

ELISABETE ALCANTARA DOS SANTOS

**Estudo dos Mecanismos da Associação
entre Níveis Pressóricos e a Via
Heme-Heme Oxigenase**

Tese apresentada ao Departamento
de Farmacologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título
de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

**SÃO PAULO
MARÇO DE 2001**

ELISABETE ALCANTARA DOS SANTOS

Estudo dos Mecanismos da Associação entre
Níveis Pressóricos e a Via Heme-Heme
Oxigenase.

Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de doutor
em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Joel C. Heimann

SÃO PAULO
MARÇO DE 2001

À minha mãe, **Maria Paula**,
pelo amor, carinho e apoio

Agradeço a Deus pela energia e determinação
que me acompanharam ao longo do desenvolvimento
deste projeto

Agradecimento em especial

Ao **Prof. Dr. Joel Claudio Heimann,**

pela confiança, carinho e por orientar-me no caminho científico.

AGRADECIMENTOS

À aluna de Iniciação Científica **Daniela Araujo Mirandola**, pela dedicação e participação neste trabalho.

À amiga **Luzia Naôko Shinohara Furukawa**, pela amizade, pelos ensinamentos e pela paciência.

À **Marlene Araujo Mirandola**, pelo auxílio na revisão do texto.

Ao Prof. Dr. **José Eduardo Krieger** chefe do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – H.C.F.M.U.S.P. que me permitiu o aprendizado de algumas técnicas de biologia molecular em seu laboratório.

Aos **colegas** do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – H.C.F.M.U.S.P., Silvia, Renata, Maúde e Ayumi pela amizade e pelas contribuições.

Aos **colegas e amigos** do **Laboratório de Hipertensão Experimental** que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos no crescimento deste trabalho.

Aos **colegas e amigos** do **Laboratório de Fisiopatologia Renal** pelo convívio profissional e pelo aprendizado.

À **FAPESP, PRONEX** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to Dr. Richard Roman Jr., for the support and the opportunity to develop some of the experiments at his laboratory. Also, I would like to thank the team of his laboratory for taught me some techniques.

I would like to thank **Henry Audley** for his care and friendship during this work.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abrevisturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	09
3. Métodos.....	10
4. Cálculos e Análise estatística.....	26
5. Resultados.....	27
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	53
8. Referências Bibliográficas.....	54
10. Abstract.....	61

Lista de Abreviaturas

HEOX - heme oxigenase

CO - monóxido de carbono

ZnPP IX - Zinco protoporfirina IX

HO - dieta hipossódica

NO - dieta normossódica

HR - dieta hipersódica

EET - ácido 14,15-epoxieicosatrienóico

DiHETE - ácido dihidroxieicosatrienóico

20-HETE - ácido 20 hidroxieicosatetraenóico

Ang II - angiotensina II

L-NAME - L^ω-nitro L-arginina metil éster

FE - fenilefrina

SNP - nitroprussiato de sódio

CLOT - clotrimazole

Azeite - azeite de oliva

AA - ácido araquidônico

PAM - pressão arterial média

PAC - pressão arterial caudal

ARP - atividade da renina plasmática

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

PA - pressão arterial

PAM - pressão arterial média

PAC - pressão arterial caudal

Lista de Figuras

	Pág.
1. Catabolismo de heme pela heme oxigenase	01
2. Protocolo Experimental do modelo 1 de hipertensão arterial crônica	11
3. Protocolo Experimental do modelo 2 de hipertensão arterial crônica	13
4. Protocolo Experimental do modelo 3 de hipertensão arterial aguda	15
5. Protocolo Experimental do modelo 4 de hipotensão arterial crônica	17
6. Protocolo Experimental do modelo 5 de hipotensão arterial aguda	19
7. Protocolo Experimental da Participação do citocromo P-450	21
8. Teste de inibição da heme oxigenase	23
9. Pressão arterial média (PAM) do grupo AII antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X.	28
10. Pressão arterial média (PAM) do grupo L-NAME antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo.	30
11. Pressão arterial média (PAM) do grupo FE antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo.	32
12. Pressão arterial média (PAM) do grupo hidralazina antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo.	34
13. Pressão arterial média (PAM) do grupo SNP antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo.	36
14. Pressão arterial média (PAM) do grupo NO+clotrimazole antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X.	38
15. Pressão arterial média (PAM) do grupo HR+clotrimazole antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP I X.	40
16. Atividade de renina plasmática dos animais sob infusão de AII e controle.	47

Lista de Tabelas

	Pág.
1. Pressão arterial caudal (PAC) antes e após a administração de ZnPP IX.	43
2. Pressão arterial caudal (PAC) antes e após a administração do veículo.	44
3. Peso corporal dos animais antes e após a cirurgia para canulação da artéria carótida e/ou veia jugular.	45
4. Peso corporal dos animais antes e após o teste de inibição da HEOX cuja pressão arterial foi realizada pelo método oscilométrico (PAC).	46

RESUMO

A heme oxigenase (HEOX) é uma enzima que converte o anel heme em quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e Fe^{3+} . Esta enzima tem um importante papel fisiológico, regulando os níveis de hemoproteínas e protegendo as células da agressão oxidativa do heme livre. A biliverdina é, subseqüentemente, transformada em bilirrubina que apresenta propriedades antioxidativas e o Fe^{3+} é seqüestrado pela ferritina. O CO ativa a guanilil ciclase, com resultante produção de 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico provocando relaxamento da musculatura lisa vascular.

Em trabalho anterior, nós verificamos o efeito da inibição aguda da heme oxigenase com zinco protoporfirina (ZnPP IX) sobre a pressão arterial de ratos Wistar machos recebendo dietas hipossódica (0,15% de NaCl), normossódica (1,3% de NaCl) ou hipersódica (8% de NaCl) desde o desmame. Nos animais sob dieta hipersódica houve diminuição nos níveis pressóricos, enquanto que nos animais que recebiam dieta hipo e normossódica, ocorreu um aumento dos níveis pressóricos. A análise destes resultados mostrou a existência de uma correlação negativa entre a pressão arterial basal medida antes da injeção de ZnPP IX e o efeito deste tratamento sobre os níveis pressóricos. Esta correlação independeu do conteúdo de sal na dieta consumida pelos animais. Concluimos assim, que a resposta à inibição da HEOX é modulada pela pressão arterial basal.

Recentemente, foi mostrado que a heme oxigenase é induzida por incrementos da pressão obtidos de maneiras diversas e que ao retornar os níveis pressóricos a valores basais esta indução da enzima é revertida.

A estimulação da HEOX promove consumo de anel heme. O heme integra a estrutura molecular de enzimas importantes na regulação da pressão arterial, como por exemplo, guanilato ciclase, óxido nítrico sintase, hidroxilase e epóxigenase (enzimas pertencentes à família do citocromo P-450). Permitimo-nos conjecturar que a falta de heme repercute sobre a atuação destas enzimas, uma vez que o *turnover* destas enzimas é dependente de heme.

O **objetivo** deste estudo foi confirmar em outros modelos de hipertensão arterial os achados anteriores e verificar se a enzima epoxigenase que metaboliza o ácido araquidônico formando compostos vasodilatadores, tais como EET e DiHTE, está envolvida na queda da pressão arterial dos animais sob dieta hipersódica. Neste estudo foi induzida hipertensão arterial crônica com angiotensina II (AII - 0,7 mg.kg⁻¹.d⁻¹, via minibomba osmótica durante 7 dias) ou com L^ω-nitro L-arginina metil ester (L-NAME - 50 mg/L fornecido na água de beber ao longo de duas semanas) e hipertensão arterial aguda com fenilefrina (FE - 1 mg.kg⁻¹.h⁻¹ iv). Hidralazina (15 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ fornecido na água de beber durante 9 dias) e nitroprussiato de sódio (SNP - 7,7µg.kg⁻¹.min⁻¹ iv) foram utilizados para induzir diminuição crônica e aguda, respectivamente, da pressão arterial. A participação da via do citocromo P-450 no mecanismo de queda pressórica em resposta ao ZnPP IX nos animais sob dieta hipersódica (descrita no trabalho anterior), foi avaliada através da inibição desta via com clotrimazole (80 mg/kg/24 horas) em animais na vigência de sobrecarga de sal ou consumindo dieta normossódica. Grupos de ratos submetidos ao tratamento com AII, L-NAME, FE, SNP, hidralazina e clotrimazole foram submetidos ao teste de inibição da HEOX. A pressão arterial direta (artéria carótida) foi avaliada antes e

após a administração de zinco protoporfirina IX (ZnPP IX – 90 µmol/kg ip) ou veículo (carbonato de sódio – 0,15mmol/kg ip).

Nós verificamos nos modelos de hipertensão arterial crônicos ou no modelo agudo um resultado similar ao encontrado no estudo anterior, ou seja, em resposta à inibição da heme oxigenase houve uma queda importante da pressão arterial. Nos animais submetidos a hipotensão arterial não houve modificação da pressão arterial em resposta à administração de ZnPP IX. Nos grupos de animais submetidos ao tratamento com clotrimazole não houve modificação da pressão arterial após administração de ZnPP IX.

Em conclusão, pressão basal elevada modifica o efeito da inibição da heme oxigenase sobre os níveis pressóricos em comparação com pressão arterial basal normal ou reduzida.

A via do citocromo P-450 parece estar envolvida na queda pressórica após inibição da heme oxigenase nos animais submetidos a tratamento crônico com dieta hipersódica, uma vez que nos animais tratados com clotrimazole não houve modificação pressórica após a inibição da heme oxigenase.

INTRODUÇÃO

Há alguns anos, uma série de estudos tem avaliado o catabolismo do anel heme e tem verificado um possível vínculo da atividade desta via metabólica com os níveis pressóricos (Seki, 1997; Galbraith, 1999). A heme oxigenase é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático que catalisa a reação de quebra do anel heme na presença de oxigênio molecular e de citocromo P-450 redutase que transfere elétrons de NADPH para heme (Maines, 1992) - figura 1.

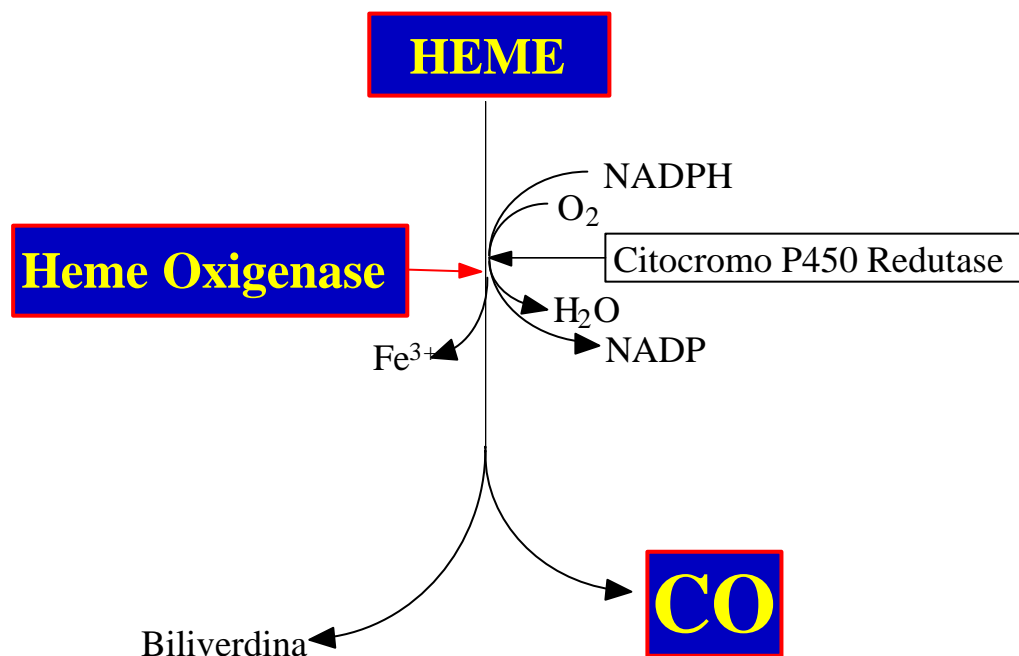


Figura 1: Catabolismo de heme pela heme oxigenase.

Os níveis tissulares de heme são regulados por duas enzimas: a δ aminolevulinato sintase, responsável pela biossíntese e a heme oxigenase (HEOX) enzima responsável pelo catabolismo de heme.

Heme é de importância vital nos sistemas fisiológicos formando a unidade catalítica de várias proteínas (hemeproteínas) que são essenciais para o transporte de oxigênio (hemoglobina), estoque de oxigênio (mioglobina), respiração celular (citocromos mitocondriais), destruição de radicais livres (catalase e peroxidase) (Abraham, 1988) e regulação da pressão arterial (óxido nítrico sintase e guanilato ciclase) entre outras (Galbraith, 1999). Heme livre pode agir como uma molécula pró-oxidante por proporcionar a produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, provocam peroxidação de lipídeos, denaturação de proteínas e danos ao DNA (Immenschuh, 2000).

Cerca de 85% da produção de monóxido de carbono (CO) em mamíferos vem da atividade da heme oxigenase, sendo os outros 15% decorrentes de processos como peroxidação de lipídeos (Labbé, 1999).

O monóxido de carbono estimula a formação de 3',5'- monofosfato guanosina cíclico pela ativação da guanilil ciclase solúvel, da mesma forma como o óxido nítrico (NO). O CO está envolvido no controle do tônus vascular em diversos tecidos como cérebro, rins (Galbrath, 1999), fígado (Suematstu,1996) e no sistema cardiovascular (Johnson, 1999). O CO também está envolvido no controle cardiovascular central através da transmissão glutamatérgica (Johnson, 1995), na regulação do tônus vascular placentário (McLean, 2000) e na liberação de insulina e glucagon (Kikuchi & Yoshida, 1983).

Em células de mamíferos, a biliverdina é rapidamente reduzida pela biliverdina redutase para bilirrubina. De acordo com recentes observações, a bilirrubina apresenta propriedades antioxidantes, agindo, por exemplo,

como uma substância neuroprotetora por prevenir a ação deletéria de radicais livres em cultura de células neuronais de camundongos (Dore, 1999), ou contribuir para a regulação da pressão arterial por funcionar como um *scavenger* de espécies reativas de oxigênio que podem ser liberadas pelo endotélio sob numerosos estímulos como por exemplo, por isquemia/reperfusão. Estas espécies reativas de oxigênio podem interagir com o NO resultando na formação de peróxinitrito, diminuindo sua ação vasodilatadora (Foresti, 1999).

