

0676047  
R.1386263  
03/05/01  
258,80

UMA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE RELAXAMENTO ENDO-  
TÉLIO-DEPENDENTE (EDRF) E DO FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS  
(PAF) NO ESCAPE VASCULAR E NA TAQUIFILAXIA DO RIM ISOLADO  
DE COELHO.

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA	
Nº. R 1386263		
03 / 05 / 2001		

OK

MARIA GUIMARÃES FERREIRA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUA-  
ÇÃO EM FARMACOLOGIA COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

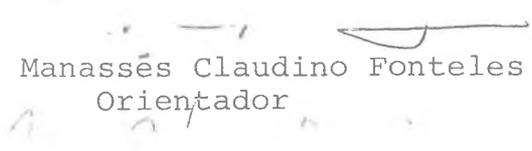
tese  
6104  
F. 12/20  
1989

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria Guimarães Ferreira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/10/1989

  
Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Orientador

  
Profa. Dra. Maria Silva Pitombeira

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Aos meus pais,  
de quem recebi os  
mais sábios ensinamentos.

Aos meus amores,  
Vicente, Carla e Bruno,  
estímulos maiores  
para esta realização.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Manassés Claudino Fonteles, orientador e amigo, exemplo de competência e dedicação à ciência, a quem devo uma relevante etapa de minha formação profissional.

Ao Professor José Henrique Leal Cardoso, colega e amigo, pelo incentivo oportuno na árdua caminhada.

Ao Professor Boris Vargaftig pelas valiosas discussões da fase preliminar e pela doação de algumas das substâncias utilizadas neste trabalho.

Ao Professor Oierre Braquet pelo empenho na doação dos ginkgolídios e pelo interesse demonstrado em nosso trabalho.

Aos técnicos José Valdir de Oliveira e Vicente Vasco de Sousa Coelho pela colaboração inestimável.

À Adelcir Oliveira Matos e Cineida Florêncio do Nascimento pela presteza e esmero no trabalho datilográfico.

À bibliotecária Norma de Carvalho Linhares pela inestimável colaboração no preparo do acervo bibliográfico.

À todos os professores, técnicos, funcionários e amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, que, de algum modo, contribui-

ram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina Clínica, na pessoa do Professor Elias Boutala Salomão, cujo apoio e incentivo foram fundamentais para esta realização.

## ÍNDICE

	Página
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	
1.1. <u>Apresentação do Tema</u> .....	7
1.2. <u>Revisão da Literatura</u> .....	7
1.2.1. Escape vascular .....	7
1.2.2. Taquifilaxia .....	13
1.2.3. Fator de relaxamento endotélio-dependente (EDRF) .....	17
1.2.3.1. Inibidores do EDRF .....	20
1.2.3.2. Identificação do EDRF .....	22
1.2.3.3. Ações do EDRF/NO .....	24
1.2.3.4. Inativação .....	25
1.2.4. Fator Ativador de Plaquetas (PAF) .....	31
1.2.4.1. Características bioquímicas .....	32
1.2.4.2. Propriedades farmacológicas .....	35
1.2.4.3. PAF no rim .....	38
1.2.4.4. Inibidores do PAF .....	41
1.2.4.3.1. Antagonistas naturais .....	43
1.2.3.2. Antagonista sintético .....	46
1.2.3.3. Antagonista farmacológico .....	47

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. <u>Procedimento cirúrgico</u> .....	49
2.2. <u>Sistema de perfusão</u> .....	50
2.3. <u>Medidas fisiológicas</u> .....	53
2.5. <u>Produtos químicos</u> .....	57
2.6. <u>Análise estatística</u> .....	58

## 3. RESULTADOS

3.1. <u>Reatividade adrenérgica</u> .....	60
3.1.1. Rins descapsulados .....	60
3.1.2. Rins capsulados .....	68
3.1.3. Rins perfundidos com DMSO .....	68
3.2. <u>Bloqueio do EDRF</u> .....	72
3.2.1. Rins infundidos com azul de metileno .....	74
3.2.2. Rins infundidos com colagenase .....	78
3.2.3. Perfusão com EP 10161 .....	82
3.3. <u>Estudo com Eterfosfolipídios</u> .....	87
3.3.1. Perfusão com PAF .....	87
3.3.2. Perfusão com Liso-PAF .....	91
3.4. <u>Bloqueio de receptores do PAF</u> .....	96
3.4.1. Antagonistas naturais .....	97
3.4.1.1. BN 52021 .....	97
3.4.1.2. BN 52022 .....	101
3.4.1.3. BN 52024 .....	101

	Página
3.4.2. Antagonista sintético .....	110
3.4.3. Antagonista farmacológico .....	114
4. <u>DISCUSSÃO</u>	
4.1. <u>Reatividade adrenérgica em rim perfundido com</u> <u>solução de Krebs-Henseleit</u> .....	121
4.2. <u>Bloqueio do EDRF/NO (EDNO)</u> .....	125
4.3. <u>Estudo com Eterfosfolipídios</u> .....	131
4.4. <u>Antagonistas do PAF</u> .....	134
5. <u>CONCLUSÕES</u> .....	138
<u>SUMÁRIO</u> .....	141
<u>SUMMARY</u> .....	143
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	145

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
I - Locais de escape vascular .....	8
II - Farmacologia comparativa EDRF/NO .....	20
III - Dinâmica de perfusão de rins previamente descapsulados, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e infundidos com noradrenalina .....	61
IV - Dinâmica de perfusão de rins com cápsula <u>ín</u> tegra, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e infundidos com noradrenalina ..	65
V - Efeitos do dimetilsulfóxido sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	69
VI - Percentagem de escape vascular noradrenérgi <u>co</u> em rins descapsulados, com cápsulas <u>ínte</u> gras e perfundidos com dimetilsulfóxido ...	73
VII - Efeitos do azul de metileno sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos, à infusão de noradrenalina .....,.....	75
VIII - Efeitos da colagenase sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	79

