piracicaba, SP, ³Department of Biochemistry, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP; ⁴Laboratory of Psychopharmacology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Author for correspondence:

Moacir S. Faria,
Department of Pharmacology,
Faculty of Medical Sciences, UNICAMP,
P.O. Box 6111, 13081-970, Campinas, SP,
Brazil

ABSTRACT

The involvement of nitric oxide (NO) in anxiety-related behaviour was investigated in rats, using the elevated plus-maze (EPM) test. Acute, but not chronic, systemic treatment with N^o-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 and 60 mg.kg⁻¹), an inhibitor of NO synthase, increased the time spent by the rats in the open arms. Both the acute and chronic treatments with L-NAME inhibited NO synthase in endothelial cells and in the central nervous system, as shown by the increase in mean arterial pressure and decreased NO synthase activity in brain tissue. Chronic treatment with L-NAME also decreased the serum nitrate levels. The anxiolysis induced by acute L-NAME treatment is unlikely to be due to hypertension, since two kidney-one clip hypertension in non-L-NAME-treated rats failed to significantly change exploratory behaviour in the EPM. These results indicate that acute inhibition of NO-synthesis may change the level of fear in rats.

KEYWORDS: *nitric oxide, anxiety, elevated plus maze, L-NAME, arterial blood pressure, brain NO synthase.*

1. INTRODUCTION

The L-arginine / nitric oxide (NO) pathway has been implicated in the control of a variety of physiological functions (for review see Moncada et al, 1991). In the central nervous system (CNS), the participation of NO as a neurotransmitter or neuromodulator was originally proposed by Garthwaite (1988) and later confirmed by Snyder and Bredt (1991). NO has been implicated in memory formation (Schuman and Madison, 1991), nociception (Moore et al, 1991; Handy et al, 1995), as well as sexual (Nelson et al, 1995; Benelli et al, 1995), aggressive (Nelson et al, 1995) and feeding behaviour (Morley and Flood, 1991).

The neuronal isoform of the enzyme NO synthase (NOS) has already been characterised and cloned (Snyder and Bredt, 1991). Constitutive brain NOS activity depends on the presence of calcium and NADPH, and hence agonists acting at the NMDA subtype receptors for excitatory aminoacids activate the enzyme by promoting a raise in cytosolic calcium (Mayer and Miller, 1990; Vincent, 1994).

In the brain, NOS has been localised in regions involved in anxiety-related behaviour, such as the hypothalamus, amygdala and hippocampus (Vincent, 1994). Thus, it is possible that the L-arginine / nitric oxide pathway may participate in fear-induced behavioural changes.

Using the elevated plus maze (EPM) test, a widely used animal model of anxiety (Pellow et al, 1985; Lister, 1987), Quock and Nguyen (1992)

reported that acute L-NAME administration counteracts chlordiazepoxide-induced anxiolysis, suggesting an anxiolytic action for NO.

In contrast, other reported results point to an anxiogenic action of NO in the CNS. Thus, Volke et al (1995) have shown that L-NAME has an anxiolytic effect in the EPM and Guimarães et al. (1994) reported that microinjection of L-NAME into the dorsal central grey (DCG) induces anxiolysis in the same test.

These contradictory results indicate that the participation of the L-arginine / nitric oxide pathway in fear / anxiety deserves further investigation. The aim of the present study was to evaluate the effect of acute and chronic NO synthesis inhibition by systemic administration of L-NAME on anxiety measured with the EPM test in the rat. For comparison, the inactive enantiomer D-NAME was also administered. Once that inhibition of NO synthesis induces hypertension (Ribeiro et al, 1992), we have also evaluated if another hypertensive status, not related with the inhibition of NO synthesis (two kidney-one clip rats), could change *per se*, the level of anxiety in rats submitted to EPM test.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing approximately 250g were used in all experiments. They were housed either in individual cages (for chronic treatment) or in groups of six (for acute treatment). Prior to the experiments, the animals underwent a period of adaptation for three days with free access to food and water, under a light / dark cycle of 12 h (lights on 06:00 AM).

2.2. Drugs

N^ω- Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^ω- nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), L-arginine (L-ARG) and D-arginine (D-ARG) were obtained from Sigma Chem. Co. (USA). Diazepam (DZP) was obtained from Sanofi-Winthrop (Brazil).

In the acute experiments, the drugs were dissolved in saline solution (0.9% w/v). Diazepam was dissolved in saline containing 1% Triton X-100. In the chronic experiments, the drugs were dissolved in tap water.

2.3. Treatments

For acute treatment, either L-NAME, D-NAME, L-ARG or D-ARG were administered i.p. at doses of either 10 or 60 mg.kg⁻¹. The control group received the same volume of saline solution. For chronic treatment, the same drugs were dissolved in the drinking water (100 or 400 µg.ml⁻¹) which was given *ad libitum* for seven days. Based on the individual daily liquid intake,

these concentrations resulted in a dose of approximately 15 and 60 mg.kg⁻¹ per day, respectively. Control animals received tap water *ad libitum*. DZP was given i.p. (1mg.kg⁻¹) daily for seven days. Thirty minutes after the acute treatment and at the end of chronic treatment, each group of animals was randomly subdivided into two groups. The first underwent the EPM test while the second had their mean arterial pressure measured.

2.4. *Elevated plus-maze*

The plus-maze used was built of wood according to the specifications reported by Pellow et al (1985) and consisted of two open arms (50 x 10 cm) surrounded only by a short (1 cm) edge to avoid falls and two enclosed arms (50 x 10 x 40 cm) arranged in such a way as to form a cross. The arms extended from a central platform (10 x 10 cm) and were raised 50 cm above the floor.

Each rat was placed at the center of the maze facing an enclosed arm and was allowed to explore the maze for five minutes. The number of entries into the open and closed arms, as well as the time spent in the open arms were recorded. Any animal which fell off the maze was excluded from the experiment.

2.5. *Blood pressure*

The mean arterial pressure (MAP) values were measured by a tail-cuff method, according to Zatz (1990). In order to minimize the effects of initial

stress due to animal handling, measurements were considered valid only when three consecutive readings did not differ by more than 2 mmHg.

2.6. Brain NOS activity

The effects of acute and chronic L-NAME treatment on encephalic NOS activity *ex vivo* were studied. The assay measures the ability of a whole brain homogenate to convert [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline (Pollock et al., 1991). A group of rats was submitted to acute treatment with L-NAME (0.6, 10 and 60 mg.kg $^{-1}$) while another group received chronically the same drug (4, 100 and 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of drinking water), as described above. Thirty minutes after the acute treatment and at the end of chronic treatment, the animals were anesthetized with ethyl ether and brain samples were rapidly removed. The samples were homogenized in five volumes of cold incubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) containing 1 mM PMSF and 1 mM L-citrulline.

The homogenates were incubated for 30 min in the presence of 1 mM NADPH, 2 mM CaCl_2 and 10 μM L-arginine containing 100,000 dpm of [2,3,4,5- ^3H] L-arginine monohydrochloride (Amersham, UK) at room temperature (25 - 27 $^{\circ}\text{C}$).

Pharmacological controls of the enzymatic activity were carried out in parallel and consisted of either the omission of CaCl_2 and addition of 1 mM of either EGTA or 1 mM L-NAME to the incubation medium. Under these conditions, the conversion of L-arginine to L-citrulline was inhibited more than

90%, thus confirming that the conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline by the brain homogenates was due to calcium-dependent NOS.

The protein content of the samples was determined according to the method of Peterson (1977) and the activities of brain NOS were expressed as pmol L-citrulline produced/min/mg of protein.

2.7. Serum nitrite and nitrate

A group of rats was submitted to chronic treatment with L-NAME (4, 100 and 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of drinking water) as described above. After 7 day treatment, the animals were anesthetized with ethyl ether and blood samples from the abdominal aorta were obtained. After clotting at room temperature, the samples were centrifuged (10 min at 2,000 g) and the serum were separated and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyzed for nitrite and nitrate content by high-performance liquid chromatography (Muscará and de Nucci, 1996).

In order to avoid the ingestion of exogenous nitrate, the animals were deprived of food for 24 h before blood sampling. During this period, the drugs were dissolved in distilled water. The control group received distilled water only (instead of tap water).

2.8. Two kidney-one clip (2K1C) hypertension

In order to investigate whether the hypertensive status *per se* (independent of NO synthesis inhibition) could lead to any significant change

in the behaviour of rats in the EPM test, a group of rats was made hypertensive by partial occlusion of the left renal artery (Arnal et al., 1993).

The rats were anaesthetised with ether and the left renal artery was occluded with a clip to achieve a luminal diameter of 0.2 mm, while the right kidney was not disturbed (2K1C group). The control group (sham operated) underwent an incision in the flank without artery clipping. Seven days after the surgery, animals were submitted to the EPM test and had their MAP measured as described above.

2.9. Statistical analysis

The data were analysed using one-way ANOVA followed by Duncan's test for multiple comparisons where necessary. The number of entries into the closed arms was evaluated by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons. The data relative to 2K-1C rats were analysed by Student's *t* test. Values of probability less than 5% ($P < 0.05$) were considered significant.