Quando o ferro livre, consequência da degradação do anel heme, não é adequadamente sequestrado pela ferritina, pode ocorrer incremento da pressão arterial devido a formação de espécies reativas de oxigênio.

Em mamíferos, três isoenzimas de HEOX foram identificadas até o momento, a HEOX-1, a HEOX-2 e a HEOX-3. HEOX-1 é altamente induzível em vários tecidos como coração, rim, fígado, vasos sanguíneos, baço, pulmão e outros. HEOX-2 é constitutivamente expressa no endotélio e nas camadas média e adventícia dos vasos sanguíneos, testículo e cérebro. HEOX-3 foi recentemente descrita no cérebro (McCoubrey, 1997). As duas primeiras isoenzimas apresentam semelhanças quanto a especificidade de substrato e quanto a necessidade de um cofator para que ocorra a atividade enzimática. A terceira isoenzima foi descrita como sendo de baixa atividade. Entretanto, HEOX-1 e HEOX-2 que são produtos de dois genes distintos apresentam diferenças mais marcantes (compartilham cerca de 43% de homologia genética) no seu mecanismo regulatório. HEOX-1 é a "heat shock protein 32" (HSP32) e é induzível pelo calor, metais, estresse oxidativo (peróxido de hidrogênio - H_2O_2), radiação ultra-violeta (Essig, 1997), hormônios (gonadotrofina coriônica humana), bactérias pirogênicas (endotoxinas) e compostos heme (hematina, hemoglobina e heme) (Rodgers, 1994). Os indutores causam aumento na transcrição de mRNA por ativarem

fatores transcripcionais de vários sítios regulatórios na região promotora da heme oxigenase 1. A indução da heme oxigenase pelo seu substrato (heme) decorre da ativação de fatores transcripcionais, tais como a proteína ativadora -2 (AP-2) e o fator NF- κ B (Deramaudt, 1999). Somente a atividade da isoenzima HEOX-1 pode ser induzida, havendo aumento de sua expressão em até cerca de 100 vezes.

O endotélio vascular é um tecido capaz de responder a uma grande variedade de estímulos levando a modulação de muitas atividades enzimáticas, como a expressão da HEOX. Esta característica representa a capacidade de adaptação às novas condições para manutenção da homeostase vascular (Motterlini, 1996).

O NO exógeno/endógeno aumenta a expressão do gene HEOX-1 e a liberação de CO (Wagner, 1997; Vesely, 1998, Thorup, 1999). O mecanismo pelo qual ocorre a indução da HEOX-1 pelo NO ainda não foi bem esclarecido. Hara e cols. (Hara, 1999) estudaram em cultura de células de adenocarcinoma coloretal humano (DLD-1) que a indução da HEOX-1 por nitroprussiato de sódio (SNP) ocorre via ativação de ambos: elemento responsivo ao cádmio (CdRE) e proteína ativadora 1 (AP-1).

Thorup e cols. (1999) verificaram em artérias preglomerulares de ratos Sprague-Dawley que baixos níveis de CO produz vasorelaxamento e liberação de NO, enquanto que CO em altas concentrações (acima de 1 μ M) começa a inibir a atividade da eNOS diminuindo a produção de NO.

A indução da atividade da HEOX-1 pelo NO e a inibição da óxido nítrico sintase pelo CO parece ser de significância fisiológica para manutenção da homeostase vascular.

Outro aspecto de regulação da HEOX refere-se a inibição de sua atividade por meio de substâncias denominadas metaloporfirinas que são produzidas sinteticamente e representam uma classe de compostos onde, no

lugar do átomo de ferro do anel heme há outro metal inserido. Esta substituição do ferro pode ser por cobalto, zinco, estanho e outros (Mitrione, 1988). Estes compostos foram identificados como inibidores competitivos da HEOX.

Metaloporfirinas, como zinco protoporfirina IX (ZnPP IX) e zinco deuteroporfirina bis-glicol (ZnDPBG), são alguns dos inibidores eficientes da atividade da HEOX e são amplamente utilizadas em estudos que investigam o efeito dos produtos da atividade da HEOX, como, por exemplo, sobre a pressão arterial (Johnson, 1995; Rodgers, 1996). Na literatura é descrito um efeito inibitório do ZnPP IX sobre a guanilato cilcase e a óxido nítrico sintase dose-dependente, no entanto Maines (1996) relata que ZnPP IX na concentração de 100 μ mol não interfere com a atividade da óxido nítrico sintase. ZnPP IX não é somente uma arma farmacológica, mas é também uma substância endógena que é formada quando zinco substitui o ferro na protoporfirina, reação catalisada pela ferroquelatase. Sua concentração plasmática tem sido mostrada ser de até 53 μ g/dL (Marks, 1994). Zinco protoporfirina IX também é utilizado no tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal (Labbé, 1999).

As informações retro-mencionadas, permitem conjecturar que a via heme-heme oxigenase pode interferir na regulação da pressão arterial. Neste sentido, alguns estudos indicam que esta conjectura parece ser verdadeira.

Sacerdoti e cols. (1989) constataram uma correlação inversa entre a atividade da HEOX e níveis pressóricos em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), animal modelo de hipertensão essencial (Sacerdoti, 1989). Estes autores demonstraram em seu trabalho que estimulando a HEOX com cloreto de estanho, em ratos SHR jovens, há uma diminuição dos altos níveis de citocromo P-450 redutase e uma redução no incremento dos

níveis pressóricos com a idade. A redução dos níveis de citocromo P-450 redutase deve-se a menor disponibilidade de anel heme necessário para a síntese desta enzima. O efeito anti-hipertensivo é atribuído a uma diminuição dos mecanismos pressores mediados pelos produtos da citocromo P-450 redutase (Johnson, 1996). Em outro trabalho, que aborda o assunto, ratos SHR foram tratados cronicamente com SnCl_2 . Os animais foram divididos em três grupos: 1) um grupo tratado com SnCl_2 da 5ª a 20ª semana de idade, 2) um grupo tratado com SnCl_2 da 5ª a 13ª semana de idade e 3) um grupo controle. Observou-se que os animais tratados até a 20ª semana de idade, apresentavam níveis pressóricos menores quando comparados ao grupo controle. No segundo grupo, os níveis pressóricos na 20ª semana mantiveram-se reduzidos mesmo após a interrupção do tratamento na 13ª semana de idade. A interpretação dos autores foi de que o SnCl_2 estimula a atividade da enzima HEOX e reduz os níveis de citocromo P-450 redutase resultando em menor formação de metabólitos vasoconstritores do ácido araquidônico (AA) e maior produção de CO (vasodilatador) resultando na redução da pressão (Escalante, 1991).

Johnson e cols. (1995) avaliaram o efeito agudo da inibição da atividade da HEOX na pressão arterial em ratos Sprague-Dawley machos acordados. ZnDPBG e ZnPP IX, inibidores da atividade da HEOX, induziram aumento na pressão arterial paralelamente com o aumento na resistência periférica, que pode ser consequência da diminuição de CO. Constatou-se também que o sistema nervoso autônomo participa do mecanismo pressor devido a inibição de HEOX por ZnDPBG, visto que o pré-tratamento com clorisondamina ou prazosin preveniu o aumento da pressão arterial. Concluiu-se que o CO do metabolismo de heme exerce uma influência contra-regulatória sobre o mecanismo autonômico que promove elevação da pressão arterial.

Em 1996 Johnson e cols. (1996) estudaram o efeito do maior aporte de substrato da HEOX sobre os níveis pressóricos em ratos hipertensos e normotensos. Neste estudo foi demonstrado que a administração de heme L-arginato e heme L-lisinato diminui a pressão arterial em ratos hipertensos, mas não em normotensos. Esta ação vasodepressora da HEOX é prevenida pela administração de ZnDPBG, sugerindo que a ação depressora é devida a ação da enzima. O pré tratamento com deferoxamina (quelante de ferro) e biliverdina não modificou a pressão arterial. Portanto, é provável que a ação vasodepressora decorrente da estimulação da HEOX é mediada pelo CO.

Nós verificamos, recentemente, o efeito da inibição aguda da heme oxigenase com ZnPP IX sobre a pressão arterial de ratos Wistar machos, com 12 semanas de idade, recebendo dieta hipossódica (0,15% de NaCl), normossódica (1,3% de NaCl) ou hipersódica (8% de NaCl) desde o desmame, com 21 dias de vida (Santos, 1998). Para isto a pressão arterial foi medida antes e após a administração do inibidor da HEOX ou de veículo (Na_2CO_3).

Em resposta ao ZnPP IX, os ratos submetidos à sobrecarga salina apresentaram uma significativa diminuição dos níveis pressóricos, enquanto que os animais que recebiam dieta hipo e normossódica apresentaram aumento dos níveis pressóricos. Uma correlação negativa entre a pressão arterial basal (antes da administração de ZnPP IX) e o efeito da inibição de HEOX foi constatada. Em outras palavras, parece que a elevação pressórica está envolvida nesta resposta, e pode estar ou não vinculada ao conteúdo de sal na dieta, porque na correlação negativa, independente do conteúdo de sal na dieta, pressão arterial basal elevada respondia á inibição da HEOX com uma queda da pressão arterial. Concluímos assim, que a resposta pressórica à inibição da HEOX é modulada pela pressão arterial basal. Makita e cols. (1994) realizaram um estudo onde eles administraram uma sobrecarga de

sal (8% de NaCl por 37 dias) a ratos Sprague-Dawley (SD), Dahl sal-resistente (DR) e Dahl sal-sensível (DS) machos. Neste estudo foi possível verificar que o sal provoca um aumento, de cerca de 6 a 7 vezes, na excreção urinária dos metabólitos vasodilatadores da degradação do AA por meio da via do citocromo P-450 renal nos ratos SD e DR, mas não nos ratos DS. Tais metabólitos são o ácido 14,15-epoxieicosatrienóico (EET) e ácido dihidroxieicosatrienóico (DiHTE). Os autores propõem que estes metabólitos fazem parte de uma resposta adaptativa do rim à um excesso de ingestão de sal. Este pode ser um dos mecanismos pelo qual os ratos DR e SD sejam resistentes à administração de sobrecargas de sal.

Alguns estudos recentes (Da Silva, 1994 e Ishizaka, 1997) mostraram uma ativação da heme oxigenase induzida por incrementos da pressão obtidos de maneiras diversas. A estimulação da HEOX promove consumo de anel heme (Escalante, 1991). A falta de heme pode repercutir sobre a função de diversas hemeproteínas. Entre estas hemeproteínas encontram-se a epoxigenase e a hidroxilase (pertencentes à família do citocromo P-450). Permitimo-nos conjecturar que em consequência da falta do anel heme, poderia ocorrer uma síntese preferencialmente diminuída de compostos vasodilatadores, tais como EETs e DiHTEs. Baseado nesta hipótese, pode-se imaginar que em se revertendo a falta de heme, ocorra queda da pressão arterial.

OBJETIVOS

O nosso objetivo foi verificar se em outros modelos de hipertensão e hipotensão experimental, a pressão arterial basal também modula a resposta à inibição da heme oxigenase, e qual a participação do citocromo P-450 (hidroxilase e epoxigenase) neste mecanismo.

MÉTODOS

1) Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 12 semanas de idade provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes animais receberam dieta normossódica (grupo NO - 0,5% de NaCl, Nuvital - Paraná, Brasil) ou hipersódica (grupo HR - 8% de NaCl - Harlan Teklad, Madison - WI /USA) desde o desmame.

Os ratos foram acondicionados em gaiolas com 5 animais, recebendo ração e água potável "ad libitum", em ambiente mantido a 25°C, com ciclos noite-dia fixos (12/12 Horas).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

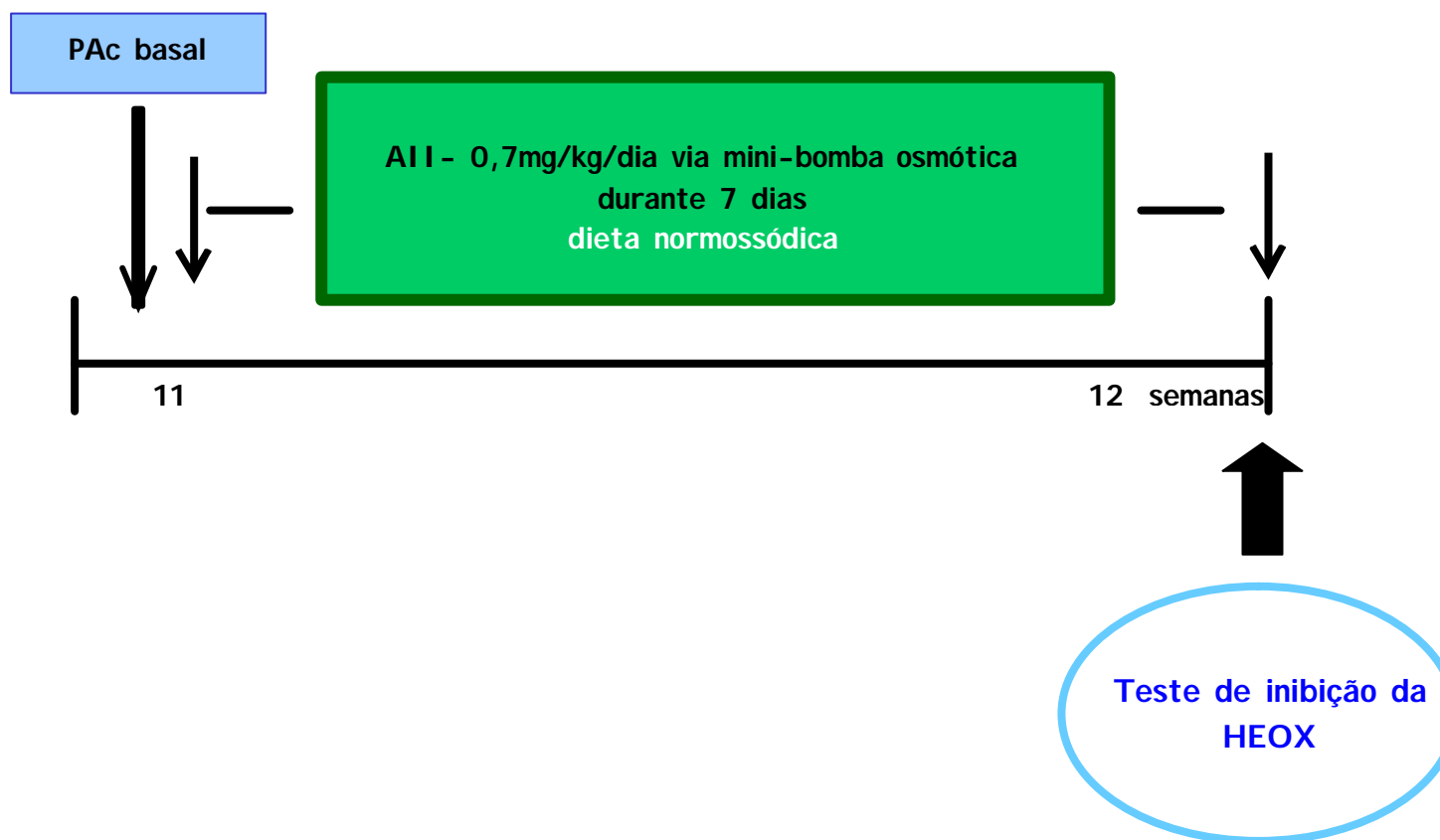
2) Grupos estudados

2.1) Modelo 1 - hipertensão arterial crônica

Mini-bombas osmóticas (Alzet model 2002; Alza Corp., Palo Alto, CA) contendo Angiotensina II (AII - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri - USA) foram implantadas na região dorsal do animal. A velocidade de infusão foi de 0,7 mg.kg⁻¹.d⁻¹. O grupo controle foi submetido à um procedimento cirúrgico idêntico mas sem implantação da mini-bomba osmótica.