TABELA	Página
IX - Efeitos do EP 10161 sobre a dinâmica de <u>per</u> fusão de rins de coelhos submetidos à infu- são de noradrenalina .....	83
X - Percentagem de escape vascular noradrenérgi- co em rins tratados com bloqueadores do EDRF .....	86
XI - Efeitos do PAF sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	88
XII - Efeitos do Liso-PAF sobre a dinâmica de <u>per</u> fusão de rins de coelho submetidos à infu- são de noradrenalina .....	92
XIII - Percentagem de escape vascular noradrenérgi- co em rins tratados com eterfosfolipídios .	95
XIV - Efeitos do BN 52021 (ginkgolídio B) sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetido à infusão de noradrenalina .....	98
XV - Efeitos do BN 52022 (ginkgolídio C) sobre a dinâmica de perfusão de rim de coelho subme- tidos à infusão de noradrenalina .....	102
XVI - Efeitos do BN 52024 (ginkgolídio J) sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	105
XVII - Efeitos do 48740 RP sobre a dinâmica de <u>per</u>	

## TABELA

## Página

	fusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	111
XVIII -	Efeitos do WEB 2086 sobre a dinâmica de perfusão de rins de coelho submetidos à infusão de noradrenalina .....	115
XIX -	Percentagem de escape vascular noradrenérgico em rins tratados com antagonistas de PAF	119
XX -	Percentagem de escape vascular noradrenérgico. Estudo comparativo de todos os grupos estudados .....	120

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1a - Escape vascular .....	3
1b - Taquifilaxia .....	5
2 - Estrutura dos ginkgolídios .....	45
3 - Sistema de perfusão .....	52
4 - Efeitos da infusão de noradrenalina em rim de coelho, isolado e perfundido, previamente descapsulado .....	63
5 - Efeitos da infusão de noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M) em rim de coelho, isolado e perfundido, com cápsula renal íntegra .....	67
6 - Efeitos do dimetilsulfóxido (0,65%) em rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à infusão de noradrenalina .....	71
7 - Efeitos de azul de metileno (0,1%) no rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à infusão de noradrenalina .....	77
8 - Efeitos da colagenase (320 UI) em rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à infusão de noradrenalina .....	81
9 - Efeitos do EP 10161 ( $3,4 \times 10^{-5}$ M), inibidor de lipooxigenase, sobre o rim de coelho, iso	

FIGURA	Página
lado e perfundido, submetido à infusão de <u>no</u> radrenalina .....	85
10 - Efeitos do PAF ( $2,76 \times 10^{-6}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à <u>in</u> fusão de noradrenalina .....	90
11 - Efeitos do Liso-PAF ( $3,23 \times 10^{-6}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submeti do à infusão de noradrenalina .....	94
12 - Efeitos do BN 52021 ( $3,05 \times 10^{-5}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submeti do à infusão de noradrenalina .....	100
13 - Efeitos do BN 52022 ( $2,27 \times 10^{-5}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submeti do à infusão de noradrenalina .....	104
14 - Efeitos do BN 52024 ( $2,35 \times 10^{-6}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submeti do à infusão de noradrenalina .....	107
15 - Bloqueio da taquifilaxia noradrenérgica pelo BN 52024 ( $2,35 \times 10^{-6}$ M) em rim de coelho, i- solado e perfundido .....	108
16 - Efeitos do 48740 RP ( $10^{-5}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à <u>in</u> fusão de noradrenalina .....	113
17 - Efeitos do WEB 2086 ( $10^{-6}$ M) sobre o rim de	

FIGURA

Página

coelho, isolado e perfundido, submetido a in  
fusão de noradrenalina ..... 117

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Apresentação do Tema

Escape vascular e taquifilaxia são fenômenos de natureza vasoativa, parecem ter uma significação especial como mecanismos protetores das variações súbitas e frequentes da tonicidade vascular e por isso têm merecido especial atenção desde suas primeiras descrições.

Escape vascular diz respeito à falência do músculo liso arterial em manter-se contraído na presença de estímulo constante, como o que ocorre durante a infusão de agonistas adrenérgicos ou quando da estimulação nervosa simpática (Figura 1a).

Taquifilaxia significa dessensibilização, denominação tal como foi empregada primeiramente por CHAMPY & GLEY (1911) ao referirem-se aos eventos decorrentes de imnização rápida. De modo semelhante o termo tem sido utilizado para descrever a perda progressiva da capacidade responsiva do vaso à administração intermitente de agentes vasoconstrictores (Figura 1b).

Apesar do grande volume de trabalhos devotados ao estudo do escape vascular, houve na última década uma desaceleração das pesquisas no setor. Em 1984, GREENWAY publicou importante trabalho retrospectivo que precedeu a reativação das investigações sobre o escape, o que se veri

FIGURA 1a. Escape Vascular.