3. RESULTS

Acute treatment with L-NAME (10 and 60 mg.kg⁻¹) induced an elevation in MAP (141.6 ± 6.9 mmHg, $n = 6$ and 141.3 ± 5.9 mmHg, $n = 6$ respectively) relative to the control group (121 ± 2.7 mmHg, $n = 6$; $p < 0.05$, ANOVA followed by Duncan's test). Chronic treatment with L-NAME (15 and 60 mg.kg⁻¹) also induced hypertension (152.8 ± 6.3 mmHg, $n = 5$ and $149 \pm$

2.9 mmHg, $n = 14$ respectively) relative to the control group (120.8 ± 2.0 mmHg, $n = 10$; $p < 0.05$, ANOVA followed by Duncan's test). Neither acute nor chronic treatment with D-NAME, D-ARG or L-ARG changed the MAP of the rats.

Both acute and chronic treatment with L-NAME significantly inhibited brain NOS activity when compared to the respective control groups (Fig.1).

Chronic treatment with L-NAME (15 and 60 mg.kg⁻¹) significantly reduced serum nitrate levels (6.9 ± 0.7 μ M, $p < 0.05$ and 5.7 ± 0.9 μ M, $p < 0.001$ respectively, ANOVA followed by Duncan's test) relative to either the control group (11.3 ± 1.1 μ M) or the group treated chronically with L-NAME (0.6 mg.kg⁻¹, 12.1 ± 1.2 μ M). The nitrite concentrations remained unchanged in all the groups and were below 1 μ M.

In the EPM test, rats treated either acutely or chronically with DZP spent a longer time (Fig. 2) and had a greater percentage of entries (Fig. 3) onto the open arms when compared with their respective control groups. In rats treated acutely with L-NAME, the time spent on (Fig. 2a) but not the percentage of entries onto (Fig.3a) the open arms was significantly higher than in the control group.

The number of entries into the enclosed arms was not affected by acute treatment with L-NAME (Fig.4a). Chronic treatment with L-NAME failed to change the behaviour of rats in the open (Fig. 2b and Fig.3b) and enclosed (Fig.4b) arms.

Rats receiving D-NAME, D-ARG or L-ARG either acutely or chronically did not differ from control with regard to the number of entries onto and the time spent on the open arms, as well as to the number of entries into the enclosed arms (Figs. 2, 3 and 4).

Partial occlusion of the left renal artery (2K1C group) elevated the MAP relative to the Sham-operated group but failed to change the behaviour of rats in the EPM test in either the open or enclosed arms (Table 1).

4. DISCUSSION

In the elevated plus-maze test, untreated rats usually spend more time and enter more frequently into the enclosed arms than on the open arms (Pellow et al., 1985). This is due to the natural aversion rodents have for open spaces and the elevation (Lister, 1987; 1990; Pellow et al, 1985; Treit et al, 1992). As a result, the number (or percentage) of open arm entries and the time spent on open arms has been considered a reliable index of anxiety in rats (Pellow et al., 1985; File, 1992; Cruz et al., 1994) or mice (Lister, 1987). In turn, the number of entries into the closed arms has been considered a reliable index of the animal's motor activity (File, 1992; Cruz et al., 1994).

The present results show that both acute and chronic DZP treatment increased the time spent on open arms and the percentage of open arm entries (Fig. 2 and 3, respectively) without changing the number of entries into the closed arms (Fig. 4). Therefore the EPM test as presently used is sensitive to anxiolytic drugs. Since acute treatment with L-NAME similarly increased the time spent on the open arms of the EPM (Fig. 2a) without changing the number of entries into the enclosed arms (Fig. 4a) this may be interpreted as an anxiolytic effect. Such effect is unlikely to be due to a non-specific action of L-NAME because acute treatment with either L-ARG or D-ARG did not change the time spent in the open arm (Fig. 2a). Acute treatment with D-NAME also failed to change the behavior of the rats in the EPM. Since D-NAME is unable to inhibit NOS activity, the anxiolytic effect of L-NAME is likely to be mediated by NO.

This view is supported by the present results showing that brain NOS activity in rats was decreased in rats treated acutely with L-NAME, but not with D-NAME (Figure 1a). The NOS activity was also reduced when either calcium was lacking or when L-NAME was added to the incubation mixture of the control group, thus confirming that the conversion of [3 H]L-arginine to [3 H]L-citrulline was due to calcium-dependent constitutive NOS in the whole brain homogenates (Fig. 1).

Overall, the above results indicate that acute inhibition of constitutive NOS has an anxiolytic effect in rats submitted to EPM. Accordingly, Guimarães et al. (1994) recently reported that microinjection of L-NAME into the dorsal central grey of rats had an anxiolytic effect in the EPM. In contrast, however, acute inhibition of NO synthesis in the mouse has been reported to counteract the anxiolysis induced by chlordiazepoxide in the EPM test, thus suggesting an anxiolytic action for NO (Quock and Nguyen, 1993). Except for species difference, the reasons for this discrepancy are not clear.

Nitrate and nitrite anions are the NO break-down products (Vincent, 1994). The reduced serum nitrate levels presently observed in animals chronically treated with L-NAME indicate the effectiveness of this treatment in producing a widespread inhibition of NO synthesis. However, the anxiolysis induced by acute treatment with L-NAME was not observed after chronic treatment, even though the animals showed a reduced brain NOS activity (Fig. 1b) and a reduction in serum NO_3^- and NO_2^- levels. Therefore, tolerance

to the anxiolytic effect of NO synthesis inhibition seems to develop. Additional studies should be performed in order to investigate this hypothesis.

In our laboratory, chronic NO synthesis inhibition by L-NAME administration in the drinking water has been established as an animal model of hypertension (Ribeiro et al, 1991). The present data show that both acute and chronic treatment with L-NAME increased MAP.

Nevertheless, anxiolysis induced by acute L-NAME does not seem to be due to MAP elevation, since chronic L-NAME administration similarly raised MAP values, but failed to change the behaviour of the animals in the open arms (Fig.2 and 3). In addition, 2K1C hypertension failed to change the behavior of rats in the EPM test (Table 1). There is evidence that high blood pressure can be induced by genetic predisposition associated to environment factors such as salt intake, physical inactivity and psychological stress (Williams et al, 1990). However, the reverse may not be true since renovascular hypertensive rats presently displayed the same level of anxiety in the EPM than the sham operated group. Accordingly, Rosa et al. (1994) reported that hypertension *per se* does not affect the level of fear in spontaneously hypertensive rats (SHR) submitted to the EPM test.

The presence of constitutive NOS has been described in the AM (Vincent, 1994) and in the dorsal CG (Onstott et al, 1993). These areas belong to the so-called brain aversive system which commands defensive behaviour and elaborates aversive emotional and motivational states and has been proposed as a main neural substrate of fear and anxiety. (Graeff, 1990;

Graeff et al, 1993). Indeed, Guimarães et al (1994) have shown an anxiolytic effect of L-NAME in rats when microinjected into the dorsal CG. Since in the present study the same drug was administered systemically, we can not assert what brain structures are involved in the anxiolysis observed following acute L-NAME treatment.

There are increasing evidences that show NO as being a neuromodulator / neurotransmitter which plays an important role on the level of anxiety in rodents. Whether the pharmacological manipulation of NO synthesis in the CNS by using specific brain NOS inhibitors could be a useful therapeutic approach for anxiety handling remains to be established.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Stephen Hyslop for the revision of the manuscript.

REFERENCES

- Arnal, J.F.; El Amrani, A.I.; Chatellier, G.; Ménard, J. and Michel, J.B.,1993, Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 3, 380.
- Benelli,A.; Bertolini,A.; Poggioli,R.; Cavazzuti,E.; Calzà,L.; Giardino,L. and Arletti,R., 1995, Nitric oxide is involved in male sexual behavior of rats. 294,505.
- Cruz, A.P.M.; Frei, F. and GRAEFF, F.G.,1994, Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49,171.
- File, S.E.,1992, Behavioural detection of anxiolytic action. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression.* eds J.M. Elliot; D.J. Heal, and C.A. Marsden (Elsevier, Amsterdam) p. 25.
- Garthwaite, J.; Charles, S.L.; Chess-Williams, R.,1988, Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385.
- Graeff, F.G.,1990, Brain defence systems and anxiety. In: *Handbook of anxiety, The neurobiology of anxiety*, eds. G.D. Burrows; M. Routh and R. Noyes, (Elsevier, Amsterdam), p. 307.
- Graeff, F.G.; Silveira, M.C.L.; Nogueira, R.L.; Audi, E.A. and Oliveira, R.M.W., 1993, Role of the amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. *Behav Brain Res* 58, 123.