A pressão arterial caudal foi verificada antes da realização do teste de inibição da HEOX para constatação de que houve aumento da pressão.

Figura 2- Modelo 1 de Hipertensão arterial crônica

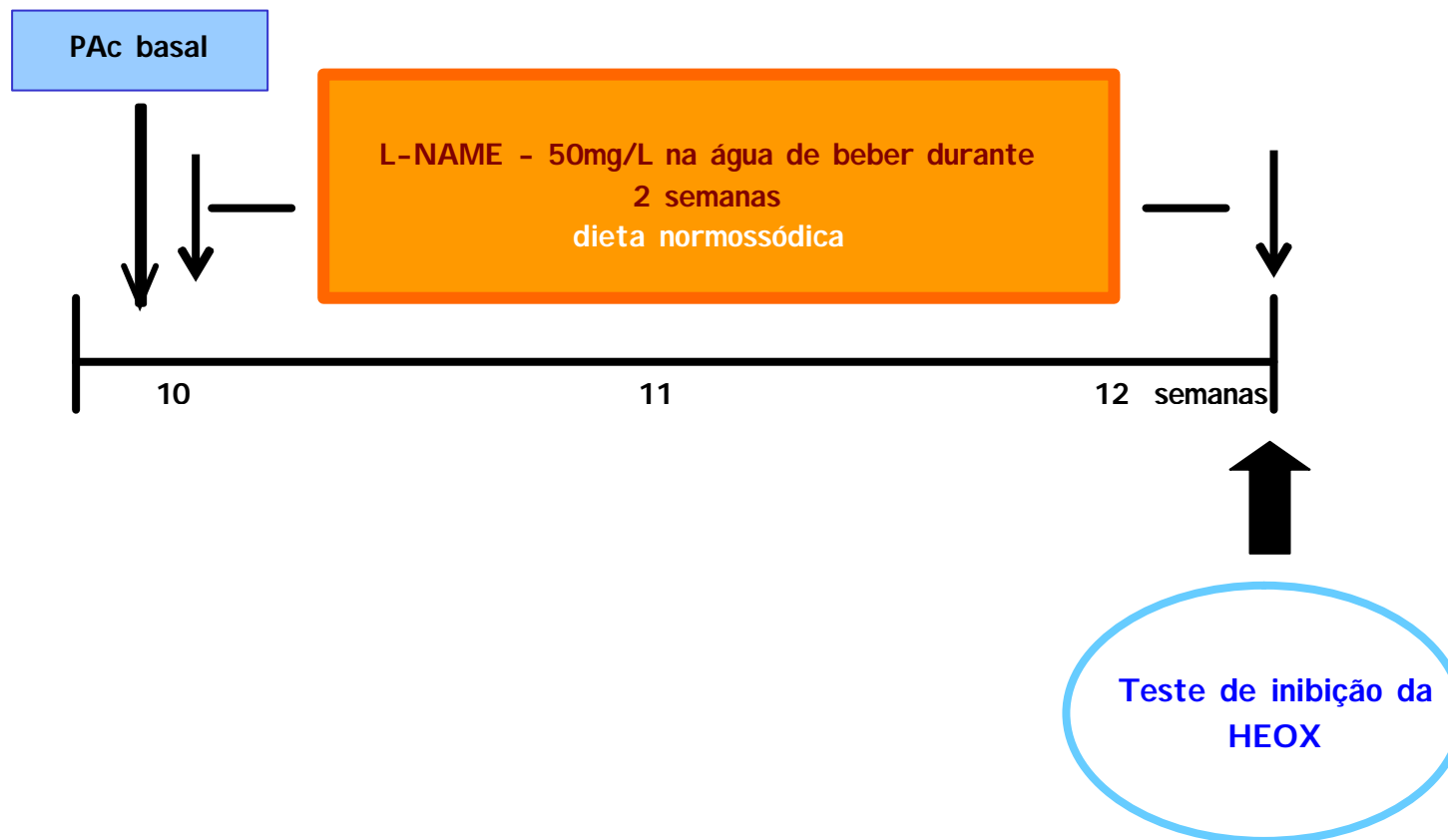


2.2) Modelo 2 - hipertensão arterial crônica

L^ω-nitro L-arginina metil éster (L-NAME - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri - USA), inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), foi fornecido aos animais na água de beber (50mg/L) ao longo de duas semanas.

A pressão arterial caudal foi verificada antes da realização do teste de inibição da HEOX para verificação de que houve aumento da pressão.

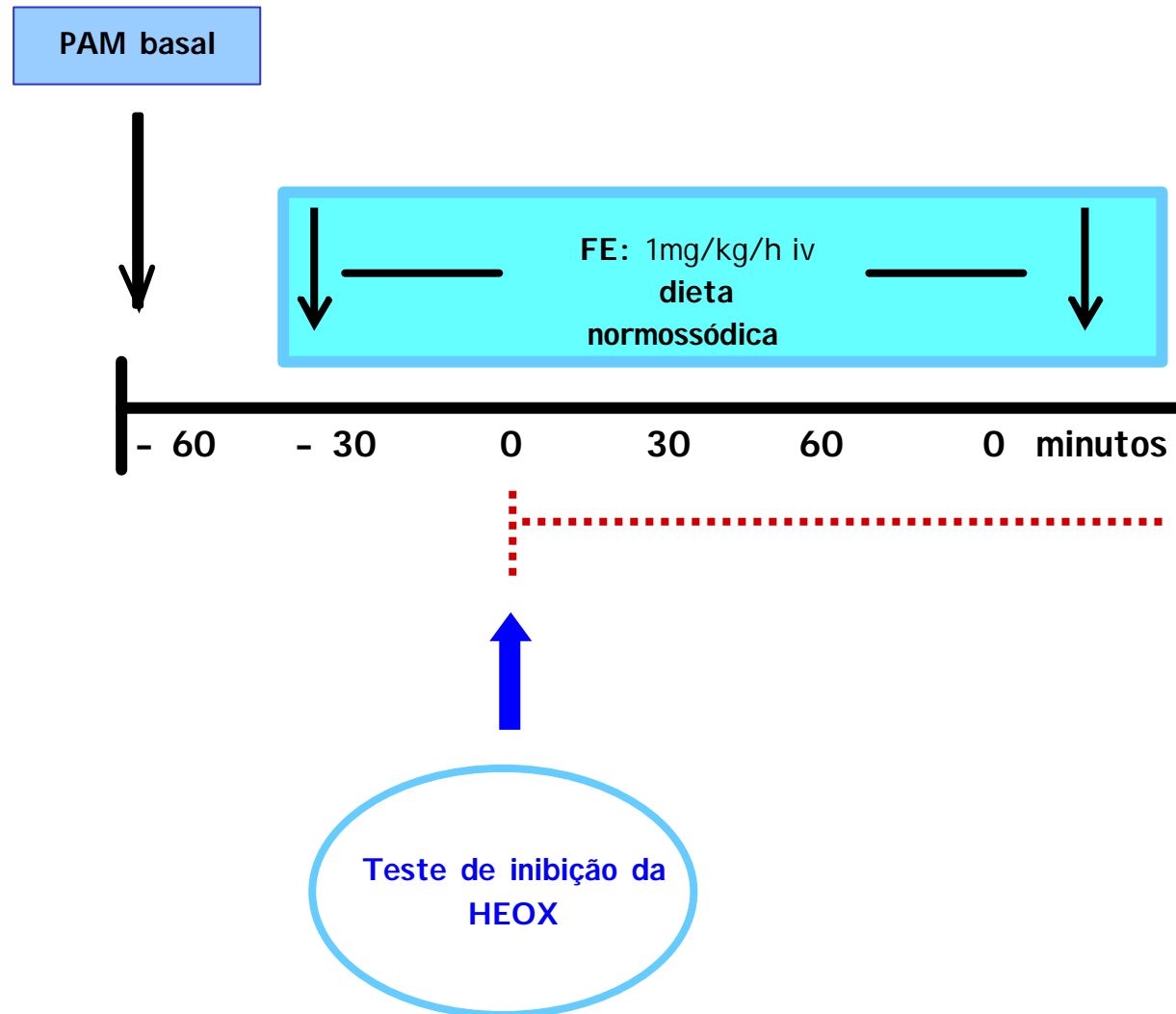
Figura 3 - Modelo 2 de Hipertensão arterial crônica



2.3) Modelo 3 - hipertensão arterial aguda

Em alguns experimentos foram realizados testes com a elevação aguda da pressão arterial. Para isto utilizamos a fenilefrina (FE - 1 mg.kg⁻¹.h⁻¹ iv - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri - USA) que foi infundida a partir de 30 minutos antes e ao longo de 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo (Na₂CO₃ -150μml/kg).

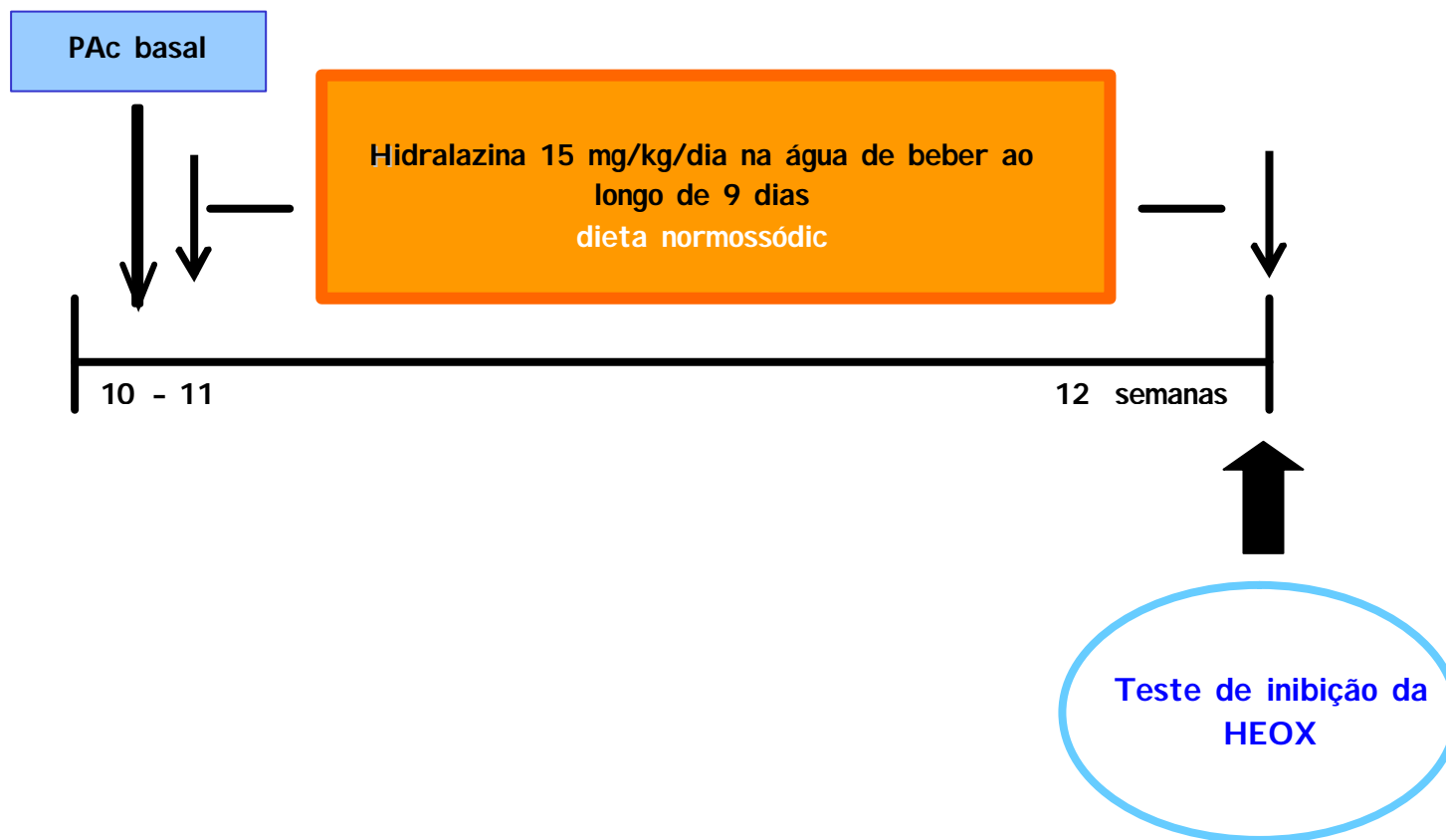
Figura 4 - Modelo 3 de Hipertensão arterial aguda



2.4) Modelo 4 - hipotensão arterial crônica

Para redução crônica da pressão arterial, hidralazina ($15 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ - doado pela Novartis Biociências S/A - São Paulo, SP/Brasil) foi diluída na água de beber, durante 9 dias. A pressão arterial caudal foi verificada antes da realização do teste de inibição da HEOX.