Expressão gráfica do escape vascular e do fluxo urinário do rim de coelho, isolado e perfundido, submetido à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ).

fluxo urinário



pressão de perfusão mm Hg

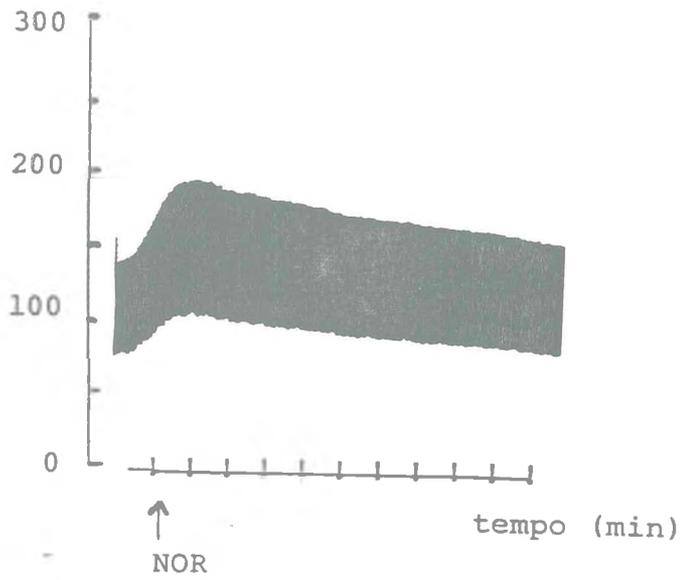
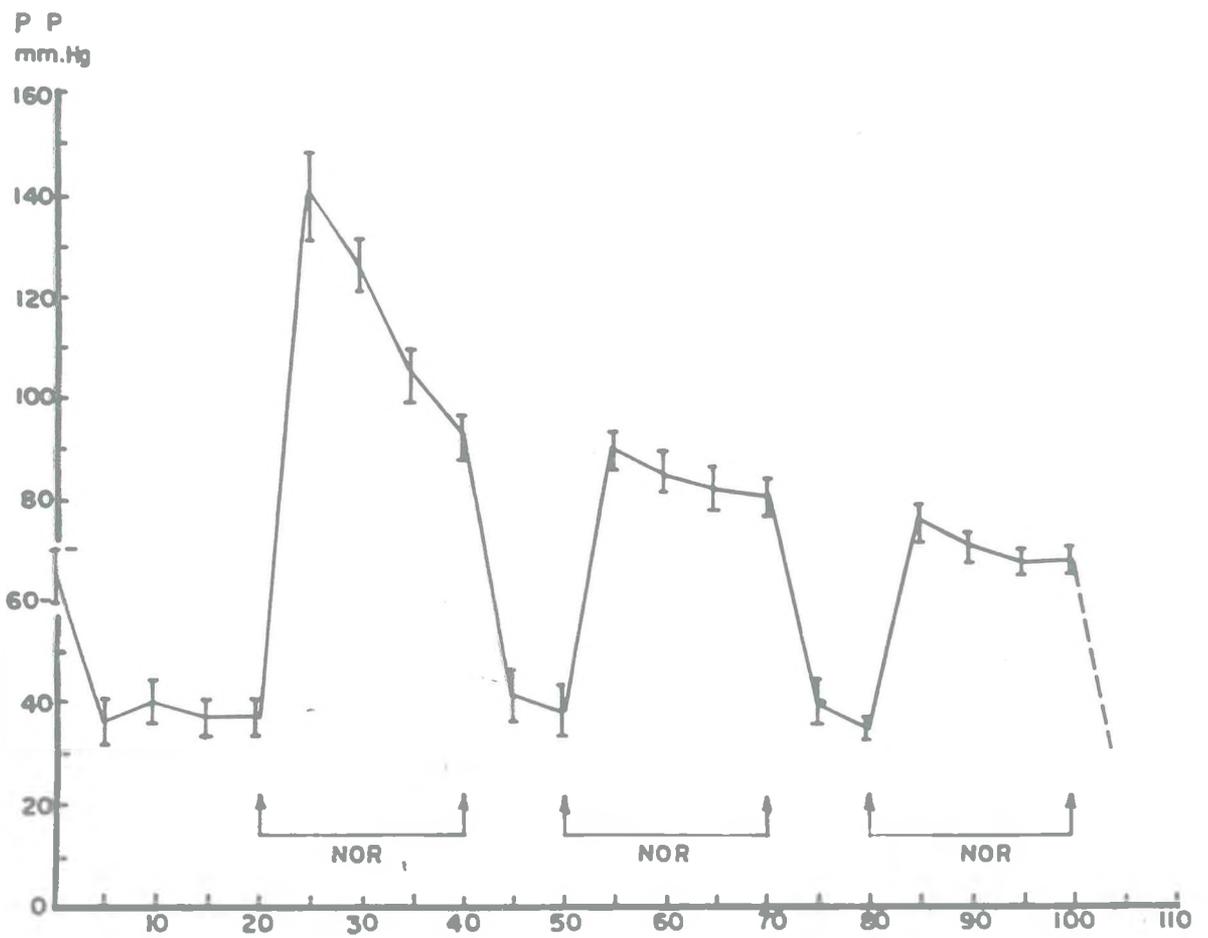


FIGURA 1b. Taquifilaxia.

Resposta taquifilática observada em rim isolado de coelho, perfundido com solução de Krebs-Henseleit e submetido a períodos consecutivos de in fusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}$  M).



ficou à partir de 1977 com os trabalhos de LAUTT e cols. em leitos arteriais mesentérico e hepático.