- Guimarães, F.S.; de Aguiar, J.C.; Del-Bel, E.A. and Ballejo, G., 1994, Anxiolytic effect of NOS inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 5, 1929.
- Handy, R.L.C.; Wallace, P.; Gaffen, Z.A.; Whitehead, K.J. and Moore, P.K., 1995, The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase *in vitro*, in the mouse. *Br J Pharmacol* 116, 2349.
- Lister, R.G., 1987, The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180.
- Lister, R.G., 1990, Ethological-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46, 321.
- Mayer, M.L. and Miller, R.J., 1990, Excitatory amino acid receptor, second messengers and regulation of intracellular Ca^{+2} in mammalian neurons. *Trends Pharmacol Sci* 11, 254.
- Moncada, S.; Palmer, R.M. and Higgs, E.A., 1991, Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109.
- Moore, P.K.; Oluyomi, A.O.; Babbedge, R.C.; Wallace, P. and Hart, S.L., 1991, L-nitro-arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102, 198.
- Morley, J.E. and Flood, J.F., 1991, Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 49, 707.
- Muscará, M.N. and de Nucci, G., 1996, Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-

- performance liquid chromatography with post column reactions. J Chromatogr B: Biomed Appl, in press.
- Nelson, R.J.; Demas, G.E.; Huang, P.L.; Fishman, M.C.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. and Snyder, S.H., 1995, Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378, 383.
- Onstott, D; Mayer, B. and Beitz, A., 1993, Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorso-lateral column within the midbrain periaqueductal grey of the rat: Analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res* 610, 317.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E. and Briley, M., 1985, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14, 149.
- Peterson, G.L., 1977, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analyt Biochem* 83, 346.
- Pollock, J.S.; Förstemann, U.; Mitchell, J.A.; Warner, T.D.; Schmidt, H.H.H.W.; Nakane, M. and Murad, F., 1991, Purification and characterisation of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10480.
- Quock, R.M. and Nguyen, E., 1992, Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci* 51, PL255.

- Ribeiro, M.O.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lovisolo, S.M. and Zatz, R., 1992, Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20, 298.
- Rosa, W.C.M.; Oliveira, G.M. and Nakamura-Palacios, E.M., 1994, Effects of the antihypertensive drugs α -methyldopa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 27, 55.
- Schuman, E.M. and Madison, D.V., 1991, A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254, 1503.
- Snyder, S.H. and Bredt, D.S., 1991, Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12, 125.
- Treit, D.; Menard, J. and Royan, C., 1993, Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44, 463.
- Vincent, S.R., 1994, Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 42, 129.
- Volke, V.; Koks, S.; Vasar, E.; Bourin, M.; Bradwejn, J. and Mannisto, P.T., 1995, Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. *Neuroreport* 6: 10.
- Williams, R.R.; Hunt, S.C.; Hasstedt, S.J.; Hopkins, P.N.; Wu, L.L.; Berry, T.D.; Sutlits, B.M.; Barlow, G.K.; Schumaker, M.C.; Lifton, R.P. and Lalouel, J.M., 1991, Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure? *Hypertension* 18, 129.

Zatz, R., 1990, A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. Lab Animal Sci 40, 198.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Encephalic NOS activity in rats treated either acutely (panel a) or chronically (panel b) with L-NAME (as mean $\pm$ S.E.M.). * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ relative to the control group.

Figure 2. The time spent in the open arms by rats treated acutely (panel a) or chronically (panel b) with L-NAME, D-NAME, L-ARG, D-ARG or DZP. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of the number of animals given in parentheses. * = $p < 0.05$ relative to the control group.

Figure 3. Percentage of entries into the open arms by rats treated acutely (panel a) or chronically (panel b) with L-NAME, D-NAME, L-ARG, D-ARG or DZP. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of the number of animals given in parentheses. * = $p < 0.05$ relative to the control group.

Figure 4. Number of entries into the closed arms by rats treated either acutely (panel a) or chronically (panel b) with L-NAME, D-NAME, L-ARG, D-ARG or DZP and submitted to EPM test. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of the animals given in parentheses. No significant differences were observed among the groups.

Table 1. Effect of 2K1C hypertension on the mean arterial pressure and the behavior of rats submitted to elevated plus-maze test. All values were compared with the sham-operated group. Each score represents the mean + S.E.M. of the number of animals given in parentheses. * = $p < 0.05$ relative to the sham-operated group.