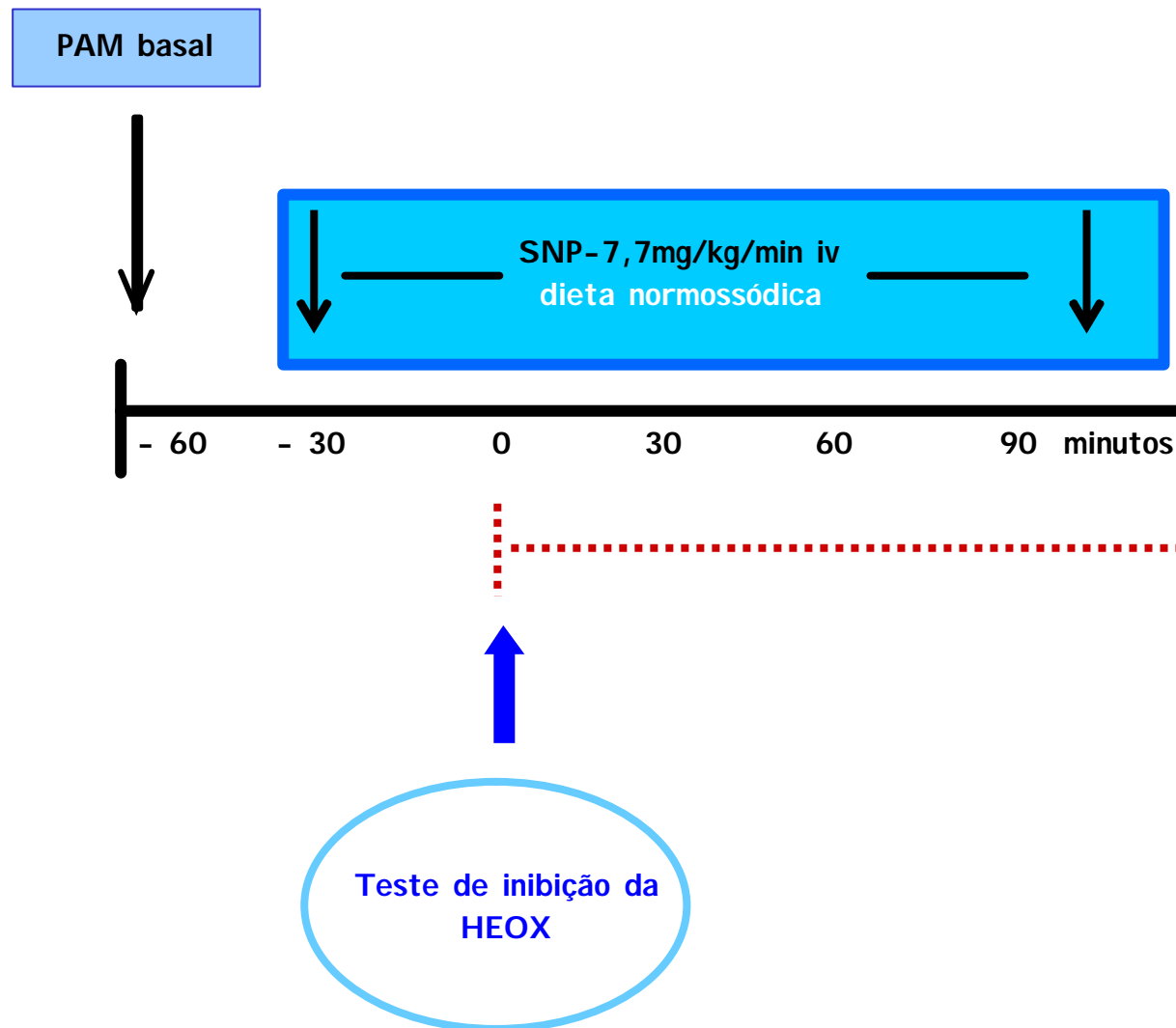
Figura 5 - Modelo 4 de Hipotensão arterial crônica



2.5) Modelo 5 - hipotensão arterial aguda

Para redução aguda da pressão arterial foi utilizado nitroprussiato de sódio (SNP $7,7\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ iv - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri - USA) que foi infundida a partir de 30 minutos antes e ao longo de 90 minutos após a administração de ZnPP I X ou veículo (Na_2CO_3 - $150\mu\text{mol}/\text{kg}$).

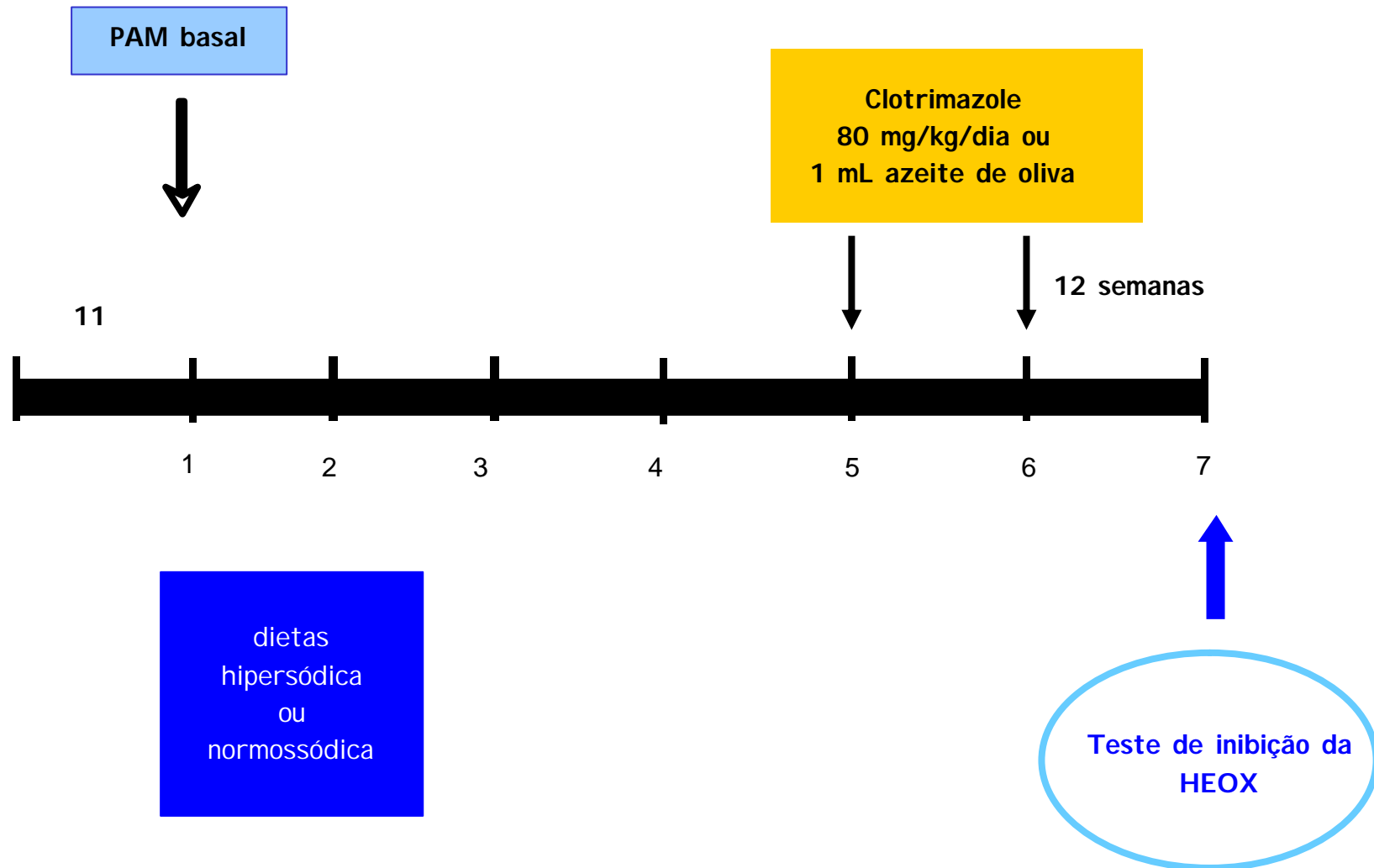
Figura 6 - Modelo 5 de Hipotensão arterial aguda



3) Avaliação da participação do Citocromo P-450 (hidroxilase e epoxigenase) nos mecanismos da resposta da pressão arterial à inibição da HEOX

Os animais receberam dieta normo ou hipersódica e foram tratados com clotrimazole, inibidor da epoxigenase ($80 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot 24 \text{ horas}^{-1}$ - ip - Medisca Inc. - New York, USA) ou veículo (azeite de oliva 1 mL/24 horas - ip) durante dois dias consecutivos antes do teste de inibição da heme oxigenase.

Figura 7 - Participação do Citocromo P-450

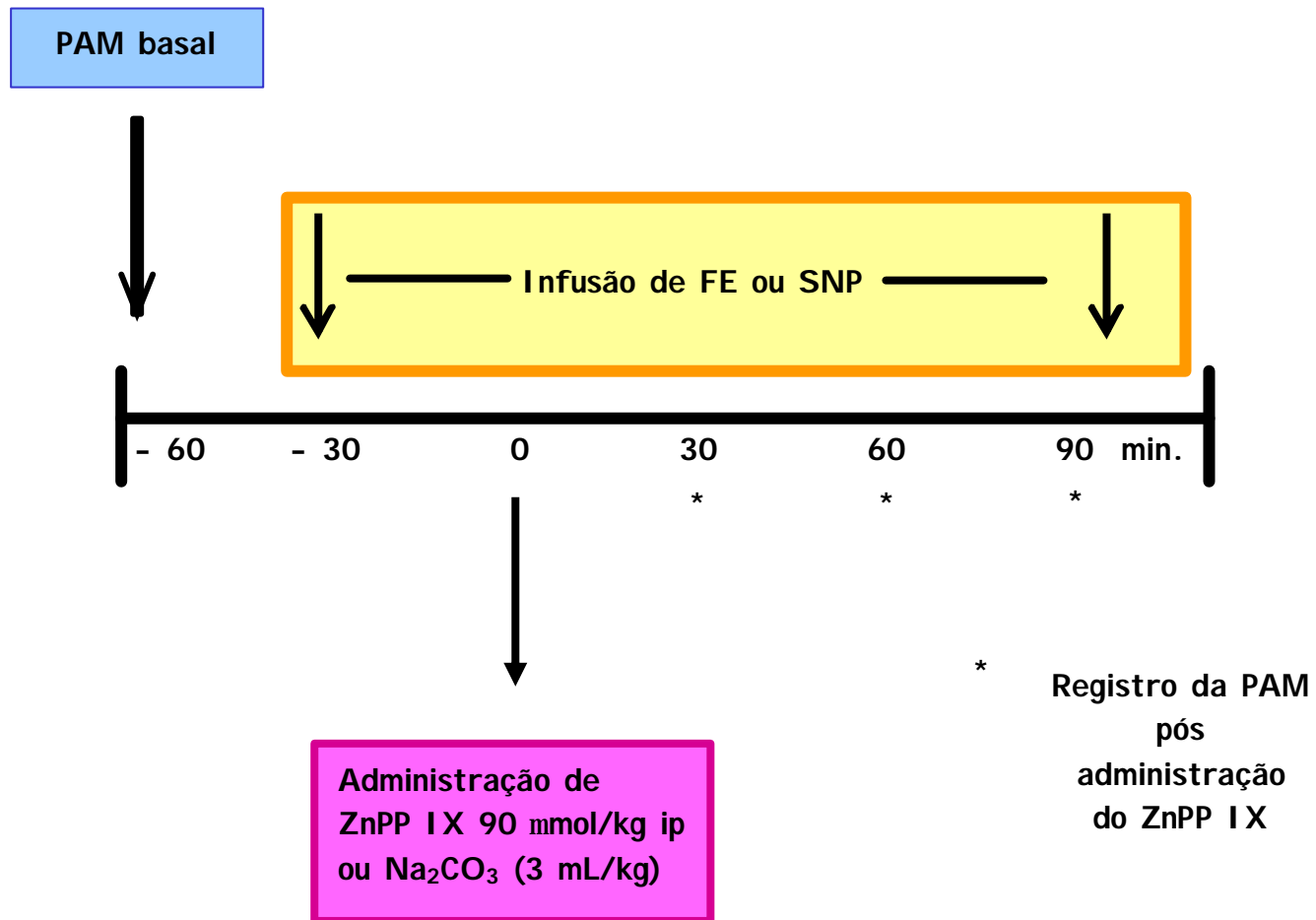


4) *Teste da inibição da HEOX*

O teste de inibição da HEOX foi realizado em animais conscientes e sem restrição ao movimento.

A inibição aguda da heme oxigenase foi realizada nos seis grupos descritos acima. Zinco Protoporfirina IX (Porphyrin Products Inc., Logan - Utah) foi administrada agudamente na dose de 90 $\mu\text{mol/kg}$ ip diluído em solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 - 50 mmol/L - Labsynth Produtos para Laboratório Ltda - Diadema, SP -). Os animais controle receberam veículo (Na_2CO_3) em volume igual ao do inibidor (3mL/kg). A pressão na artéria carótida foi medida continuamente desde 30 minutos antes até 90 minutos após a administração do inibidor ou do veículo.

Figura 8 - Teste de inibição da Heme Oxigenase



5) Medidas e dosagens

5.1) Pressão arterial caudal (PAC)

A pressão arterial caudal foi medida por método oscilométrico (Zatz, 1990), sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial média. As medidas foram realizadas em animais acordados. Foram consideradas apenas aquelas medidas obtidas sem movimentação considerável do animal. O valor final da PAC representa a média de seis medidas.

A PAC foi medida naqueles grupos submetidos a hipertensão e hipotensão crônica e no grupo citocromo P-450.

5.2) Implantação de cateteres e medida da pressão intra-arterial

Um cateter de polietileno PE-50 (Intramedic Inc, USA) foi introduzido na artéria carótida e na veia jugular esquerdas sob anestesia com éter. Os cateteres foram exteriorizados entre as escápulas e preenchidos com uma solução salina com heparina (500U/ml -Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A - Rio de Janeiro, RJ). Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas individuais, havendo total liberdade à movimentação. O período de recuperação do animal foi de 3-5 dias. O cateter da artéria carótida foi utilizado para medida da pressão arterial e o da veia jugular para infusão de soluções.