Paralelamente, assistimos nos últimos dez anos a evolução nos conceitos sobre a participação do endotélio vascular como elemento efetor de importantes ajustes da vasoatividade, através da produção em suas células de mediadores químicos com ação sobre o músculo liso vascular. De barreira semi-permeável, não-trombogênica, capaz de atuar meramente como elemento limitante entre a corrente circulatória e o espaço intersticial, passou o endotélio a ser entendido como um conjunto de células pluripotentes, com ações múltiplas, capazes de atuar com relevância sobre os diversos fenômenos da fisiologia do vaso. A idéia de que células endoteliais pudessem participar ativamente dos processos de autoregulação do tônus vascular originou-se do conhecimento de serem as mesmas capazes de sintetizar e metabolizar substâncias vasoativas. Para isso muito contribuiu a incorporação à rotina experimental das técnicas de cultura de células endoteliais (JAFFE e cols., 1973) e a detecção da enzima conversora de Angiotensina (CALDWELL e cols., 1976), importante marco para a compreensão de que fenômenos de natureza endotelial poderiam alterar significativamente o tônus do músculo liso vascular. De modo semelhante, a identificação de metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaciclina (WEKSLER e cols., 1978) e o reconhecimento do endotélio como a grande fonte produtora de prostaglandinas vasodilatadoras (MONCADA e cols., 1977), vieram corroborar definitivamente esta impressão.

A atraente possibilidade da existência de um mecanismo comum vinculando a taquifilaxia e o escape vascular noradrenérgicos à produção de mediadores vasoativos recentemente identificados, levou-nos a estudar os efeitos do Fator de Relaxamento Endotélio-Dependente (Endothelium-Derived Relaxing Factor - EDRF) (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980) e do Fator de Ativação de Plaquetas (Platelet-Activating Factor - PAF) (BENVENISTE, 1974) sobre o escape vascular e taquifilaxia induzidos por noradrenalina, utilizando a perfusão de rim isolado de coelho como modelo experimental.

## 1.2 - Revisão da Literatura

### 1.2.1 - Escape Vascular

FOLKOW, LEWIS, LUNGGREN, MELLANDER & WALLENTIN, em 1964, descreveram pela primeira vez o escape autoregulatório ao observarem que após o início da estimulação elétrica de terminações nervosas simpáticas intestinais de gatos anestesiados, havia uma elevação acentuada da resistência do leito mesentérico, logo seguida de recuperação dos valores basais ainda na vigência da estimulação nervosa.

À partir da descrição de FOLKOW e cols. inúmeras publicações relataram a ocorrência de escape em preparações diversas de diferentes leitos vasculares, desencadeado tanto por estímulo nervoso simpático (FOLKOW e cols., 1964; DRESEL & WALLENTIN, 1966; GREENWAY e cols., 1967, 1976); JOHANSON e cols., 1970; HANSON, 1972; LUTZ & HENRICH,

1973; LAUTT, 1977; LAUT & GRAHAM, 1977; FINK & BRODY, 1978), como pela estimulação adrenérgica (GREENWAY e cols. 1967; RICHARDSON & JOHANSON, 1969; HENRICH & LUTZ, 1971; FARA & ROSS, 1972; HANSON, 1972; LUTZ & HENRICH, 1973; FONTELES e cols., 1974; FONTELES & JESKE, 1980) (Tabela 1).

TABELA I - Locais de ocorrência de escape vascular

---

I - Induzido por estimulação simpática:

1. Mesentérico: FOLKOW e cols., 1964a, 1964b; DRESEL & WALLENTIN, 1966; HENRICH, 1973; LUTZ & HENRICH, 1973; GREENWAY, SCOTT & ZINK, 1976; LAUTT & GRAHAM, 1977.
2. Hepático: GREENWAY, LAWSON & MELLANDER, 1967; HANSON, 1972; LAUTT, 1977.
3. Renal: JOHANSON SPARK & BIBER, 1970; LUTZ & HENRICH, 1973; FINK & BRODY, 1978.

II - Induzido por estimulação adrenérgica:

1. Mesentérico: DRESEL & WALLENTIN, 1966; ROSS, 1967; RICHARDSON & JOHANSON, 1969; HENRICH & LUTZ, 1971; ROSS, 1971; FARA & ROSS, 1972.
  2. Hepático: GREENWAY, LAWSON & MELLANDER, 1967; HANSON, 1972; FARA E ROSS, 1972.
  3. Renal: LUTZ & HENRICH, 1973; FONTELES, JESKE & KAROW, 1974; FONTELES & JESKE, 1980.
-

O escape vascular tem sido descrito também em modelos experimentais mais complexos. GOMEZ & YARD (1968) estudando a tolerância à infusão de noradrenalina em cães com tórax aberto e fechado, obtiveram escapes em amplo espectro de concentrações do  $\alpha$  agonista. Em rim de coelho, isolado e perfundido, FONTELES e cols. (1974) demonstraram ser possível observar reações de escape noradrenérgico mesmo durante a hipotermia. KOO & CHENG (1976) relataram dados surpreendentes de escape vascular em microcirculação cerebral de ratos desencadeado por substância vasodilatadora. FONTELES & JESKE (1980) estudando o comportamento do escape vascular em ratos hipertensos, observaram que, à infusão de noradrenalina, a frequência de escape era menor que no grupo de normotensos.

O fenômeno do escape vascular pode ser também observado em resposta a outros vasoconstrictores dentre os quais a Angiotensina II (ROSS, 1971; HENRICH & LUTZ, 1971; FARA & ROSS, 1972; PRAÇA & FONTELES, 1987), Vasopressina (HENRICH & LUTZ, 1971; FARA & ROSS, 1972; ROSS, 1971), Fenilefrina (ROSS, 1971; FARA & ROSS, 1972) e  $\text{PGF}_2\alpha$  (HENRICH & LUTZ, 1971).