Figure 1

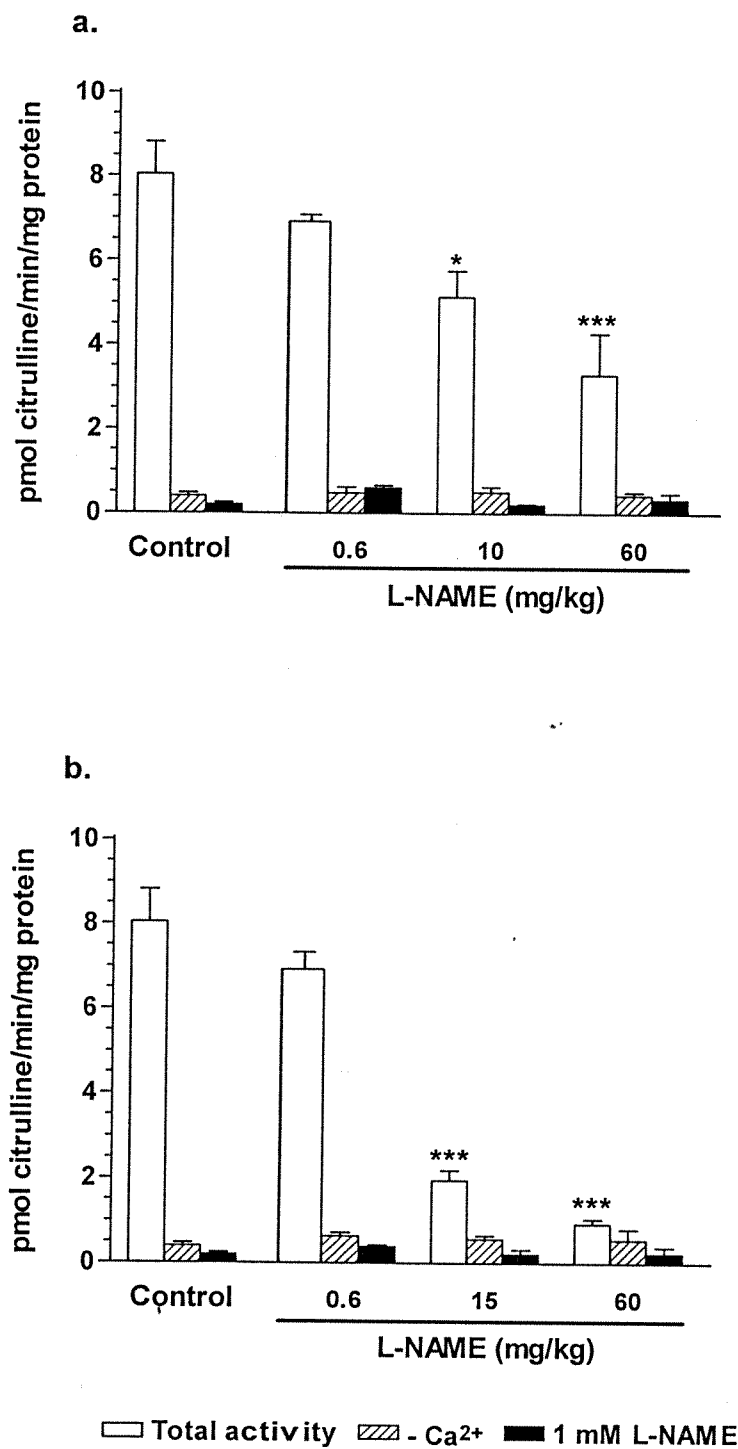


Figure 2

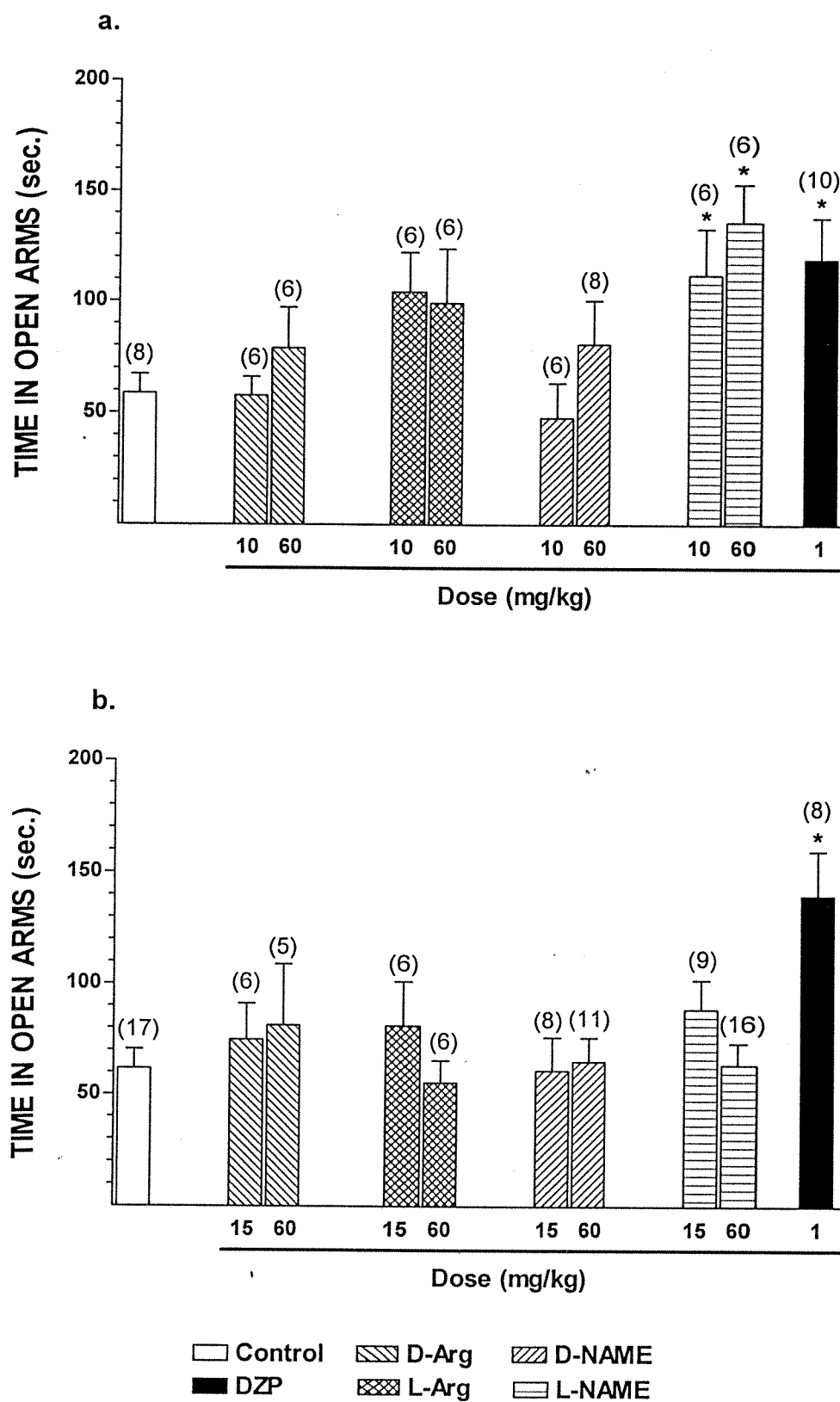


Figure 3

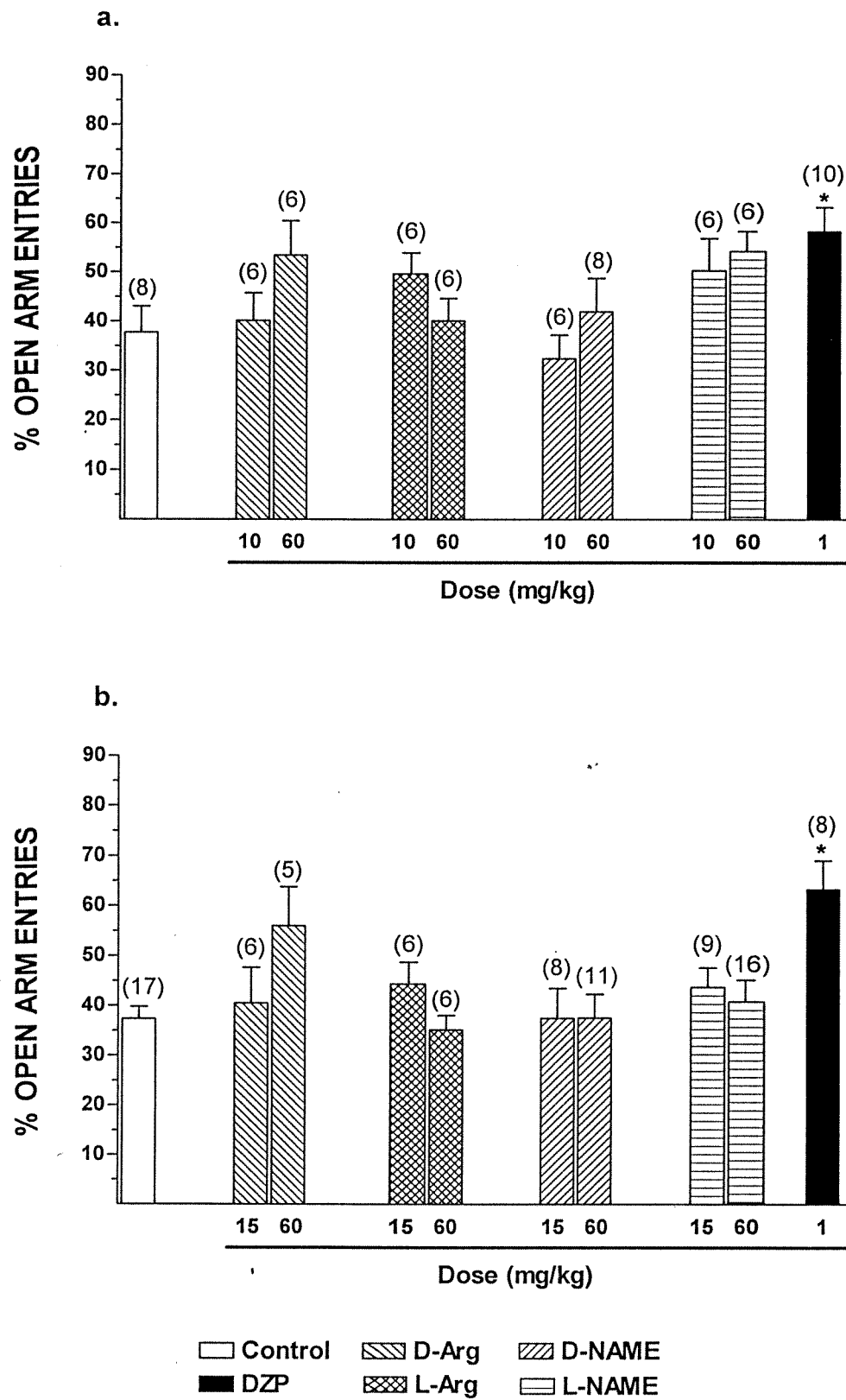


Figure 4

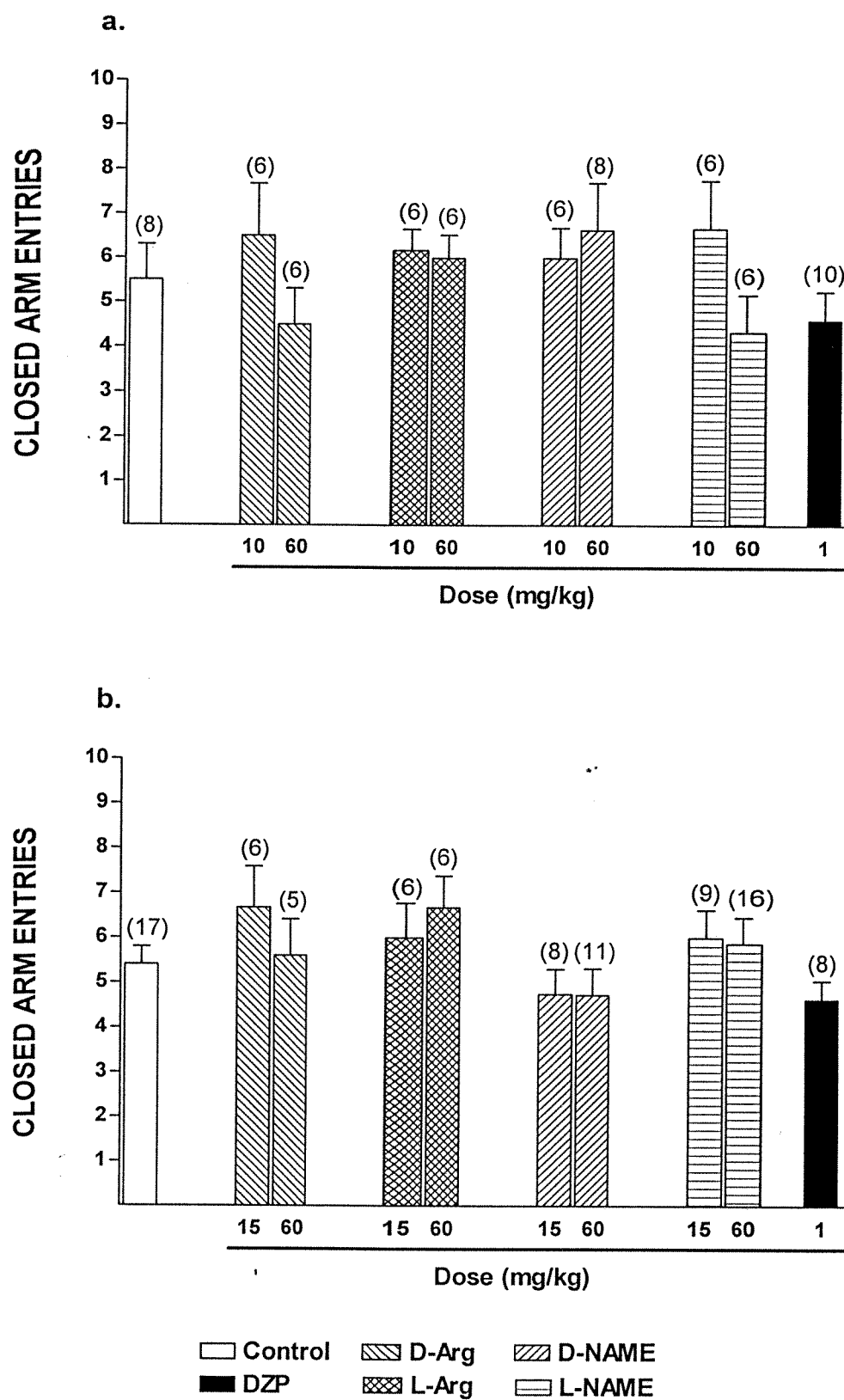


Table 1

Group	Time spent open arms (sec)	% Entries open arms	Closed arms entries	MAP (mmHg)
SHAM (7)	32.9 $\pm$ 9.1	29.7 $\pm$ 6.1	4.3 $\pm$ 0.5	126.6 $\pm$ 3.2
2K-1C (7)	38.6 $\pm$ 9.6	31.7 $\pm$ 6.9	4.9 $\pm$ 0.6	160.9 $\pm$ 7.8*

Re: MS no. E8023 Received: 06/06/96

Dr. A. Zappellini
Dept. Pharmacol.
Fact. Med. Sci.
UNICAMP
P.O. Box 6111
13081-970 CAMPINAS SP
Brazil

Title:

The renin-angiotensin system does not modulate the haemodynamic changes induced by acute inhibition of nitric oxide synthesis in anaesthetised dogs

Authors:

Zappellini, A., S.A. Teixeira, M.N. Muscara, E. Antunes, G. De Nucci

Dear Colleague,

We acknowledge the receipt of your manuscript with the above title; it is now under review.