Para medida contínua da pressão arterial o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Gould Sthatan Instruments Inc., modelo P23DB, Hato Rey, Puerto Rico - USA) que estava acoplado à um

amplificador (Stemtech Inc., GPA-4 modelo 2, Wisconsin, USA). O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para digital e analisado através do programa CODAS (DATAQ Instruments Inc., Ohio, USA).

A medida de pressão intra-arterial foi realizada nos modelos de hipertensão e hipotensão arterial aguda e crônica e no grupo citocromo P-450. Nos grupos aonde ocorreram infusão aguda de SNP ou PE foi aguardado um período de estabilização de 30 minutos e após este período é que a pressão arterial média foi registrada.

6) *Peso*

O peso foi avaliado antes da cirurgia e no dia do teste de inibição da heme oxigenase naqueles animais submetidos a cateterização. Nos animais submetidos apenas a medida da PAc o peso foi avaliado apenas no dia do teste de inibição da HEOX.

7) *Atividade de Renina Plasmática*

A atividade de renina plasmática (ARP) foi determinada no grupo AI I e controle por radioimunoensaio, utilizando-se kit comercial (INCSTAR Corporation – Stillwater, MN, USA).

8) *Análise estatística*

Todos os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Utilizou-se o teste "t" de Student para comparar duas médias e a análise de variância de um fator (One-way ANOVA) com medidas repetidas foi usada como forma de avaliar as diferenças entre três ou mais médias. O pós-teste utilizado foi o de Dunnett para múltiplas comparações.

RESULTADOS

1. Pressão Arterial Média

O tratamento com angiotensina (AII) modificou a pressão arterial média (PAM) dos animais sob dieta normossódica após sua infusão ao longo de 7 dias [PAM_{basal} CONTROLE 119±8 - PAM_{basal} AII 157±15 mmHg, p=0,0224]. A administração do inibidor da heme oxigenase (ZnPP IX) nos animais tratados com AII provocou queda da PAM ao longo do 90 minutos de observação [PAM: 30 min 135±20, 60 min 126±14, 90 min 110±3 mmHg, p<0,05 - figura 9]. Nos animais submetidos à cirurgia fictícia após a administração do ZnPP IX não houve modificação da pressão arterial ao longo do tempo [PAM: 30 min 129±8, 60 min 119±14, 90 min 112±15 mmHg, p>0,05 - figura 9].

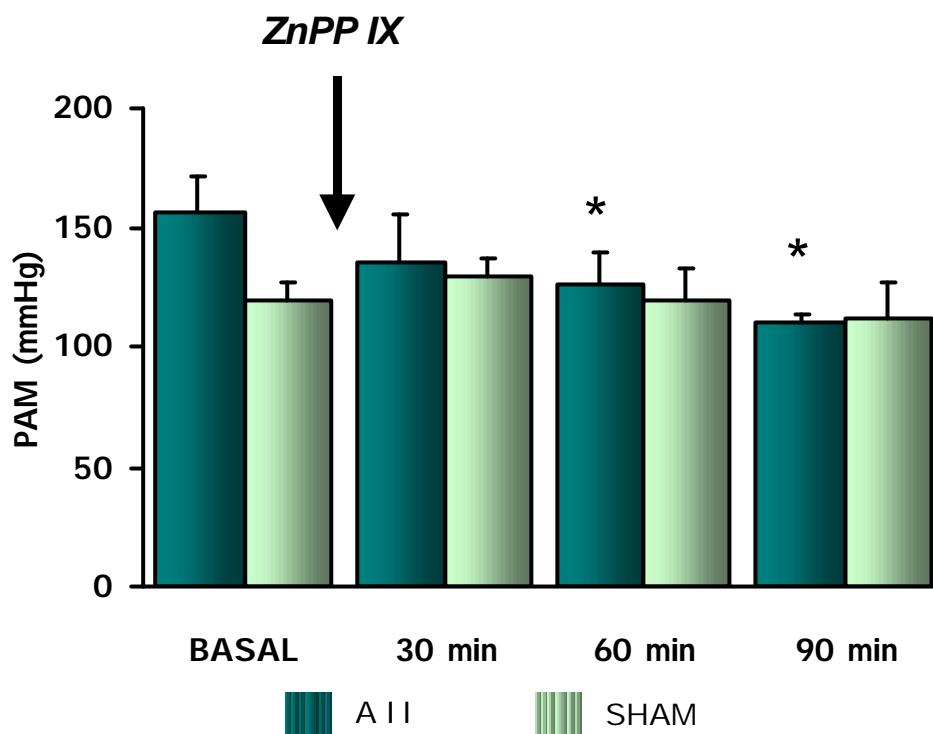


Figura 9. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica após a infusão de angiotensina II (AII) ou cirurgia fictícia de implantação de mini-bomba (Controle) e antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX) ou veículo (carbonato de sódio). Dados apresentados como média±desvio padrão. n=3 no grupo ZnPP IX e n=3 no grupo controle. *p<0,05 vs. basal do grupo ZnPP IX.

O tratamento crônico com L-NAME elevou os níveis pressóricos dos animais sob dieta normossódica no grupo experimental (ZnPP IX) [$PAC_{antes\ L-NAME}$ 123 ± 4 - PAM_{L-NAME} 170 ± 12 mmHg - figura 10] e no grupo controle (veículo) [$PAC_{antes\ L-NAME}$ 116 ± 10 - PAM_{L-NAME} 165 ± 16 mmHg - figura 10]. Estes resultados não foram analisados estatisticamente, uma vez que os métodos utilizados para medida de pressão antes e após L-NAME foram diferentes. No entanto, a resposta da pressão ao L-NAME foi biologicamente relevante.

A administração de ZnPP IX diminuiu a pressão arterial após 60 minutos [PAM : $30\ min - 159\pm 25$, $60\ min - 130\pm 25$, $90\ min - 138\pm 15$ mmHg, $p < 0,05$ - figura 10]. Já o grupo que recebeu veículo não sofreu alteração nos níveis pressóricos [PAM : $30\ min - 175\pm 13$, $60\ min - 171\pm 15$, $90\ min - 174\pm 21$ mmHg, $p > 0,05$ - figura 10].

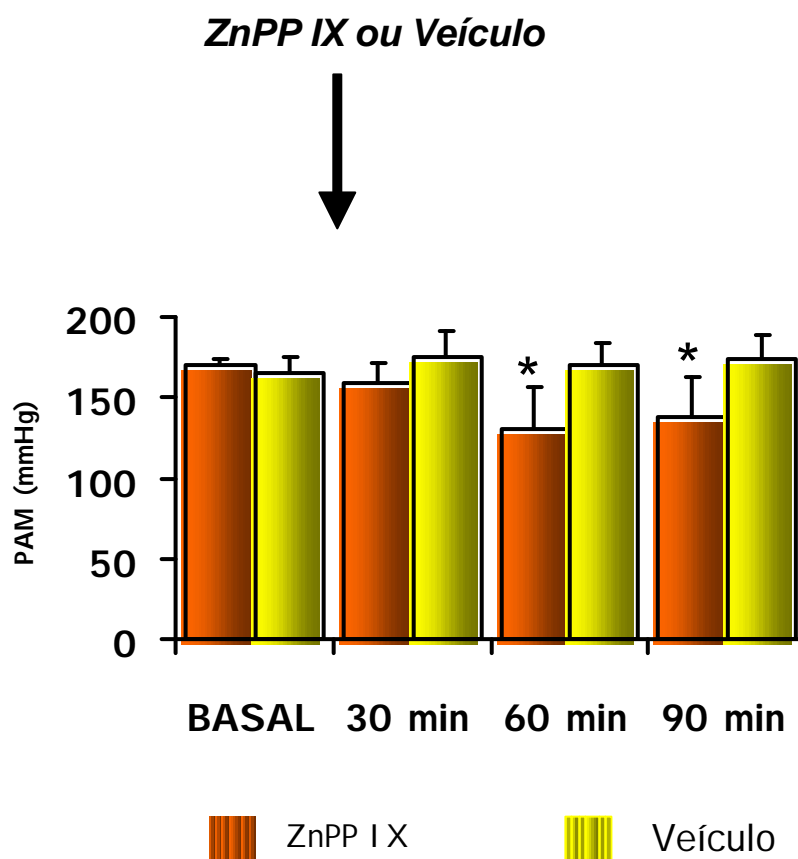


Figura 10. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica tratados cronicamente com L-NAME (L^ω-nitro L-arginina metil éster) antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX) ou veículo (carbonato de sódio). Dados apresentados como média±desvio padrão. n=5 no grupo ZnPP IX e n=5 no grupo Veículo. *p<0,05 vs. Basal do grupo ZnPP IX.

O tratamento com fenilefrina aumentou a PAM nos ratos sob dieta normossódica [$PAM_{\text{antes PE}} 122 \pm 9$ - $PAM_{\text{basal PE}} 155 \pm 31$ mmHg, $p < 0,05$ - figura 11]. A administração de inibidor da HEOX provocou queda da PAM ao longo dos 90 minutos de experimento [PAM: 30 min 127 ± 12 , 60 min 124 ± 18 , 90 min 123 ± 15 mmHg, $p < 0,05$ - figura 11]. Nos animais controle a FE também aumentou a PAM [$PAM_{\text{antes FE}} 108 \pm 14$ - $PAM_{\text{basal FE}} 148 \pm 17$ mmHg, $p < 0,05$ - figura 11]. A administração do veículo não modificou a PAM ao longo do tempo [PAM: 30 min 132 ± 16 , 60 min 139 ± 16 , 90 min 139 ± 25 mmHg, $p > 0,05$ - figura 11].

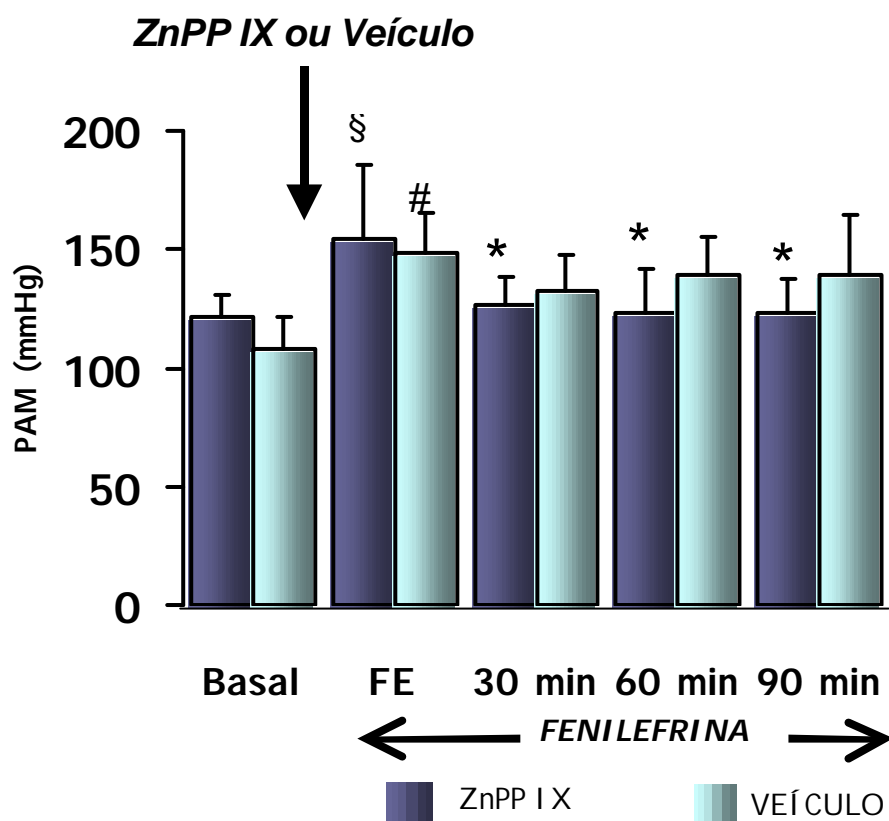


Figura 11. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica antes e após início de infusão de fenilefrina (FE) e antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX) ou veículo (carbonato de sódio). Dados apresentados como média±desvio padrão. n=14 no grupo ZnPP IX e n=7 no grupo veículo. §p<0,05 vs. Basal do grupo ZnPP IX, #p<0,05 vs. Basal do grupo veículo e *p<0,05 vs. FE do grupo ZnPP IX.

O tratamento crônico com hidralazina diminuiu os níveis pressóricos dos animais sob dieta normossódica no grupo experimental (ZnPP I X) [$PAC_{\text{antes hidralazina}} 136 \pm 3$ - $PAM_{\text{hidralazina}} 114 \pm 7$ mmHg, $p=0,0133$ - figura 12] e no grupo controle (veículo) [$PAC_{\text{antes hidralazina}} 113 \pm 8$ - $PAM_{\text{hidralazina}} 102 \pm 6$ mmHg, $p=0,006$ - figura 12]. Estes resultados não foram analisados estatisticamente, uma vez que os métodos utilizados para medida de pressão antes e após hidralazina foram diferentes.

A administração de ZnPP I X ou veículo não alterou a pressão arterial ao longo dos 90 minutos de observação [ZnPP I X: PAM: 30 min - 122 ± 4 , 60 min - 115 ± 13 , 90 min - 124 ± 16 mmHg, figura 12]; [Veículo: PAM: 30 min - 105 ± 10 , 60 min - 107 ± 7 , 90 min - 108 ± 08 mmHg, figura 12].