O escape parece constituir-se numa propriedade intrínseca do músculo liso vascular, porém com características marcantes e peculiares quanto à determinado tecido, no que se refere ao tipo de estímulo indutor. Se comparado em intensidade e frequência, o escape desencadeado por estimulação simpática é mais expressivo que aquele produzido pela infusão de substâncias adrenérgicas (DRESEL & WALLEN-

TIN, 1966; HENRICH, 1973; HANSON, 1972; LUTZ & HENRICH, 1973). Do mesmo modo, ocorrem diferenças significativas quando se comparam leitos vasculares, estando os intestinais e hepáticos dentre aqueles que exibem escape com maior frequência. Alguns estudos comparativos revelam que o escape noradrenérgico vascular renal é estatisticamente insignificante quando comparado aos de outros leitos vasculares nas mesmas condições experimentais (JOHANSON e cols., 1970; LUTZ & HENRICH, 1973). Estes resultados entretanto não foram corroborados no modelo experimental de perfusão em rim isolado de coelho (FONTELES & AHLQUIST, 1980; FONTELES e cols., 1974; FONTELES & LIMA E FORTI, 1984; FONTELES E MOREIRA LIMA, 1984).

O mecanismo relacionado à gênese do escape vascular, apesar de bastante estudado, permanece ainda desconhecido. Inúmeras hipóteses surgiram, ao longo das últimas duas décadas, visando explicar um fenômeno vascular já amplamente demonstrado. Teorias como a da redistribuição do fluxo regional (FOLKOW e cols., 1964), hormonal (FEIGL e cols., 1964) e metabólica (GREENWAY e cols., 1967) foram sendo progressivamente afastadas à luz de novas investigações, as quais demonstraram que o escape ocorria tanto sob fluxo como pressão constantes (DRESEL & WALLENTIN, 1966; LUTZ & HENRICH, 1973); que o fluxo sanguíneo no intestino e no fígado permanecia imutável em resposta à estimulação nervosa é à infusão noradrenérgica (GREENWAY e cols., 1976; GREENWAY & OSHIRO, 1972) e que o consumo de oxigênio no fígado e no intestino retornava aos níveis controle durante

o escape, qualquer que fosse o fator de indução (LAUTT, 1977).

O papel dos receptores  $\beta$  adrenérgicos na modulação desta resposta vascular foi amplamente pesquisado. GREENWAY e cols. (1967) obtiveram reações de escape noradrenérgico, que não se modificaram com o tratamento das preparações com atropina e com propranolol. Este  $\beta$  bloqueador também não foi capaz de inibir o escape induzido por adrenalina (GREENWAY e cols., 1967; HANSON, 1972; HENRICH e cols., 1974), nem tampouco aquele decorrente da estimulação elétrica de terminações nervosas (GREENWAY e cols., 1967; HANSON, 1972).

Uma importante contribuição no estudo dos receptores  $\beta$  no mecanismo de escape vascular adveio dos trabalhos de FONTELES & AHLQUIST (1980) os quais demonstraram a ausência destes receptores em rim de coelho. Com o mesmo modelo experimental de rim isolado e perfundido, pode o escape ser demonstrado em condições de normotermia (FONTELES & MOREIRA LIMA, 1984), hipotermia (FONTELES e cols., 1974), em diabetes aloxânico (COSTA E FORTI & FONTELES, 1989a) e em rim de ratos hipertensps SHR (FONTELES & JESKE, 1980).

A possibilidade de vasodilatadores endógenos estarem associados ao mecanismo do escape vascular tem sido sugerida por vários pesquisadores desde a última década. O acúmulo de metabólitos vasodilatadores seria secundário à isquemia que se instala durante a vasoconstricção (FONTELES e

cols., 1974; GREENWAY e cols., 1967; HANSON, 1972; RICHARDSON & JOHNSON, 1969) ou poderia ainda ser resultante da ruptura de elementos figurados do sangue durante os procedimentos experimentais, principalmente aqueles que utilizavam bombas para infusão (DRESEL & WALLENTIN, 1966). GREENWAY, SCOTT & ZINK (1976), em trabalho pioneiro no qual propuseram critérios para a definição do fenômeno do escape vascular, preconizavam que o termo "escape" fosse restrito às reações que não se modificassem sob a ação da atropina, propranolol, anti-histamínicos e inibidores da síntese de prostaglandinas. FONTELES & LIMA e FORTI (1984) entretanto constataram redução na intensidade e frequência do escape em rim isolado de coelho, após o tratamento prévio dos animais com indometacina, um inibidor de ciclooxigenase. No mesmo ano e utilizando o mesmo modelo experimental, FONTELES & MOREIRA LIMA (1984) descreviam uma redução de 50% na frequência do escape vascular renal noradrenérgico pela infusão de  $PGE_1$  na artéria renal de rim isolado de coelho.

Nos últimos anos uma grande contribuição ao estudo do escape vascular adveio dos trabalhos de LAUTT e cols.: (1977, 1986, 1987), os quais têm utilizado os leitos vasculares mesentérico e hepático para a análise do fenômeno. A observação de que a adenosina era um potente inibidor da vasoconstricção induzida por noradrenalina, vasopressina e angiotensina II (LAUTT & LEGARE, 1986) deixou entrever a possibilidade da participação desta substância nas reações de escape. Entretanto, a utilização de um bloqueador específico de adenosina endógena em nada alterou a resposta vascu-

lar (LAUT e cols., 1987), tendo estes resultados acrescentado mais um dado de exclusão à extensa relação de pretensos mediadores desta resposta vascular.

### 1.2.2 - Taquifilaxia

Dessensibilização e Taquifilaxia são expressões usadas por vários autores para denominar a propriedade apresentada por uma preparação biológica de atenuar ou abolir, temporariamente, a sua resposta frente a determinada substância, devido exposição anterior à mesma. Desde os trabalhos pioneiros de BARSOUM & GADDUM (1935) inúmeras publicações têm dedicado atenção ao fenômeno da taquifilaxia como uma resposta específica do músculo liso frente aos vários compostos capazes de desencadeá-la.