The decision of the editors will be sent to you as soon as possible.

Please note that, in order to reduce the mailing costs, the manuscript will not be returned to you. Reviewers are asked to destroy their copy after the final decision has been reached.

Yours sincerely,

The editors

N.B. Please mention the manuscript number in all your correspondence!

**The renin-angiotensin system does not modulate the
haemodynamic changes induced by acute inhibition of
nitric oxide synthesis in anaesthetised dogs**

**Aldete Zappellini*, Simone A. Teixeira, Marcelo N. Muscará,
Edson Antunes and Gilberto de Nucci**

***Corresponding author
Aldete Zappellini, PhD
Department of Pharmacology
Faculty of Medical Sciences
P.O. Box 6111
UNICAMP
13081-970, Campinas, SP
Brazil
Fax: 55 192 521516**

Abstract

The role of the renin-angiotensin system in the haemodynamic changes induced by acute administration of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in anaesthetised and artificially ventilated dogs was investigated. Following the induction of anaesthesia, the left femoral artery and vein were cannulated for blood pressure measurement and drug administration, respectively. A 7F- Swan Ganz thermodilution catheter was introduced through the right femoral vein and advanced to the pulmonary artery. Pulmonary arterial pressure, right atrial pressure and cardiac output were also determined. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (0.01-10.0 mg/kg) was administered alone (control animals, n=18) or in the presence of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, captopril (2 mg/kg, n=9) or enalapril (2 mg/kg, n=7) or of the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (0.1 mg/kg, n=6). Cerebellum nitric oxide synthase and serum angiotensin-converting enzyme activities were also measured. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester induced dose-dependent increases in the mean arterial blood pressure and systemic vascular resistance. These increases were accompanied by bradycardia and a decrease in cardiac output. Cerebellum nitric oxide synthase activity was inhibited 58% by N^ω-nitro-L-arginine methyl ester when compared to animals in which no

drug, other than anaesthetic, was administered (from 3.37 ± 0.30 to 1.40 ± 0.24 pmol/min/mg protein, $P < 0.05$, $n=5$). Both enalapril and captopril potentiated the cardiovascular changes induced by bradykinin (300 ng/kg, bolus). Moreover, enalapril strongly inhibited serum angiotensin-converting enzyme activity (from 12.8 ± 1.2 to 1.1 ± 0.2 nmol/ml/min, $P < 0.05$, $n=6$), while N^o-nitro-L-arginine methyl ester had no effect on such enzymatic activity. However, despite the inhibition of the renin-angiotensin system by the two angiotensin-converting enzyme inhibitors, N^o-nitro-L-arginine methyl ester elicited the same haemodynamic changes as those observed in control animals, except for preventing the decrease in systolic index. Hoe 140 had no effect on the cardiovascular responses to N^o-nitro-L-arginine methyl ester. These results indicate that the renin-angiotensin system does not modulate the haemodynamic changes that follow acute nitric oxide synthesis inhibition in the anaesthetised dog.

Keywords: Nitric oxide, Renin-angiotensin system, N^o-nitro-L-arginine methyl ester, Hoe 140, Enalapril, Blood pressure.

1. Introduction

Endothelium-derived nitric oxide plays a fundamental role in the control of blood pressure by maintaining an active state of vasodilatation (Moncada & Higgs, 1993). Indeed, the acute administration of nitric oxide synthase inhibitors, such as N^o-nitro-L-arginine methyl ester increases systemic vascular resistance and blood pressure (Rees et al., 1989, Gardiner et al., 1990; van Gelderen et al., 1993). In addition, these inhibitors commonly cause a decrease in both cardiac output and heart rate (Stamler et al., 1994; Zappellini et al., 1996). The chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats increases arterial blood pressure (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992) and represents a useful model of endothelium-dependent hypertension. Both angiotensin-converting enzyme inhibitors (Pollock et al., 1993; Moreno et al., 1995) and angiotensin II receptor antagonists can markedly reverse this hypertensive state (Ribeiro et al., 1992). In this paper, we have investigated the involvement of the renin-angiotensin system in the N^o-nitro-L-arginine methyl ester-induced haemodynamic changes in anaesthetised dogs using two angiotensin-converting enzyme inhibitors (enalapril and captopril) and the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (Wirth et al., 1991).

2. Material and Methods

2.1. *Experimental procedure*

Mongrel dogs of either sex (11.2 ± 0.7 kg) were initially anaesthetised with sodium pentobarbital (Sagatal®, 30 mg/kg, i.v.). The animals were then intubated and artificially ventilated with pure oxygen. Anaesthesia was maintained with a combination of fentanyl citrate (Fentanil®, 0.01 mg/kg/h), diazepam (Dienpax®, 0.25 mg/kg/h) and pancuronium bromide (Pavulon®, 0.10 mg/kg/h). The left femoral artery was cannulated for mean arterial blood pressure measurement (pressure transducer MX-860, Medex, USA) and the left femoral vein, for drug administration. A 7F-Swan-Ganz catheter (Edwards Laboratories, USA) was introduced through the right femoral vein and advanced to the pulmonary artery. The location of the catheter was confirmed by detection of the typical pressure wave of this artery. The catheter was connected to two MX-860 pressure transducers for the measurement of pulmonary arterial and right atrial pressures. The cardiac output was measured by the thermodilution technique (Fegler, 1954; Ganz et al., 1971). Briefly, 10 ml of cold saline (4-6°C) were injected through the proximal lumen of the Swan-Ganz catheter. The injection of this saline led to a change in blood temperature which was detected by a thermistor located 4 cm from the catheter tip, and transmitted to a computer (SDM 2000, Dixtal, Brazil) which calculated

cardiac output. The measurement of cardiac output was performed at least in duplicate. All catheters were filled with heparinised saline (10 IU/ml) to prevent clotting. The heart rate was measured via a surface electrocardiogram (lead I). The haemodynamic parameters were allowed to stabilise for 20 min before any drug administration.

2.2. Experimental design

2.2.1. Control animals (n=18): In these animals, we assessed the effects of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester on the haemodynamic parameters described above. After basal measurements had been obtained, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (0.01-10.0 mg/kg) was infused at a flow rate of 0.5 ml/min during 8 min. At the end of each infusion, the resulting haemodynamic changes were recorded. At the end of the entire protocol, the total amount of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester which had been administered to each animal was 14.44 mg/kg.

2.2.2. Enalapril-treated animals (n=9): After stabilisation and measurement of the haemodynamic variables, bradykinin was injected (300 ng/kg, 0.5 ml, bolus) and at the maximum hypotensive response, the haemodynamic changes were measured. Following recovery, the

haemodynamic variables were again measured and enalapril was infused (2 mg/kg) at a flow rate of 0.5 ml/min during 8 min. To check the efficacy of enalapril, at the end of the infusion, we repeated the bradykinin injection in order to assess whether there was any potentiation of the cardiovascular changes. Upon complete recovery from the effects of bradykinin, we obtained new haemodynamic measurements and then initiated the dose-response curve to N^o-nitro-L-arginine methyl ester as described above. This entire protocol was repeated using captopril (2 mg/kg at 0.5 ml/min during 8 min) instead of enalapril.

2.2.3. Hoe 140-treated animals (n=6): After stabilisation and measurement of basal haemodynamic parameters, bradykinin (300 ng/kg, 0.5 ml, bolus) was injected and the maximum hypotensive effect measured. When the haemodynamic parameters returned to basal values, the bradykinin antagonist Hoe 140 (0.1 mg/kg) was infused at a flow rate of 0.5 ml/min, during 8 min. The effects of the antagonist on the haemodynamic parameters were measured at the end of this infusion. To assess the efficacy of receptor blockade, the injection of bradykinin was repeated. Subsequently, N^o-nitro-L-arginine methyl ester was administered as described for the control animals (see above).