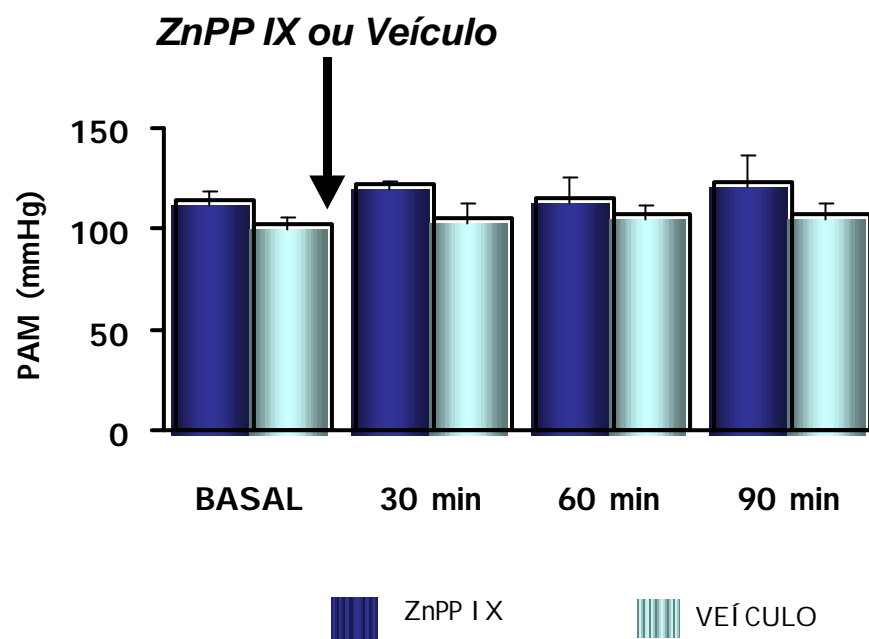


Figura 12. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica tratados cronicamente com hidralazina antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX) ou veículo (carbonato de sódio). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. n=3 no grupo ZnPP IX e n=4 no grupo Veículo.

Nos animais sob dieta normossódica, foi observada uma queda nos níveis pressóricos logo após a infusão de nitroprussiato de sódio (SNP) [$PAM_{antes\ SNP} 113 \pm 9$ - $PAM_{basal\ SNP} 82 \pm 10$ mmHg, $p < 0,05$ - figura 13]. Esta queda manteve-se ao longo do experimento no grupo onde foi administrado ZnPP IX [PAM: 30 min 87 ± 15 , 60 min 83 ± 14 , 90 min 85 ± 15 mmHg, $p < 0,05$ figura 13] e no grupo veículo [$PAM_{antes\ SNP} 114 \pm 13$ - $PAM_{basal\ SNP} 95 \pm 15$ mmHg, $p < 0,05$ - figura 13] também não houve alteração da PAM [PAM: 30 min 92 ± 17 , 60 min 97 ± 17 , 90 min 95 ± 18 mmHg, $p > 0,05$ - figura 13].

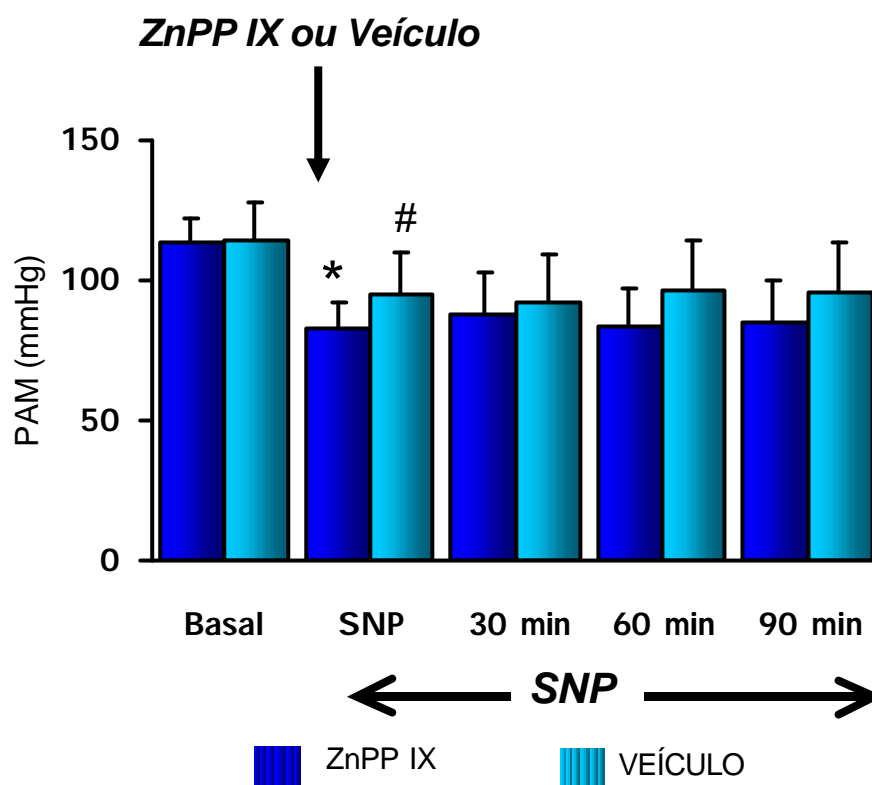


Figura 13. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica antes e após início de infusão de SNP (nitroprussiato de sódio) e antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX) ou veículo (carbonato de sódio). Dados apresentados como média±desvio padrão. n=13 no grupo ZnPP IX e n=6 no grupo veículo. *p<0,05 vs. Basal do grupo ZnPP e #p<0,05 vs. Basal do grupo Veículo.

Nos animais sob dieta normossódica o clotrimazole (CLOT) não modificou de forma importante os níveis pressóricos [$PAC_{antesCLOT}$ 115 ± 15 – PAM_{CLOT} 108 ± 19 mmHg – figura 14]. Azeite de oliva (veículo do clotrimazole - AZEITE) interferiu com o nível pressórico [$PAC_{antes azeite}$ 104 ± 5 – PAM_{azeite} 117 ± 5 mmHg – figura 14]. Assim como no grupo submetido a tratamento com L-NAME, não realizamos a análise estatística entre os valores $PAC_{antesCLOT}$ e PAM_{CLOT} , assim como entre $PAC_{antes azeite}$ e PAM_{azeite} . Após o teste de inibição da HEOX verificamos que os animais submetidos ao tratamento com clotrimazole apresentaram uma queda pressórica ao longo dos 90 minutos, embora não tenha sido estatisticamente significativa [PAM : $30\ min$ 103 ± 9 , $60\ min$ 96 ± 13 , $90\ min$ 98 ± 12 mmHg, $p=0,0776$ – figura 14]. O grupo tratado com azeite de oliva não apresentou modificação da PAM ao longo do experimento [PAM : $30\ min$ 104 ± 22 , $60\ min$ 101 ± 26 , $90\ min$ 102 ± 23 mmHg, $p>0,05$ – figura 14].

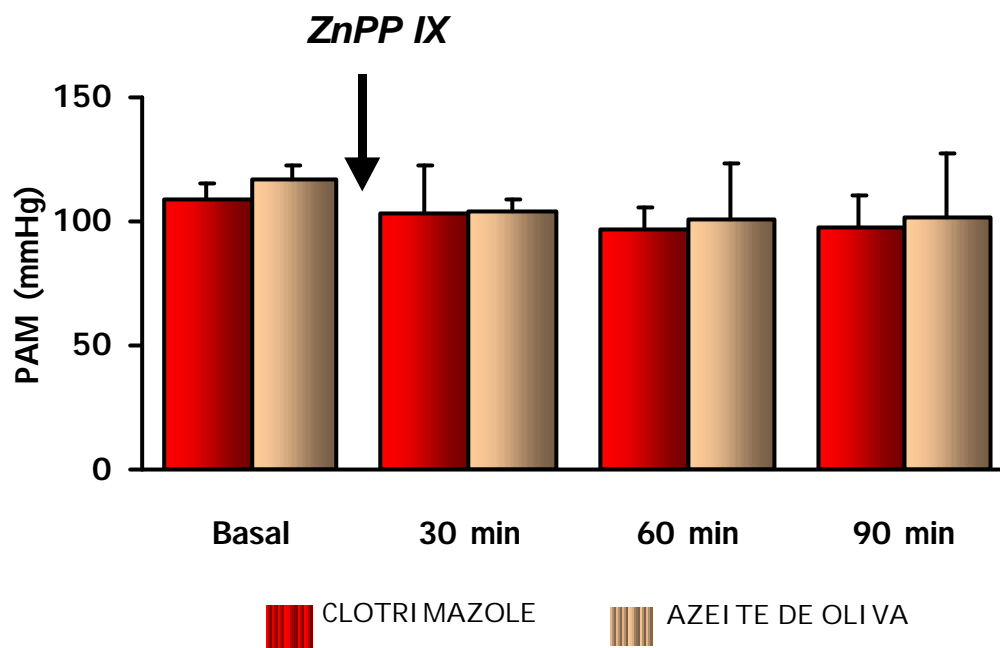


Figura 14. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta normossódica tratados com clotrimazole ou azeite de oliva (dois dias antes do teste de inibição da HEOX) antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. n=9 no grupo clotrimazole e n=3 no grupo azeite de oliva.

Nos animais sob dieta hipersódica o clotrimazole (CLOT) não modificou de forma importante os níveis pressóricos [$PAC_{antesCLOT} 150 \pm 3$ - $PAM_{CLOT} 139 \pm 24$ mmHg - figura 15]. No entanto, azeite de oliva (veículo do clotrimazole - AZEITE) reduziu o nível pressórico [$PAC_{antes azeite} 141 \pm 7$ - $PAM_{azeite} 112 \pm 6$ mmHg - figura 15]. Assim como no grupo submetido a tratamento com L-NAME, não realizamos a análise estatística.

Após o teste de inibição da HEOX verificamos que os animais submetidos ao tratamento com clotrimazole não apresentaram modificação dos níveis pressóricos ao longo dos 90 minutos [PAM: 30 min 138 ± 18 , 60 min 134 ± 18 , 90 min 130 ± 16 mmHg,- figura 15]. O grupo tratado com azeite de oliva também não apresentou modificação da PAM ao longo do experimento [PAM: 30 min 112 ± 7 , 60 min 107 ± 5 , 90 min 106 ± 5 mmHg - figura 15].

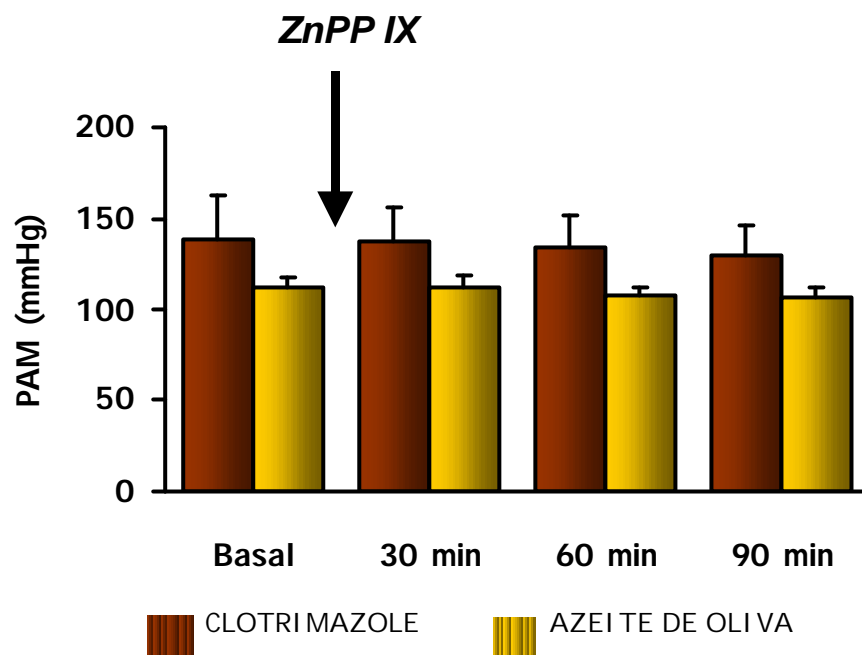


Figura 15. Pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar sob dieta hipersódica tratados com clotrimazole ou azeite de oliva (dois dias antes do teste de inibição da HEOX) antes e durante 90 minutos após a administração de ZnPP IX (zinco protoporfirina IX). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. n=5 no grupo clotrimazole e n=5 no grupo azeite de oliva

2. Pressão Arterial Caudal

Os dados destes experimentos estão representados nas tabelas 1 e 2.

Angiotensina (AII) modificou a pressão arterial caudal (Pac) dos animais sob dieta normossódica após sua infusão ao longo de 7 dias [Pac_{basal} SHAM 118±5 - Pac_{basal} AII 159±10 mmHg, p=0,0001]. A administração do inibidor da heme oxigenase (ZnPP IX) nos animais tratados com AII provocou queda da Pac ao longo do 90 minutos de experimento [Pac: 30 min 142±17, 60 min 118±13, 90 min 118±19 mmHg, p<0,05]. Nos animais submetidos a cirurgia fictícia após a administração do ZnPP IX não houve modificação da pressão arterial ao longo do tempo [Pac: 30 min 132±6, 60 min 125±10, 90 min 128±12 mmHg, p>0,05].

O tratamento crônico com L-NAME elevou os níveis pressóricos dos animais sob dieta normossódica do grupo administrado com ZnPP IX [Pac_{antes} L-NAME 122±5 - Pac_{L-NAME} 145±11 mmHg, p=0,0006] e do grupo administrado com veículo [Pac_{antes} L-NAME 111±11 - Pac_{L-NAME} 156±16 mmHg, p=0,0323].

A administração de ZnPP IX diminuiu a pressão arterial após 60 minutos [Pac: 30 min - 135±19, 60 min - 129±22, 90min - 122±17 mmHg, p<0,05]. Já o grupo sob administração de veículo não sofreu alteração nos níveis pressóricos Pac: 30 min - 162±13, 60 min - 151±11, 90 min - 151± 11 mmHg, p>0,05].

O tratamento crônico com hidralazina diminuiu os níveis pressóricos dos animais sob dieta normossódica do grupo administrado com ZnPP IX [Pac_{antes} hidralazina 133±6 - Pac_{hidralazina} 103±10 mmHg, p=0,0469] e do grupo administrado com veículo [Pac_{antes} hidralazina 131±6 - Pac_{hidralazina} 108±10 mmHg, p=0,007]. A administração de ZnPP IX ou veículo não alterou a pressão arterial ao longo dos 90 minutos de experimento [ZnPP IX: Pac: 30 min -

112 ± 10 , 60 min – 128 ± 15 , 90min – 118 ± 6 mmHg]; [Veículo PAc: 30 min – 118 ± 7 , 60 min – 130 ± 7 , 90 min – 127 ± 6 mmHg].