AXELROD e cols. (1963) sugeriram que algumas substâncias determinavam reações taquifiláticas por atuarem liberando ativamente neurotransmissores das terminações nervosas vasculares e por isso deveriam ser consideradas como dessensibilizadores inespecíficos. GOSSELIN & GOSSELIN (1973) concluíram que tanto os processos específicos como inespecíficos de dessensibilização estavam relacionadas à exposição prolongada à substância indutora. Inúmeros compostos são capazes de produzir taquifilaxia em preparações biológicas diversas e os hormônios polipeptídios como a renina, angiotensina II e vasopressina estão entre aqueles mais estudados. As catecolaminas, a bradicinina, a histamina e a acetilcolilina também induzem à reações taquifiláticas em diferentes

preparações. Segmentos arteriais e o íleo isolado têm se constituído em locais preferenciais para a realização da maior parte dos experimentos que constituem hoje o acervo sobre o estudo do fenômeno.

A resposta taquifilática varia entre diferentes espécies animais, frente a um mesmo indutor e, no mesmo animal, em leitos vasculares diversos. A aorta de coelho, por exemplo, responde taquifilaticamente à NOR (FURCHGOTT & BHADRAKON, 1953), mas é incapaz de reproduzir a mesma resposta se o indutor for a angiotensina II (KHAIRALLAH & cols., 1966). Esta última pode desencadear taquifilaxia de diferentes graus de expressão, intensa em artéria mesentérica de coelho (AIKEN, 1974), moderada na aorta de rato (KHAIRALLAH e cols., 1966) e variável em aorta de cobaio (PALAIC & LEMORVAN, 1971).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno taquifilático. O ponto comum nos vários sistemas onde é possível evidenciar a reação, é a existência de receptores mediando os efeitos induzidos por estímulo específico. Desse modo, os receptores de membrana celular constituem-se no primeiro ponto de atenção da resposta taquifilática, a qual expressa, em última análise, alterações do sistema receptor-efetor (SIBLEY & LEFKOWITZ, 1985). Assim as diferentes hipóteses sobre a origem dos mecanismos envolvidos na taquifilaxia, podem ser genericamente resumidas em eventos relacionados à: I) alterações na afinidade do receptor celular à droga indutora; II) diminuição do número de receptores disponíveis para a ligação; III) aumento da dis-

ponibilidade do agonista para as células, individualmente; IV) diminuição da recaptação ou inativação do neurotransmissor e, talvez; V) perda do fator endotelial modificador da resposta vascular frente a determinados agonistas (O'MALLEY e cols, 1986). É importante salientar que a conexão entre agonista-receptor e a resposta final de natureza contrátil, está relacionada também com outros componentes próprios dos estados ativo e de repouso, os quais são comuns a vários agonistas. É o caso dos anions mono e divalentes os quais têm participação fundamental na contração muscular lisa.

KHAIRALLAH e cols. (1966) propuseram que a dissociação lenta entre agonista e receptor poderia determinar uma saturação dos sítios de acoplamento e dar origem à resposta taquifilática. MOORE & KHAIRALLAH (1976) demonstraram que preparações até então tidas como refratárias à angiotensina II, passavam a apresentar resposta taquifilática quando submetidas a pH e temperatura menores que as habitualmente empregadas. Com isso comprovavam a existência de correlação entre habilidade em induzir taquifilaxia e a afinidade da substância indutora pelo receptor no tecido alvo. STEWART (1974), ao revisar o fenômeno da taquifilaxia à Angiotensina II, chamou a atenção para uma possível combinação anormal entre o hormônio e o receptor celular, num processo envolvendo a ligação competitiva com o cálcio. SCHILD (1973) já havia salientado o papel do cálcio no processo taquifilático, ao demonstrar que a histamina era capaz de promover dessensibilização específica, a qual podia sofrer modificações em função da presença de cálcio no meio. Os trabalhos

de PAIVA e cols. (1977 a,b,c) demonstraram que não apenas a liberação de cálcio dos depósitos intracelulares, mas também a protonação do amino grupo da molécula de angiotensina constituíam elementos vitais para a resposta taquifilática, chamando a atenção para a conformação molecular na origem do processo de acoplamento do agonista. O reconhecimento do endotélio como elemento ativamente participante na vasoatividade fez surgir várias publicações que demonstravam estarem as células endoteliais relacionadas às modificações na resposta contrátil induzida por agonistas (CALDWELL, 1976). O'MALLEY e cols. (1986), estudando a sensibilidade da aorta de coelho à NOR, verificaram que a desendotelização mecânica promovia um aumento da resposta contrátil, a qual podia ser inibida com prazosin, sugerindo portanto a participação de receptores  $\alpha_1$  na vasoconstrição adrenérgica.

No modelo experimental de rim isolado de coelho, os efeitos da  $PGE_1$  sobre a taquifilaxia noradrenérgica foram estudados por FONTELES & MOREIRA LIMA (1984), concluindo os autores inexistir interferência das PG no fenômeno. Com o mesmo modelo experimental, pode a taquifilaxia ser bloqueada pela adição de insulina ao líquido perfusor, mesmo sob diferentes concentrações de cálcio do meio (COSTA E FORTI & FONTELES, 1989b). Em rins de rato, isolados e perfundidos, PRAÇA & FONTELES (1987) demonstraram que a taquifilaxia à NOR e à Angiotensina II não sofria modificações conforme se utilizasse para seu estudo animais normotensos ou SHR.