2.5. *Calculation of haemodynamic parameters*

All haemodynamic events, including mean arterial blood pressure, pulmonary arterial pressure, right atrial pressure, heart rate and cardiac output, were continuously displayed on a computer monitor and were recorded on a printer coupled to this system (SDM 2000, Dixtal, Brazil). Systemic vascular resistance was calculated as $\text{systemic vascular resistance} = [(\text{mean arterial blood pressure} - \text{right atrial pressure}) / \text{cardiac output}] \times 80$, where 80 is the constant that converts mmHg/l/min to dyn.s/cm⁵.

Systemic vascular resistance, systolic volume and cardiac output were corrected for body surface area (expressed in m²) and were expressed as the index of systemic vascular resistance (index of systemic vascular resistance = systemic vascular resistance x body surface area), the systolic index (systolic index = systolic volume/body surface area) and the cardiac index (cardiac index = cardiac output/body surface area).

2.6. *Determination of cerebellum nitric oxide synthase activity*

In some of the control animals, we examined the inhibition of brain nitric oxide synthase as described by Förstermann et al. (1990).

This assay is based on the conversion of [^3H] L-arginine to [^3H] L-citrulline. At the end of the dose-response curve to L-NAME the cerebellum was rapidly removed, weighed and homogenised in 5 volumes of cold incubation buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) containing phenylmethylsulphonyl fluoride (1 mM) and 1 mM of L-citrulline. The homogenates were incubated at room temperature for 30 min in the presence of 1 mM NADPH, 2 mM CaCl_2 and 10 μM of L-[2,3,4,5- ^3H] arginine monohydrochloride (100,000 dpm). Nitric oxide synthase activity was also measured in the absence of calcium (omission of CaCl_2 and addition of 1 mM EGTA) and in the presence of 1 mM N^ω -nitro-L-arginine methyl ester in the incubation medium. The protein content of the samples was determined by the method of Peterson (1977) and the enzyme activity was expressed as pmol L-citrulline/min/mg protein. Nitric oxide synthase activity was also assayed in the cerebella of animals which received no drug, except for anesthetic.

2.7. Determination of serum nitrate and nitrite levels

Nitrate and nitrite levels were quantified by the method of Muscará and de Nucci (1996). Briefly, after separation on a strong anion-exchange column, nitrate anions were reduced to nitrite on a

copper-plated cadmium-filled column and then detected by the Griess reaction. The sensitivity of the method was 30 pmol for both anions. For the assay, 3 ml blood samples were withdrawn before and after N^ω-nitro-L-arginine methyl ester administration from animals which had not been allowed to eat or drink for 12 h before the experiment in order to avoid nitrate ingestion. The blood was allowed to clot at room temperature and was then centrifuged (4200 rpm, 10 min) and the serum separated and stored at -20°C until analysed. The concentrations are expressed in μM.

2.8. Measurement of serum angiotensin-converting enzyme activity

Serum angiotensin-converting enzyme activity was assayed by measuring the amount of hippuric acid released from the synthetic substrate hippuryl-L-leucine at pH 8.3 and at 37°C (Cushman and Cheung, 1970). The released hippuric acid was quantified spectrophotometrically at 383 nm after reaction with cyanuric chloride (Hurst and Lovell-Smith, 1981). For the determination of angiotensin-converting enzyme activity in enalapril-treated animals, 3 ml blood samples were collected before and after administration of the drug and processed as described above. The sera were stored at -20°C until

assayed for angiotensin-converting enzyme activity which was expressed as nmol/ml/min.

2.9. *Drugs*

Bradykinin, enalapril and N^o-nitro-L-arginine methyl ester were purchased from Sigma (USA) and pentobarbital sodium (Sagatal[®]) was from May & Baker (England). Diazepam (Diempax[®]) was purchased from Sanofi (Brazil). Fentanyl citrate (Fentanil[®]) was donated by Cristalia (Brazil) and pancuronium bromide (Pavulon[®]) was obtained from the University Hospital Pharmacy. Hoe 140 was kindly provided by Hoechst (Germany), and enalapril by Biosintética (Brazil). L-[2,3,4,5-³H] Arginine (specific activity 60 Ci/mmol) was supplied by Amersham (England). The reagents used in the serum angiotensin-converting enzyme and cerebellum nitric oxide synthase assays were purchased from Sigma (USA).

2.10. Data and statistical analysis

All data are shown as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) and were analysed by ANOVA for multiple comparisons followed by Duncan's test. In the case of nitric oxide synthase activity determination data was analysed by ANOVA followed by Newman-Keuls test. A P value < 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Control animals

N^o-nitro-L-arginine methyl ester (0.01-10.0 mg/kg) induced a dose-dependent rise in mean arterial blood pressure (Fig. 1A). At 10 mg/kg, N^o-nitro-L-arginine methyl ester increased blood pressure by 41.7% when compared to baseline values (from 91.3 ± 3.6 to 129.4 ± 4.0 mmHg, $P < 0.05$). N^o-nitro-L-arginine methyl ester also increased systemic vascular resistance (Fig. 1D). At the highest dose, N^o-nitro-L-arginine methyl ester increased the index of systemic vascular resistance by 148.2% (from 1915.3 ± 177.6 to 4754.4 ± 363.5 dyn.s/cm⁵/m², $P < 0.05$). Parallel with these increases, the cardiac output (Fig. 1B) and the heart rate (Fig. 1C) decreased. At the highest dose of N^o-nitro-L-arginine methyl ester, the cardiac index decreased 44.3% (from 3.88 ± 0.25 to 2.16 ± 0.16 l/min/m², $P < 0.05$), the systolic index decreased 12.3% (Table 1) and the heart rate decreased 38.5% (from 117 ± 6.7 to 72 ± 5.2 bpm, $P < 0.05$).

N^o-nitro-L-arginine methyl ester inhibited cerebellum nitric oxide synthase activity by 58% when compared to animals in which no drug was administered (Fig. 2). The *in vitro* conversion of [³H] L-arginine to [³H] L-citrulline was strongly inhibited (>90%) when calcium was omitted or N^o-nitro-L-arginine methyl ester, added to the incubation medium, indicating that this conversion is due to the constitutive form

of nitric oxide synthase. Despite the marked enzyme inhibition, neither the serum nitrate and nitrite levels nor the serum angiotensin-converting enzyme activity was significantly altered by N^o-nitro-L-arginine methyl ester (Table 2).

3.2. Enalapril-treated animals

Table 3 shows the effects of enalapril on basal haemodynamic variables. Enalapril potentiated the cardiovascular changes induced by bradykinin (300 ng/kg, Table 4) and inhibited serum angiotensin-converting enzyme activity by 91% (from 12.8 ± 1.2 to 1.1 ± 0.2 nmol/ml/min, $n=6$, $P<0.05$). Despite the enzyme inhibition, the N^o-nitro-L-arginine methyl ester-induced haemodynamic changes were unaltered. At the highest dose, N^o-nitro-L-arginine methyl ester increased mean arterial blood pressure by 29.6% when compared to basal values (from 90.6 ± 5.4 to 117.4 ± 10.1 mmHg, $P<0.05$, Fig. 1A). N^o-nitro-L-arginine methyl ester also dose-dependently increased the systemic vascular resistance (Fig. 1D). At 10 mg/kg, the index of systemic vascular resistance increased 124.1% (from 1857.4 ± 88.4 to 4163.5 ± 785.4 dyn.s/cm⁵/m², $P<0.05$). Finally, N^o-nitro-L-arginine methyl ester produced a dose-dependent decrease in the cardiac output and heart rate (Fig. 1B and C, respectively). At the highest dose, the cardiac index decreased 30.1% (from 3.89 ± 0.17 to $2.72 \pm$

0.48 l/min/m², $P < 0.05$), while the heart rate decreased 50.0% (from 136 ± 10.7 to 68 ± 6.3 bpm, $P < 0.05$). However, in enalapril-treated animals, the systolic index did not decrease in response to N^ω-nitro-L-arginine methyl ester administration (Table 1).

3.3. Captopril-treated animals

Captopril induced similar changes to enalapril in the basal haemodynamic parameters, i.e., a fall in mean arterial blood pressure (from 95.9 ± 5.0 to 90.1 ± 5.0 mmHg, $P < 0.05$). Captopril infusion also potentiated the bradykinin-induced cardiovascular changes (data not shown). As with enalapril, captopril failed to affect the N^ω-nitro-L-arginine methyl ester-induced haemodynamic changes (Fig. 3). Despite the fall in the cardiac index, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester did not decrease the systolic index (Table 1).

3.4. Hoe 140-treated animals

Hoe 140 (0.1 mg/kg) did not significantly change the haemodynamic parameters of anaesthetised dogs (Table 3). The maximum hypotensive effect induced by bradykinin (300 ng/kg) was -42.8 ± 7.1 mmHg (from 98.4 ± 4.8 to 55.6 ± 7.3 mmHg) and was abolished by Hoe 140. In the presence of bradykinin B₂ receptor blockade, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester dose dependently affected

all of the haemodynamic parameters. At 10.0 mg/kg, mean arterial blood pressure increased 39.8% (from 94.3 ± 8.2 to 131.8 ± 7.3 mmHg, $P < 0.05$ when compared to basal values, Fig. 4A). At the same dose, the index of systemic vascular resistance increased 199.8% (from 1956.8 ± 135.8 to 5867.3 ± 619.6 dyn.s/cm⁵/m², $P < 0.05$; Fig. 4D). Simultaneously, N^o-nitro-L-arginine methyl ester decreased the cardiac output and caused bradycardia (Fig. 4B and C). At the highest dose, N^o-nitro-L-arginine methyl ester reduced the cardiac index by 52.9% (from 3.89 ± 0.35 to 1.83 ± 0.11 l/min/m², $P < 0.05$) while the heart rate decreased 36.8% (from 106 ± 11.3 to 67 ± 5.1 bpm, $P < 0.05$). The decrease in the cardiac index was accompanied by a decrease in the systolic index (25.2%, Table1).