Nos animais sob dieta normossódica o clotrimazole (CLOT) não modificou os níveis pressóricos [$PAC_{antesCLOT} 112 \pm 9$ – $PAC_{CLOT} 112 \pm 5$ mmHg]. Azeite de oliva também não interferiu com o nível pressórico [$PAC_{antes azeite} 112 \pm 6$ $PAC_{azeite} 112 \pm 13$ mmHg]. Após o teste de inibição da HEOX verificamos que os animais submetidos ao tratamento com clotrimazole não apresentaram alteração da pressão arterial caudal ao longo dos 90 minutos, [PAc: 30 min 111 ± 11 , 60 min 111 ± 12 , 90 min 109 ± 10 mmHg]. O grupo tratado com azeite de oliva também não apresentou modificação da PAM ao longo do experimento [PAc: 30 min 111 ± 12 , 60 min 113 ± 13 , 90 min 114 ± 9 mmHg].

Nos animais sob dieta hipersódica o clotrimazole (CLOT) não modificou de forma importante os níveis pressóricos [$PAC_{antesCLOT} 136 \pm 4$ – $PAC_{CLOT} 131 \pm 12$ mmHg]. O mesmo ocorreu com o grupo azeite [$PAC_{antes azeite} 139 \pm 13$ – $PAC_{azeite} 128 \pm 23$ mmHg].

Após o teste de inibição da HEOX verificamos que os animais submetidos ao tratamento com clotrimazole não apresentaram modificação dos níveis pressóricos ao longo dos 90 minutos [PAc: 90 min 118 ± 10 mmHg]. O grupo tratado com azeite de oliva também não apresentou modificação da PAc ao longo do experimento [PAc: 90 min 127 ± 12 mmHg].

Tabela 1. Pressão arterial caudal (PAC) antes e após a administração de ZnPP I X.

GRUPOS	PRÉ-TRATAMENTO	n	BASAL	ZnPP I X		
				30min.	60 min.	90 min.
AII		5	159±10	142±17	118±13**	118±19**
CONTROLE		4	118±5*	132±6	125±10	128±12
L-NAME	122±5	7	145±11§	135±19	129±22***	122±17***
HIDRALAZINA	133±6	3	103±10§§	112±10	128±15	118±16
CLOT-NO	112±9	7	112±5	111±11	111±12	109±10
AZEITE-NO	112±6	6	112±13	111±12	113±13	114±9
CLOT-HR	136±4	3	131±12			118±10
AZEITE-HR	139±13	3	128±23			127±12

Cada valor representa a média±desvio padrão. *p=0,0001 vs. AII-Basal, **p <0,05 vs. AII - Basal, ***p<0,05 vs. L-NAME-Basal, § p=0,0006 vs. pré-tratamento com L-NAME, §§ p=0,0469 vs. pré-tratamento com hidralazina

Tabela 2. Pressão arterial caudal (Pac) antes e após a administração de veículo (Na_2CO_3).

GRUPOS	PAC	n	VEÍCULO			
	PRÉ-		BASAL	30 min.	60 min.	90 min.
TRATAMENTO						
L-NAME	111±11	4	156±16#	162±13	151±11	151±11
HI DRALAZI NA	131±6	5	108±10##	118±7	130±7	127±6

Cada valor representa a média±desvio padrão

#p=0,0323 vs. Pré-tratamento L-NAME

##p=0,007 vs. Pré-tratamento hidralazina

3. Peso

Os animais dos grupos AII, FE, SNP e CLOT-HR que no teste de inibição da HEOX foram tratados com a administração de ZnPP IX tiveram perda de peso após a intervenção cirúrgica para colocação de cateteres na artéria carótida e/ou veia jugular assim como os animais tratados com SNP e no teste de inibição receberam veículo (tabela 3).

Tabela 3. Peso corporal do animais antes e após a cirurgia para canulação da artéria carótida e/ou veia jugular.

GRUPOS	ZnPP I X		Veículo	
	Antes cirurgia	Após cirurgia	Antes cirurgia	Após cirurgia
AI I	393±25(3)	347±37*(3)	365±18(3)	342±17(3)
L-NAME	369±37 (6)	364±43 (6)	391±19 (9)	387±22 (9)
FE	411±42 (14)	385±48**(14)	381±38 (7)	363±39 (7)
HI DRALAZI NA			390±14(4)	391±27(4)
SNP	368±30 (13)	350±38*** (13)	372±23 (6)	357±18(6)****
CLOT-NO	366±19(9)	369±31(9)		
AZEI TE-NO				
CLOT-HR	385±63 (5)	369±58 # (5)		
AZEI TE-HR	371±62 (5)	334±38 (5)		

Cada valor representa a média±desvio padrão. O número de animais está indicado entre parênteses.

*p=0,0042 vs. AI I -ZnPP I X antes cirurgia, **p<0,0001 vs. FE-ZnPP I X antes cirurgia, p=0,0453 vs. SNP-ZnPP I X antes cirurgia, ****p=0,0383 vs. SNP-Veículo antes cirurgia, #p<0,05 vs CLOT -HR-ZnPP I X.

Naqueles grupos de animais onde a PAc foi avaliada, apenas no grupo L-NAME houve diferença de peso entre o grupo ZnPP IX e o grupo veículo (tabela 4).

Tabela 4. Peso corporal do animais antes e após o teste de inibição da HEOX cuja pressão arterial foi realizada pelo método oscilométrico (PAc).

GRUPOS	ZnPP IX	CONTROLE
AI I	333±25 (4)	334±27 (4)
L-NAME	313±33* (7)	374±26 (4)
HI DRALAZI NA	306±27 (6)	306±13 (5)
CLOT-NO	330±36 (7)	358±28 (6)
CLOT-HR	307±28 (5)	308±38 (5)

Cada valor representa a média±desvio padrão. O número de animais está indicado entre parênteses.

*p=0,0116 vs controle

4. Atividade de Renina Plasmática

Reduções significante na atividade de renina plasmática foram observadas no sétimo dia após infusão de AII comparado ao grupo submetido a cirurgia fictícia [ARP_{pós-AII} 0,05±0,04 ARP_{pós-fictícia} 3,5±1,8 ng/ml/h)

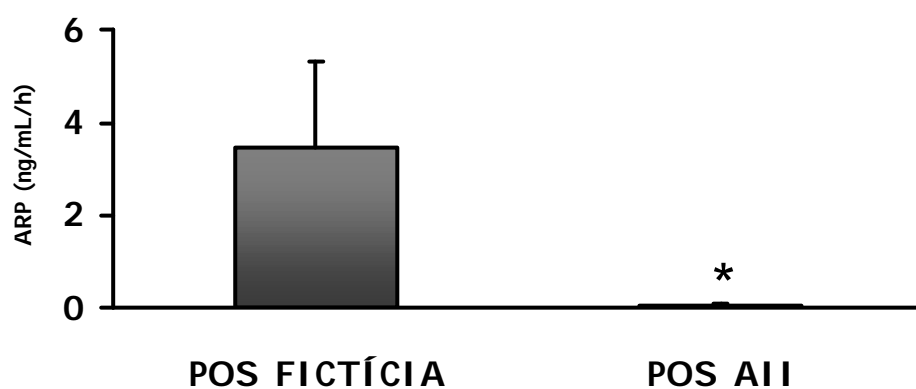


Figura 16. Atividade da renina plasmática (ARP) 7 dias após os animais terem sido submetidos a operação fictícia ou a infusão de AII por meio de mini-bomba osmótica. Cada valor representa a média±desvio padrão, n=4 em cada grupo. *p=0,0286 em comparação ao POS-FICTÍCIA.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em um estudo anterior realizado em nosso laboratório (Santos *e cols.*, 1998), sugeriram que o efeito da inibição da heme oxigenase sobre a pressão arterial depende dos níveis pressóricos prévios à inibição desta enzima. No mencionado trabalho foi avaliado o efeito da inibição aguda da heme oxigenase com ZnPP IX sobre a pressão arterial de ratos Wistar machos, com 12 semanas de idade, recebendo dieta hipossódica (0,15% de NaCl), normossódica (1,3% de NaCl) ou hipersódica (8% de NaCl) desde o desmame, com 21 dias de vida. A pressão arterial foi medida antes e após a administração do inibidor da HEOX ou de veículo (Na_2CO_3). Em resposta ao ZnPP IX, os ratos submetidos à sobrecarga salina apresentaram uma significativa diminuição dos níveis pressóricos enquanto que nos animais que recebiam dieta hipo e normossódica, houve incremento da pressão arterial. Observamos uma correlação negativa entre a pressão arterial basal antes da administração de ZnPP IX e o efeito da inibição da HEOX sobre os níveis pressóricos, sugerindo que o sal não está envolvido nesta resposta e sim o nível pressórico basal.

Uma das questões que ficou sem resposta foi se o fenômeno observado é restrito ao modelo sobrecarga e restrição salina crônica ou se ele também ocorre em outros modelos de hiper ou hipotensão arterial.

No presente estudo, este fenômeno foi comprovado em situações nas quais foi induzida variação da pressão arterial aguda e cronicamente, sem a participação de modificações no consumo de sal na dieta. Existe uma associação inversa entre o efeito da inibição da heme oxigenase sobre a pressão arterial e os níveis pressóricos basais.

Tal fenômeno foi verificado por meio da indução de incrementos e decréscimos agudos e crônicos da pressão arterial em ratos Wistar machos

consumindo dieta normossódica.

A elevação de duração mais longa da pressão arterial foi induzida por meio de tratamento com AII ou por meio de tratamento com L-NAME e a elevação de duração menor foi obtida por meio de infusão de FE. Tanto nos grupos de ratos com incremento prolongado da pressão arterial, como naqueles com incremento de somente algumas horas, foi constatada uma queda da pressão arterial com início 60 a 90 minutos após inibição da HEOX com ZnPP I X.

Em outros grupos de ratos, também consumindo dieta normossódica, foi induzida uma redução da pressão arterial de curta duração com SNP ou de duração maior com hidralazina. Na vigência de níveis reduzidos de pressão arterial a inibição da heme oxigenase não teve efeito sobre os níveis pressóricos. Em virtude dos resultados obtidos é possível afirmar que o valor da pressão arterial que precede a inibição da HEOX interfere no efeito da inibição desta enzima sobre os níveis pressóricos, pelo menos nos modelos utilizados. Aparentemente, o fenômeno detectado nestes experimentos independe do tipo de droga empregada e da duração do tratamento. É preciso salientar, que o presente estudo é o primeiro no qual foi demonstrado que inibição da HEOX pode resultar em queda da pressão arterial. Todos os estudos anteriores, nos quais foi realizada inibição da HEOX, foram feitos em animais normotensos.

Uma característica da heme oxigenase é que tanto os produtos, como o substrato desta enzima têm efeitos biológicos e que podem até ser opostos. O substrato da enzima, o anel heme, faz parte da estrutura molecular de inúmeras substâncias, entre as quais, enzimas, cuja ação pode resultar em modificações da pressão arterial. Algumas destas enzimas, que contém na sua estrutura o anel heme, são a óxido nítrico sintase, a guanilil ciclase, a ciclo-oxigenase, enzimas da família do citocromo P450 como a

epoxigenase, a hidroxilase, etc. É conhecido da literatura que elevação da pressão arterial obtida através de alguns métodos (AII e L-NAME), aumenta a expressão de mRNA, proteína e atividade da heme oxigenase (Aizawa, 2000 e Ishizaka, 2000). A atividade aumentada da HEOX leva a um consumo aumentado do anel heme. Este consumo aumentado de heme pode interferir na formação de hemeoproteínas (guanilato ciclase, óxido nítrico sintase, epoxigenase) e que são importantes para manter a pressão arterial nos níveis de normotensão. (Escalante, 1989)

Por outro lado, o monóxido de carbono, a biliverdina e o íon ferro, produtos da ação da HEOX, também geram efeitos igualmente capazes de modificar a pressão arterial. Dito isto, é possível que a inibição da HEOX produza resultados opostos sobre a pressão arterial, conforme haja o predomínio do efeito do acúmulo do substrato ou o predomínio do efeito decorrente de menor produção dos produtos da reação. Existem algumas evidências favoráveis a estes comentários, produzidas por estudos realizados em outros laboratórios. Uma destas evidências é um estudo de Johnson e col. (1995) que avaliaram o efeito da inibição da HEOX em ratos Sprague-Dawley normotensos. Estes autores observaram um aumento da pressão arterial, cujo início se manifestou a partir de 5 minutos após a injeção intra - peritoneal de ZnDPBG. No entanto, Seki e col. (1997) mostraram em cultura de células endoteliais que a inibição da HEOX com ZnPP IX estimula a atividade da óxido nítrico sintase. Se isto ocorrer em animais intactos, poderia ser uma explicação para a queda da PA em resposta a inibição da HEOX. Por outro lado, este mecanismo não deve ser uma explicação para os resultados observados nos animais tratados com L-NAME, caso a NOS estiver totalmente bloqueada pela droga.

Os grupos de hipertensão e hipotensão crônicos assim como o grupo de participação do citocromo P-450 foram repetidos, para que fosse

realizada a coleta de tecido com o objetivo de quantificar a atividade da HEOX. Nestes grupos a pressão arterial foi avaliada através do método oscilométrico. Os resultados obtidos foram semelhantes aos mensurados através da medida direta da pressão arterial.

Experimentos adicionais foram realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na modulação do efeito da inibição da HEOX sobre os níveis de pressão arterial. O objetivo destes experimentos adicionais foi verificar se ocorreu produção aumentada de metabólitos vasodilatadores decorrentes da ação de epoxigenases sobre o ácido araquidônico. Esclarecendo melhor, a epoxigenase, enzima da família do citocromo P450, é uma heme proteína e, portanto, poderia estar ativada em decorrência do acúmulo de heme gerado pela inibição da HEOX. Para comprovar ou não esta possibilidade, foram planejados experimentos nos quais animais na vigência de sobrecarga salina crônica ou consumindo dieta com conteúdo normal de sal, previamente tratados com clotrimazole (inibidor da epoxigenase) foram submetidos a inibição da HEOX. Há que se lembrar, que em estudo anterior, já havia sido demonstrado que ratos sob sobrecarga de sal respondiam com queda da PA à inibição da HEOX. Para verificarmos se os metabólitos vasodilatadores produzidos pela epoxigenase estavam ou não envolvidos nesta resposta, nós inibimos a HEOX naqueles animais pré-tratados com clotrimazole. Nestes animais não houve modificação da pressão arterial em resposta à inibição da HEOX. Este resultado sugere que a queda da pressão arterial decorrente da inibição da HEOX nos animais sob dieta hipersódica está possivelmente relacionada com uma maior atividade da enzima epoxigenase. Ocorre que no grupo de ratos nos quais foi inibida a HEOX e que receberam o veículo do clotrimazole, a pressão arterial também não variou. Uma possível explicação para este resultado é que a pressão basal do grupo que recebeu azeite de oliva estava

dentro dos limites da normalidade, apesar da sobrecarga de sal. Talvez isto tenha ocorrido porque o azeite estimulou a atividade da epoxigenase (Miller, 1991), o que levou a uma redução da pressão. Ruiz-Gutierrez e cols. (1996) demonstraram em seu estudo que mulheres hipertensas, após 4 semanas de tratamento com dieta rica em azeite de oliva, apresentavam uma redução na pressão sistólica e diastólica. O mesmo resultado foi encontrado para ratos Dahl sensível sob dieta hipersódica (Gauguli, 1986).