### 1.2.3 - Fator de relaxamento endotélio-dependente

(Endothelium-Derived Relaxing Factor - EDRF)

Em 1980, FURCHGOTT & ZAWADSKI, em trabalho pioneiro, destacaram o endotélio como uma estrutura vascular indispensável ao relaxamento do músculo liso arterial. Utilizando diferentes tipos de cortes de aorta de coelho, precontraídas com noradrenalina (NOR), com endotélio íntegro ou desendotelizados por meios mecânicos ou químicos, constataram que a ação relaxadora da acetilcolina (Ach) só se fazia presente naqueles segmentos arteriais cujo endotélio não havia sido danificado (FURCHGOTT, 1984; FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). O tratamento com indometacina e aspirina em nada alterava a resposta relaxante nos segmentos endotelizados, demonstrando que o processo não era dependente da ação vasodilatadora das prostaglandinas (PG). A retirada do endotélio também não alterava a sensibilidade das preparações à agentes tais como o trinitrato de glicerila, nitrato de sódio, azida sódica e isoprenalina (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). Estes fatos levaram FURCHGOTT e cols. (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; FURCHGOTT, 1984) a postularem a existência um mecanismo segundo o qual a Ach, agindo em receptores muscarínicos localizados na célula endotelial, estimularia a produção de uma substância capaz de atuar na camada íntima da artéria permitindo assim o seu relaxamento. CHERRY e cols. (1982) utilizaram o termo Fator de Relaxamento Endotélio-Dependen-

te (Endothelium-Derived Relaxing Factor - EDRF) para designar o princípio ativo, não prostaglandínico, produzido pelas células endoteliais e com propriedade de mediar o fenômeno da vasodilatação induzida pela Ach.

Além desta, uma série de outros vasodilatadores foram progressivamente identificados como capazes de agir na parede arterial via um mecanismo endotélio-dependente, onde a liberação de EDRF parecia ser o fator que indubitavelmente se associava ao relaxamento do músculo liso. Assim se comportavam substâncias como a adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato (ADP) (DE MEY & VANHOUTTE, 1981; FURCHGOTT e cols., 1984); ionóforo de cálcio A 23187 (ZAWADSKI e cols., 1980; FURCHGOTT, 1984); histamina (VAN DE VOORDE & LEUSEN, 1983); bradicinina (CHERRY e cols., 1982; FURCHGOTT, 1984), trombina (DE MEY & VANHOUTTE, 1981;1982); substância P (FURCHGOTT, 1984); melitina (FORSTERMANN & NEUFANG, 1985); ácido araquidônico (FURCHGOTT & ZAWADSKI,1980; DE MEY & VANHOUTTE, 1982; FURCHGOTT e cols., 1984). Em 1983 COCKS & ANGUS observaram que as aminas vasoconstrictoras 5-hidroxitriptamina e noradrenalina, eram capazes de promover, sob determinadas circunstâncias, o relaxamento da artéria coronariana do cão e do porco, e que esta ação vasodilatadora só era possível na presença de endotélio. Três anos depois ANGUS e cols. (1986) apresentaram o resultado de um estudo comparativo da ação relaxadora da noradrenalina em artérias carótida, coronária, renal, mesentérica e fe

mural de cão, concluindo que a vasodilatação endotélio-dependente à NOR era variável em sua intensidade, sendo maior na artéria coronariana e insignificante nas artérias renal e mesentérica (ANGUS e cols., 1986).

Embora amplamente descrita em diferentes tipos de preparações arteriais de mamíferos, a vasodilatação "in vitro", endotélio-dependente, mediada pelo EDRF, apresenta-se como um evento nem sempre universalmente demonstrável. Diferentes expressões da resposta relaxadora podem ser encontradas em espécies distintas e, mesmo dentro de uma mesma espécie, podem ocorrer variações de resposta frente a um mesmo indutor de relaxamento vascular. Este fato se torna mais patente quando artérias de condução, nas quais foi realizada a maioria dos experimentos, têm sua resposta vasodilatadora comparada às dos vasos de resistência. A histamina e a bradicinina, por exemplo, induzem ao relaxamento endotélio-dependente grandes artérias caninas (CHERRY e cols., 1982) e aorta de rato (VAN DE VOORDE & LEUSEN, 1983), porém não conseguem promover a mesma resposta em aorta de coelho (FURCHGOTT, 1984). Do modo semelhante, o ionóforo de cálcio A 23187, potente indutor do relaxamento endotélio-dependente em aorta de coelho, é ineficiente como agente relaxador em vasos mesentéricos de resistência (DE MEY & GRAY, 1985). LUSCHER e cols (1987) atribuíram ao EDRF o mesmo padrão de relaxamento endotélio-dependente observado em duas artérias humanas, a renal e a pedis dorsalis, ambas submetidas a a-

ção da Ach após serem contraídas com NOR.

Quando são comparados o comportamento de vasos venosos e arteriais quanto à resposta endotelial vasodilatadora, obtem-se resultados ilustrativos que demonstram as profundas diferenças entre os dois leitos vasculares. A resposta venosa é bem menos expressiva do que a arterial frente ao mesmo indutor de relaxamento (FURCHGOTT, 1984; DE MEY & VANHOUTTE, 1982) tendo SEIDEL e LA ROCHELLE (1987) sugerido que as diferenças devam ser atribuídas mais a incapacidade do endotélio venoso em produzir EDRF do que à inabilidade do seu músculo liso em responder à ação vasodilatadora do mediador.