4. Discussion

The present results clearly demonstrate that the angiotensin-converting enzyme inhibitors enalapril and captopril failed to affect the haemodynamic changes induced by acute N^o-nitro-L-arginine methyl ester administration in the anaesthetised dog. The bradykinin B₂ antagonist Hoe 140 also had no significant effect on these haemodynamic changes. These results are unlikely to reflect inadequate doses of the compounds used, since enalapril and captopril strongly potentiated, while Hoe 140 abolished, the cardiovascular changes induced by bradykinin. Furthermore, at the dose used, enalapril markedly inhibited serum angiotensin-converting enzyme activity. Together, these findings indicate that the renin-angiotensin system does not modulate the haemodynamic changes induced by acute N^o-nitro-L-arginine methyl ester administration in the anaesthetised dog. Similar results were obtained by Nafrialdi and Mimran (1993) who verified that angiotensin II receptor blockade by losartan did not prevent the development of either arterial hypertension or bradycardia induced by acute N^o-nitro-L-arginine methyl ester administration. Moreover, losartan did not alter the decrease in cardiac output induced by N^o-nitro-L-arginine methyl ester in two-kidney, one clip hypertensive rats (Sigmon and Beierwaltes, 1993).

In rats, chronic inhibition of nitric oxide synthesis by N^o-nitro-L-arginine methyl ester leads to hypertension (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992). In contrast to the acute situation, daily co-administration of N^o-nitro-L-arginine methyl ester and losartan (Ribeiro et al., 1992) or N^o-nitro-L-arginine methyl ester and enalapril (Pollock et al., 1993; Moreno et al., 1995) prevents the development of arterial hypertension. These observations indicate that chronic, but not acute N^o-nitro-L-arginine methyl ester -induced hypertension is modulated by renin-angiotensin system activation.

One possible explanation for this discrepancy would reflect the action of nitric oxide synthase inhibitors on renin release. Acute nitric oxide blockade induces renal vasoconstriction (Gardiner et al., 1990; Zatz and de Nucci, 1991) and hence could evoke the release of renin. However, acute nitric oxide blockade diminishes renin secretion (Johnson and Freeman, 1992; Naess et al., 1993; Deng et al., 1994; Schricker et al., 1995) further indicating that the haemodynamic effects induced by acute N^o-nitro-L-arginine methyl ester administration depends on the renin-angiotensin system activation. Indeed, chronic administration of nitric oxide synthesis inhibitors is associated with hyporreninemia (Dananberg et al., 1993; Navarro et al., 1994). Considering that tissular renin-angiotensin system seems to play a more important role in controlling blood pressure than circulating renin-

angiotensin system (Dzau et al., 1986; Campbell, 1987; Falkenhahn et al., 1994), these studies may reflect this difference since they have measured plasma, and not tissue renin activity.

Pretreatment of the animals with either enalapril or captopril prevented the decrease in the systolic index induced by N^o-nitro-L-arginine methyl ester. Since angiotensin II exerts positive inotropic effect (Falkenhahn et al., 1994), this protection should reflect that bradykinin, rather than angiotensin II, modulates canine myocardial contractility. The finding that the decrease in cardiac output persisted even in the animals treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors indicates that this effect is mainly due to bradycardia.

Acknowledgements

A. Z. is a fellow of FAPESP (92/0469-0) and S.A.T. of CAPES. We thank Aírton Fernando de Paula and Flávio do Rego de Araújo Faro for technical assistance.

References

- Baylis, C., B. Mitruka and A. Deng, 1992, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage, *J. Clin. Invest.* 90, 278.
- Campbell, D.Z, 1987, Circulating and tissue angiotensin systems, *J. Clin. Invest.* 79, 1.
- Cushman, D.W. and H.S. Cheung, 1970, Spectrophotometric assay and properties of the ACE of the rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637.
- Dananberg, J., R.S. Sider and R.J. Grekin, 1993, Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine, *Hypertension* 21, 359.
- Deng, X.L., W.J. Welch and C.S. Wilcox, 1994, Renal vasoconstriction during inhibition of NO synthase: effect of dietary salt. *Kidney Int.* 46, 639.
- Dzau, V.J, 1986, Significance of the vascular renin-angiotensin pathway, *Hypertension*, 8, 553.
- Falkenhahn, M., Gohlke, P., Paul, M., Stoll, M. and T. Unger, 1994, The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: New therapeutic aspects, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24 (Suppl 2), S6.
- Fegler, G, 1954, Measurement of cardiac output in anesthetized animals by a thermodilution method, *Quart. J. Exp. Physiol*, 39, 153.

Förstermann, U., L.D. Gorsky, J.S. Pollock, H.H.H.W. Schmidt, M. Heller and F. Murad, 1990, Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168, 727.

Ganz, W., R. Donoso, H.S. Marcus, J.S. Forrestier and H.J.C. Swan, 1971, A new technique for measurement of cardiac output by thermodilution in man, *Am. J. Cardiol.* 27, 392.

Gardiner, S.M., A.M. Compton, P.A. Kemp and T. Bennett, 1990, Regional and cardiac effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.* 101, 625.

Hurst, P.L. and C.J. Lovell-Smith, 1981, Optimized assay for serum ACE activity, *Clin. Chem.* 27, 2048.

Johnson, R.A. and R.F. Freeman, 1992, Pressure natriuresis in rats during blockade of the L-arginine/nitric oxide pathway, *Hypertension*, 19, 333.

Moncada, S. and A. Higgs, 1993, The L-arginine-nitric oxide pathway, *New Engl. J. Med.* 329, 2002.

Moreno-Jr, H., L.P. Nathan, S.K.P. Costa, K. Metze, E. Antunes, R. Zatz and G. de Nucci, 1995, Enalapril does not prevent the myocardial ischaemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis, *Eur. J. Pharmacol.* 287, 93.

Muscará, M.N. and G. de Nucci, 1996, Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post-column reactions. *J. Chromatography B: Biomedical Applications*, in press.

Naess, P.A., Christensen, G., Kirkeboen, K.A. and F. Kiil, 1993, Effect on renin release of inhibiting renal nitric oxide synthesis in anaesthetized dogs, *Acta Physiol. Scand*, 148, 137.

Nafrialdi, B.J. and A. Mimran, 1993, Renin-angiotensin system in the pressor effect of acute N-omega-nitro-L-arginine methyl ester, *J. Hypertension* 11 (Suppl 5), S324.

Navarro, J., A. Sanchez, J. Saiz, L.M. Ruilope, J. Garciaestan, J.C. Romero, S. Moncada and V. Lahera, 1994, Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats, *Am. J. Physiol.* 36, R1516.

Peterson, G.L., 1977, A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83, 346.

Pollock, D.M., J.S. Polakowski, B.J. Divish and T.J. Opgenorth, 1993, Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition, *Hypertension* 21, 660.

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

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

Schricker, K., Hegyi, I., Hamann, M., Kaissling B. and A. Kurtz, 1995, Tonic stimulation of renin gene expression by nitric oxide is counteracted by tonic inhibition through angiotensin II. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 8006.

Sigmon, D.H. and W.H. Beierwaltes, 1993, Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension, *Hypertension* 22, 237.

Stamler, J.S., E. Loh, M-A. Roddy, K.E. Currie and M.A. Creager, 1994, Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans, *Circulation* 89, 2035.

Van Gelderen, E.M., M.D.B. Boer and P.R. Saxena, 1993, N^G-Nitro-L-arginine methyl ester: systemic and pulmonary haemodynamics, tissue blood flow and arteriovenous shunting in the pig, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348, 417.

Wirth, K., F.J. Hoek, U. Albus, W. Linz, H. Anagnostopoulos, S.T. Henke, G. Breipohl, W. König, J. Knolle and B.A. Scholkens, 1991, HOE 140, a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vivo* studies, Br. J. Pharmacol. 102, 774.

Zappellini, A., H. Moreno Jr, E. Antunes and G. de Nucci, 1996, Evaluation of two different inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs, Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 33.

Zatz, R. and G. de Nucci, 1991, Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation, Am. J. Physiol, 261, F360.

Table 1

Effect of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (0.01-10.0 mg/kg) on the systolic index of control animals (L-NAME, n=18) or in the animals pre-treated with captopril (2 mg/kg, n=8), enalapril (2 mg/kg, n=6) or HOE 140 (0.1 mg/kg, n=6). The values are mean $\pm$ S.E.M. and are expressed as ml/beat/m².