Alguns comentários adicionais são pertinentes. Thorup e cols. (1999) mostraram que CO provoca contração em arteríolas aferentes justaglomerulares de rins de ratos Sprague-Dawley, devido à inibição da óxido nítrico sintase. Como já havia sido retro-mencionado, aparentemente a óxido nítrico sintase não está envolvida nos mecanismos da queda pressórica decorrente da inibição da heme oxigenase em animais com elevação da pressão arterial basal, porque no grupo L-NAME onde supõem-se que a NOS esteja totalmente inibida, a resposta foi semelhante a encontrada nos outros dois grupos AI I e FE.

De acordo com o estudo de Mori e cols. (1999), o CO inibe a via metabólica do ácido araquidônico pelo citocromo P-450, no fígado de ratos Wistar. Esta informação permite que se conjecture o seguinte: a inibição da HEOX reduz a síntese de monóxido de carbono, o que então libera a ação do citocromo P450. Esta via metabólica gera produtos vasodilatadores e vasoconstritores e que na vigência de níveis de pressão arterial elevados, predominariam os primeiros. Há que se salientar que estes comentários são mero exercício de raciocínio, mas que merecem investigação adicional.

CONCLUSÕES

1) O efeito da inibição da heme oxigenase sobre a pressão arterial varia em função dos níveis de pressão arterial existentes antes da inibição desta enzima.

2) A epoxigenase, enzima pertencente a família do citocromo P-450, parece estar envolvida na queda da pressão arterial em resposta a inibição da HEOX com ZnPP I X nos animais sob dieta hipersódica.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, N.G.; Lin, J.H.C.; Schwartzman, M.L.; Levere, R.D.; Shibahara, S.
The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.*,
20:543-558; 1988.
- Aizawa, T; Ishizaka, N; Taguchi, Ji; Nagai, R; Mori, I; Tang, SS;
Ingelfinger, JR; Ohno, M. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney
of angiotensin II-induced hypertensive rats: possible role in
renoprotection. *Hypertension*, 35:800-806; 2000.
- Da Silva, J.L.; Tiefenthaler, M.; Park, E.; Escalante, B.; Schwartzman, M.L.;
Levere, R.; Abraham, N.G. Tin-Mediated heme oxygenase gene activation
and cytochrome P450 arachidonate hydroxylase inhibition in
Spontaneously Hypertensive Rats. *Am. J. Med. Sci.*, 307:173-181;
1994.
- Deramautd, T. B.; Da Silva, J. L.; Remy, P.; Kappas, A. and Abraham, N.G.
Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial
cells by dexamethasone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222:185-193,
1999.
- Dore S.; Sampei K.; Goto S.; Alkayed N. J.; Guastella D.; Blackshaw S.;
Gallagher M.; Traystman R. J.; Hurn P. D.; Koehler R.C.; Snyder S.H.
Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol. Med.*,
5:656-663; 1999.

Escalante, D.; Sacerdoti, D.; Davidian, M.M.; Schwartzman, M.L.; McGiff, J.C. Chronic treatment with tin normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 17:776-779; 1991.

Sacerdoti, D.; Escalante, D.; Abraham, N.G.; McGiff, J.C.; Levere, R.D.; Schwartzman, M.L. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science*, 243:388-390; 1989.

Essig, D.A.; Borger, D.R.; Jackson, D.A. Induction of heme oxygenase-1 (HSP 32) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am. J. Physiol.*, 272:C59-C67; 1997.

Foresti, R.; Sarathchandra, P.; Clarck, J.E.; Green, C.J. and Motterlini, R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem. J.*, 339:729-736; 1999.

Galbraith, R. Heme oxygenase: Who needs it? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222:299-305; 1999.

Ganguli, MC; Tobian, L and Iwai, J. Reduction of blood pressure in salt-fed Dahl salt-sensitive rats with diets rich in olive oil, safflower oil or calcium biphosphate but not with calcium carbonate. *J Hypertens Suppl* 4:S168-9; 1986.

Hara, E; Takahashi, K; Takeda, K; Nakayama, M; Yoshizawa, M; Fujita, H; Shirato, K and Shibahara, S. Induction of Heme oxygenase-1 as a

response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. **Biochem. Pharmacol.** 58:227-236; 1999.

Immenschuh, S.; Ramadori, G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. **Biochem. Pharmacol.**, 60:1121-1128; 2000.

Ishizaka, N.; De Léon, H; Laursen, J.; Fukui, T.; Wilcox, J.N.; De Keulenaer, G.; Griending, K.K.; Alexander, W.R. Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. **Circulation**, 96:1923-1929; 1997.

Ishizaka, N; Aizawa, T; Mori, I; Taguchi, J; Yazaki, Y and Ohno, M. Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II. **Am. J. Physiol.**, 279:H672-H678; 2000.

Johnson R.A.; Kozma R.; Colombari, E. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32:1-14; 1999.

Johnson R.A.; Lavesa M.; Askari B.; Abraham, N.G.; Nasjletti, A. A heme oxygenase product, presumable carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. **Hypertension**, 25:166-169; 1995.

Johnson, R.A.; Lavesa, M.; DeSeyn, K.; Scholer, M.J.; Nasjletti, A. Heme oxygenase substrates acutely lower blood pressure in hypertensive rats. **Am. J. Physiol.** 271:H1132-H1138; 1996.

Kikuchi, G. and Yoshida, T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol. Cel. Biochem.* 53/54:163-183; 1983.

Labbé, R.F.; Vreman, H.J.; Stevenson, D. Zinc Protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clinical Chemistry*, 45: 2060-2072; 1999.

Maier, K.G.; Henderson, L.; Narayanan, J.; Alonso-Garcia, M.; Falck, J.R. and Roman, R.J. Fluorescent HPLC assay for 20-HETE and other P-450 metabolites of arachidonic acid. *Am. J. Physiol.*, 279:H863-871; 2000.

Maines MD: *Heme oxygenase: clinical applications and functions*. Florida, CRC Press; 1992.

Maines, MD: Carbon monoxide and nitric oxide homology: differential modulation of heme oxygenase in brain and detection of protein and activity. *Methods of Enzymology*; 268:473-488; 1996.

Makita, K., Kihito, T.; Karara, A.; Jacobson, H.R.; Falck, J.R.; Capdevila, J.H. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induced hypertension in rats fed a high salt diet. *J. Clin. Invest.*, 94:2414-2420; 1994.

Marks, G.S. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cell. Mol. Biol.*, 40:863-870; 1994.

- McCoubrey Jr., W. K.; Huang, T. J. and Maines, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.*, 247:725-732; 1997.
- McLean, M.; Bowman, M.; Clifton, V.; Smith, R. and Grossman, AB. Expression of the heme oxygenase - Carbon monoxide Signaling system in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 85:2345-2349; 2000.
- Miller, MS; Jones, AB; Chauhan, DP; Park, SS; Anderson, LM. Induction of cytochrome P-450IA1 in fetal rat liver by a single dose of 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176:280-287;1991.
- Mori, M; Suematsu, M.; Kyokane, T.; Sano, T.; Suzuki, H.; Yamaguchi, T.; Ishimura, Y. e Ishii, H. Carbon Monoxide-Mediated alterations in paracellular permeability and vesicular transport in acetaminophen-treated perfused rat liver. *Hepatology*, 30:160-168, 1999.
- Mitrione S.M., Villalon P., Lutton J.D., Levere R.D., Abraham N.G.: Inhibition of human adult and fetal heme oxygenase by new synthetic heme analogues. *Am. J. Med. Sci.*, 296:180-186; 1988.
- Motterlini, R.; Foresti, R.; Intaglietta, M.; Winslow, R.M. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.*, 270:H107-H114; 1996.

- Rodgers, P. A.; Vreman, H.J.; Dennery, P.A.; Stevenson, D.K. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. **Semin. Perinatol.**, 18: 2-10; 1994.
- Rodgers, P.A.; Seidman, D.S.; Wei, P.L.; Dennery, P.A.; Stevenson, D.K. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. **Pediatr. Res.**, 39:1041-1049; 1996.
- Ruiz-Gutierrez, V.; Muriana, FJ.; Guerrero, ^a; Cert, AM.; and Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. **J. Hypertens.**, 14:1483-90; 1996.
- Sacerdoti, D.; Escalante, B.; Abraham, N.G.; McGiff, J.C.; Levere, R.D.; Schwartzman, M.L., Treatment with tin prevents the development of hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Science**, 243:388-390; 1989.
- Santos, EA.; Yamaguishi, GA.; Heimann, JC. Effect of the heme/heme oxygenase pathway on the relationship between salt consumption and blood pressure. **J.Hypertens.**, 16:1965-1969; 1998.
- Seki, T; Naruse, M; Naruse, K.; Yoshimoto, T; Tanabe, A.; Tsuchiya K.; Imaki, T.; Nihei, H. and Demura, H. Roles of heme oxygenase/Carbon monoxide system in genetically hypertensive rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 241:574-578; 1997.

- Seki, T; Naruse, M; Naruse, K; Yoshimoto, T; Tanabe, A; Imaki, T; Hagiwara, H; Hirose, S; Demura, H. Interrelation between nitric oxide synthase and heme oxygenase in rat endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 331(1):87-91;1997.
- Suematsu, M.; Goda, N.; Sano, T.; Kashiwagi, S.; Egawa, T.; Shinoda, Y.; Ishimura, Y. Toxic waste or hormone? Carbon monoxide as a regulator of sinusoidal tone. *Hepatology*, 24(5):1319-1321; 1996.
- Thorup, C.; Jones, C.L.; Gross, S.S.; Moore, L. C. and Goligorsky, M. S. Carbon monoxide induces vasodilatation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am. J. Physiol.*, 277:F882-F889; 1999.
- Vesely, M. J. J.; Exon, D. J.; Clark, J. E.; Foresti, R.; Green, C. J. and Motterlini, R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am. J. Physiol.*, 275:C1087-C1094; 1998.
- Wagner, C.T.; Durante, W.; Christodoulides, N.; Hellums, J.D.; Schafer, A. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 100:589-596; 1997.
- Zatz, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Anim. Sci.*, 40:198-201; 1990.

Abstract

Heme oxygenase (HEOX) is the rate-limiting enzyme that opens the heme ring, resulting in equimolar quantities of biliverdin, carbon monoxide (CO) and Fe^{3+} . HEOX plays an important physiological role in the degradation of heme, regulating hemoprotein levels and therefore protecting cells from the deleterious effects of free heme. Biliverdin is subsequently reduced by biliverdin reductase to bilirubin that has antioxidant properties. Iron is sequestered by ferritin. CO activates soluble guanylate cyclase with resultant production of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) which produces relaxation of the vascular smooth muscle cells.

Previously we demonstrated the effect of acute HEOX inhibition by zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) on blood pressure in male Wistar rats that were fed with low (LSD - 0.15% NaCl), normal (NSD - 1.3%) or high salt diet (HSD - 8% NaCl) from weaning (21 days-old animals). The blood pressure decreased in rats on HSD, and increased in the animals on NSD and LSD after ZnPP IX administration. A negative correlation was obtained between blood pressure measured before ZnPP IX and the area under the curve of the percentage of blood pressure changes induced by ZnPP IX. This correlation seems to be independent of the salt content in the diet. Our conclusion is that the response to heme oxygenase inhibition is modulated by basal arterial blood pressure.

Recently it was showed that heme oxygenase is induced by high blood pressure and the levels of the enzyme returns to normal with blood pressure control.

It is known that heme oxygenase stimulation provokes breakdown of heme ring. The heme integrates the molecular structure of several important enzymes that are involved in the regulation of blood pressure, such as, soluble guanylate cyclase, nitric oxide synthase, hydroxylase and epoxygenase (cytochrome P-450 family). We postulate that the deficiency in heme rings due to heme oxygenase induction might lead to disturbances in the activities of some of these enzymes and hence hypertension.

The **objective** of this study was 1) to confirm the results observed previously in others models of hypertension and 2) to the role of epoxygenase in the regulation of blood pressure in response to HEOX inhibition in hypertensive animals. The chronic hypertension was induced by angiotensin II (AII - $0.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, by osmotic mini pumps during 7 days) or with L^w-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME - 50 mg/L in the tap water was given during two weeks) and acute hypertension with phenylephrine (FE - $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ iv). Hidralazine ($15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the tap water was given during 9 days) and sodium nitropruside (SNP - $7.7\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ iv) were used, respectively, to induce chronic and acute decreases of the blood pressure. The participation of the cytochrome P-450 pathway in the mechanism of blood pressure reduction in response to ZnPP IX was evaluated through the inhibition of this pathway by clotrimazole (80 mg/kg/24 hours) in animals on high salt diet or normal salt diet. Groups of rats treated with AII, L-NAME, FE, SNP, hidralazine and clotrimazole were submitted to HEOX inhibition. Direct blood pressure (carotid artery) measurements were undertaken before and after zinc protoporphyrin IX administration (ZnPP IX - $90 \mu\text{mol}/\text{kg}$ ip) or vehicle (sodium carbonate - $0,15\text{mmol}/\text{kg}$ ip).

In the chronic or acute hypertension models heme oxygenase inhibition induced a decrease of blood pressure. In the hypotension group there was no modification on blood pressure of these animals in response to

ZnPP I X. Animals on high salt diet submitted to the clotrimazole treatment did not modify the blood pressure after ZnPP I X administration.

Thus; the cytochrome P-450 pathway seems to be involved in the blood pressure decreases after HEOX inhibition in the animals under long term of high salt diet since there was no change in blood pressure in the clotrimazole-treated groups after heme oxygenase inhibition.