	L-NAME	Captopril	Enalapril	HOE 140
Basal	34.2 $\pm$ 2.8	28.3 $\pm$ 2.8	28.7 $\pm$ 1.8	37.3 $\pm$ 2.4
L-NAME 0.01	35.8 $\pm$ 2.5	29.0 $\pm$ 2.7	28.4 $\pm$ 2.9	36.7 $\pm$ 3.2
0.03	36.9 $\pm$ 2.5	32.2 $\pm$ 3.2	30.4 $\pm$ 3.1	35.6 $\pm$ 2.3
0.1	35.4 $\pm$ 2.7	32.0 $\pm$ 3.1	33.6 $\pm$ 4.2	37.8 $\pm$ 3.3
0.3	34.2 $\pm$ 2.5	37.1 $\pm$ 4.5	33.7 $\pm$ 5.3	36.1 $\pm$ 4.0
1.0	33.4 $\pm$ 2.3	35.2 $\pm$ 3.8	35.1 $\pm$ 5.1	34.7 $\pm$ 3.3
3.0	30.6 $\pm$ 2.6*	35.1 $\pm$ 4.6	34.6 $\pm$ 6.3	31.3 $\pm$ 2.4
10.0	30.0 $\pm$ 1.9*	34.5 $\pm$ 3.9	35.4 $\pm$ 6.1	27.9 $\pm$ 2.1*

* p < 0.05 when compared to basal values.

Table 2

Nitrate and nitrite levels and angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in dog serum. Blood was withdrawn before (Basal) and after the infusion of each dose of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (0.01-10.0 mg/kg). Values represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=5).

Treatment		Nitrate (μ M)	Nitrite (μ M)	ACE(nmol/ml/min)
Basal	—	10.2 $\pm$ 1.9	0.26 $\pm$ 0.12	13.0 $\pm$ 1.7
L-NAME	0.01	12.1 $\pm$ 2.5	0.42 $\pm$ 0.16	12.0 $\pm$ 1.9
	0.03	9.3 $\pm$ 1.5	0.54 $\pm$ 0.17	12.1 $\pm$ 1.3
	0.1	10.7 $\pm$ 1.2	0.58 $\pm$ 0.18	12.0 $\pm$ 1.5
	0.3	9.2 $\pm$ 2.0	0.28 $\pm$ 0.10	11.8 $\pm$ 1.7
	1.0	7.9 $\pm$ 1.5	0.60 $\pm$ 0.22	12.3 $\pm$ 1.4
	3.0	8.7 $\pm$ 1.5	0.48 $\pm$ 0.13	12.9 $\pm$ 2.3
	10.0	9.3 $\pm$ 2.5	0.50 $\pm$ 0.18	11.2 $\pm$ 1.7

Table 3

Effect of enalapril (2 mg/kg, n=9) and HOE 140 (0.1 mg/kg, n=6) infusions on the basal mean arterial blood pressure (MABP, mmHg), cardiac index (CI, l/min/m²), systolic index (SI, ml/bat/m²), heart rate (HR, bpm) and index of systemic vascular resistance (ISVR, dyn.s/cm⁵/m²) of anaesthetised dogs. Values represent the mean $\pm$ S.E.M.. Results were analysed by ANOVA followed by Duncan's test.

	ENALAPRIL		Hoe 140	
	Before	After	Before	After
MABP	94.4 $\pm$ 4.7	90.6 $\pm$ 3.4	97.5 $\pm$ 6.2	95.5 $\pm$ 8.6
CI	3.08 $\pm$ 0.47	3.48 $\pm$ 0.21*	3.79 $\pm$ 0.31	3.63 $\pm$ 0.33
SI	26.7 $\pm$ 2.4	28.5 $\pm$ 2.1*	36.6 $\pm$ 4.6	36.4 $\pm$ 4.5
HR	117 $\pm$ 7.2	124 $\pm$ 8.7	107 $\pm$ 8.9	103 $\pm$ 8.8
ISVR	2471.4 $\pm$ 187.0	2091.6 $\pm$ 122.3*	2110.0 $\pm$ 187.7	2103.3 $\pm$ 101.8

* p < 0.05 when compared to values before drug administration.

Table 4

Potentiation of the bradykinin-induced cardiovascular changes by enalapril. The haemodynamic parameters measured were mean arterial blood pressure (MABP), cardiac index (CI), heart rate (HR) and index of systemic vascular resistance (ISVR). Values are the mean $\pm$ S.E.M. (n=7).

	ENALAPRIL		
	Before	After	Potentiation (%)
MABP (mmHg)	-19.7 $\pm$ 2.8	-48.7 $\pm$ 2.6*	146
CI (l/min/m ²)	-0.73 $\pm$ 0.10	+2.00 $\pm$ 0.41*	174
HR (bpm)	+22 $\pm$ 6.1	+48 $\pm$ 16.0	118
ISVR (dyn.s/cm ⁵ /m ²)	-993.8 $\pm$ 132.5	-1466.1 $\pm$ 107.7*	147

* p<0.05 when compared to values obtained before enalapril administration.

Fig. 1. Effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.01-10.0 mg/kg) on the mean arterial blood pressure (MABP, Panel A), cardiac index (CI, Panel B), heart rate (HR, Panel C) and index of systemic vascular resistance (ISVR, Panel D) of anaesthetised dogs in the absence (□, n=18) and in the presence (♦, n=7) of enalapril (2 mg/kg). Each dose of N^o-nitro-L-arginine methyl ester and enalapril was infused for 8 min at a rate of 0.5 ml/min. Values are the mean $\pm$ S.E.M. *p< 0.05 versus the respective control (C)

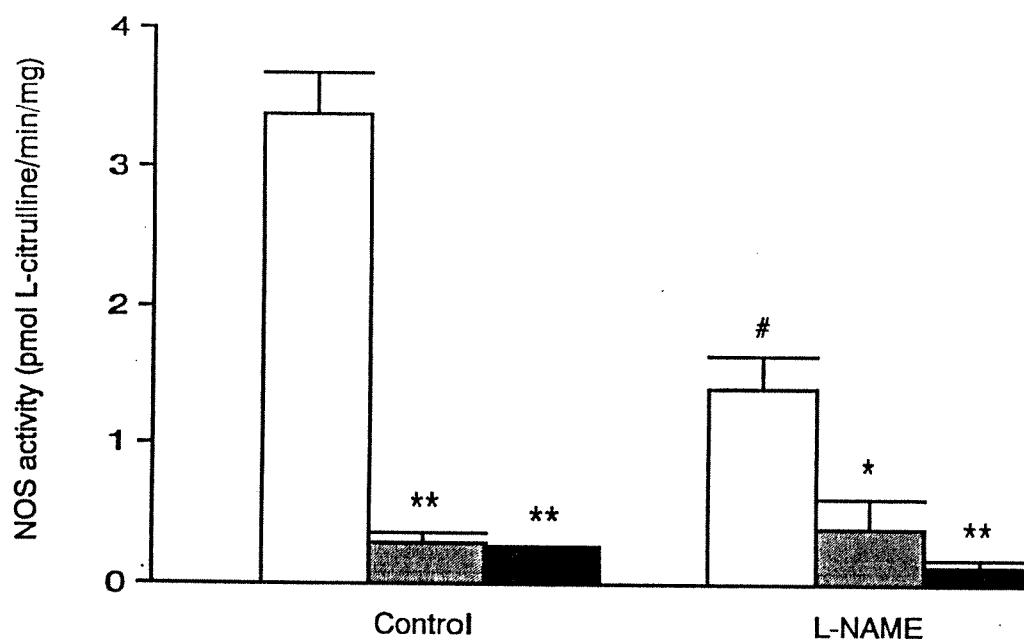


Fig. 2. Nitric oxide synthase (NOS) activity in cerebellum homogenates from control animals (no drug administered, n=5, Control) and animals which received N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (total dose of 14.44 mg/kg, n=5, L-NAME). Nitric oxide synthase activity was assayed in the normal calcium-containing buffer (total activity, open columns), in the presence of 1 mM EGTA (calcium free buffer, striped columns), and in the presence of 1 mM N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (solid columns). The data represent the mean $\pm$ S.E.M. *p<0.05 and **p<0.01 when compared to the corresponding activity in calcium-containing buffer. #p<0.01 when compared to the activity in calcium-containing buffer of the non- N^ω-nitro-L-arginine methyl ester treated animals.

Fig. 3. Effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.01-10.0 mg/kg) on the mean arterial blood pressure (MABP, Panel A), cardiac index (CI, Panel B), heart rate (HR, Panel C) and index of systemic vascular resistance (ISVR, Panel D) of anaesthetised dogs in the absence (□, n=18) and presence (•, n=9) of captopril (2 mg/kg). Each dose of L-NAME and captopril was infused for 8 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The values are the mean $\pm$ S.E.M.

*p < 0.05 versus the respective control (C)

Fig. 4. Effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.01-10.0 mg/kg) on the mean arterial blood pressure (MABP, Panel A), cardiac index (CI, Panel B), heart rate (HR, Panel C) and index of systemic vascular resistance (ISVR, Panel D) of anaesthetised dogs in the absence (□, n=18) and presence (♦, n=6) of the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (0.1 mg/kg). Each dose of N^o-nitro-L-arginine methyl ester and Hoe 140 was infused for 8 min at a rate of 0.5 ml/min. Values are the mean $\pm$ S.E.M. *p< 0.05 compared to the respective control (C).