#### 1.2.3.1 - Inibidores do EDRF

A inibição seletiva das reações de relaxamento vascular endotélio-dependente pode ser obtida pelo emprego de inúmeras substâncias que têm em comum a propriedade de danificar ou inativar<sup>1</sup> as células endoteliais, interferindo em etapas-chave de seu metabolismo. Dentre os agentes e condições inibidoras do relaxamento endotélio-dependente citam-se: inibidores da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) como a mepacrina (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; SINGER & PEACH, 1983) e p-bromofenacilbrometo (FURCHGOTT, 1983); os inibidores da

lipooxigenase como o ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico(ETYA) (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; FURCHGOTT, 1984), ácido nordihidroguaiarético (NGDA) (FURCHGOTT e cols., 1982; FURCHGOTT, 1983), ácido cafeico, BW 755C e fenidona (FORSTERMANN & NEUFGANG, 1984); antioxidantes e removedores de radicais livres como a hidroquinona (FURCHGOTT, 1981, 1983); bloqueadores de canais de cálcio (SINGER & PEACH, 1982); antagonistas da calmodulina (WEINHEIMER & OSSWALD, 1986); inibidores do citocromo P450 como o SKF 525A (SINGER e cols., 1984) e SKF 86002 (BERKOWITZ & OHLSTEIN, 1986); e a anoxia (ZAWADSKI e cols., 1980; FURCHGOTT, 1984). Embora seletivos, estes inibidores não são específicos e podem por isso ensejar o surgimento de reações farmacológicas com efeitos paralelos.

A mioglobina e as hemoproteínas foram descritas como capazes de inibir não só o relaxamento endotélio-dependente como também aquele promovido pelo trinitrato de glicerila (MARTIN e cols., 1985). O mesmo ocorre com o azul de metileno, corante com propriedades redox, capaz de inibir tanto o relaxamento arterial produzido por vasodilatadores do tipo nitrato (NVD) como por indutores do EDRF (HOLZMANN, 1982; FURCHGOTT, 1984). As características da ação destes dois compostos são bem peculiares e ensejou a realização dos estudos comparativos entre os mecanismos de relaxamento vascular endotélio-dependente ou mediado pelo EDRF, e outro, endotélio-independente ou mediado por NVD. Estes estudos constituíram-se num dos marcos da pesquisa sobre o EDRF.

### 1.2.3.2 - Identificação do EDRF

Baseados nos resultados dos estudos com inibidores do relaxamento endotélio-dependente, vários autores postularam a existência de um precursor do EDRF, provavelmente o ácido araquidônico, o qual oxidado por uma lipooxigenase, originaria um composto ativo, talvez um radical livre ou um ion peróxido, o qual seria o fator de relaxamento endotélio-dependente (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; DE MEY & VANHOUTTE, 1982; SINGER & PEACH, 1983; FURCHGOTT, 1984; FURCHGOTT e cols., 1984). Em 1984 GRIFFITH e cols., descreveram um método para detectar o EDRF em solução, concluindo ser esta substância extremamente lábil, com vida média de  $6,3 \pm 0,6$  segundos.

Antes da descoberta do EDRF (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980) inúmeras publicações já descreviam a existência de uma correlação positiva entre o processo de relaxamento de grupos musculares e as elevações dos níveis de guanosina monofosfato cíclico ( $GMP_c$ ) (KATSUKI & MURAD, 1977; BOHME e cols., 1978; AXELSON e cols., 1979). MURAD e cols. (1979) propuseram ser este o mecanismo através do qual agiriam os NVD ao promoverem a ativação da guanilato ciclase solúvel pela ação do óxido nítrico, composto intermediário liberado como produtos da reação. Após os trabalhos de FURCHGOTT inúmeros estudos demonstraram que o relaxamento endotélio-dependente, induzido por várias substâncias, se fazia acompanhar também de elevações concomitantes dos níveis de  $GMP_c$  no músculo liso arterial (HOLZMANN, 1982; RAPOPORT & MURAD, 1983).

Em 1983 FURCHGOTT & JOTHIANANDAN demonstraram que anéis de aorta de coelho, com ou sem endotélio, respondiam aos indutores de relaxamento com elevação de  $GMP_c$  e que nos primeiros, esta elevação precedia o relaxamento arterial. Em ambas as preparações o azul de metileno foi capaz de abolir a resposta dilatadora, com maior rapidez nos segmentos arteriais endotelizados. O paralelismo entre estes dois eventos e a utilização de uma metodologia baseada na transferência do EDRF, levou FORSTERMANN (1986) a concluir que o estimulador da guanilato ciclase e o EDRF eram semelhantes, não idênticas substâncias.

Para examinar o já reconhecido mimetismo entre as ações do EDRF e do óxido nítrico, PALMER e cols. realizaram bioensaio para determinar a atividade biológica de ambos. Os resultados mostraram similaridades importantes quanto à vida média, estimulação pela bradicinina, redução da inativação com superóxido-dismutase (SOD) e inibição do relaxamento pela hemoglobina (PALMER e cols., 1987).

Resultados bastante expressivos obtiveram também IGNARRO e cols. (1987b) ao analisarem o comportamento do EDRF e do óxido nítrico (NO) frente ao pirogalol, substância geradora de ions' superóxidos, e à SOD, removedor destes radicais livres. A superfusão em cascata de segmentos arteriais mostrou que as respostas eram indistinguíveis, caracterizadas em ambos os casos por relaxamento inibido pelo pirogalol e estimulado pela SOD. Estas observações fortaleceram as conclusões de PALMER e cols. (1987) que demonstraram fenômenos vasculares acompanhados por alterações con

comitantes nos níveis de  $GMP_c$ , aumentados sob a ação da SOD e diminuídos pelo pirogalol, tanto no relaxamento induzido pela Ach (endotélio-dependente e mediado pelo EDRF), como naquele promovido pelo óxido nítrico (endotélio-independente) (IGNARRO, 1987b).

Inúmeras publicações demonstram ser o EDRF um composto indistinguível do NO (IGNARRO e cols., 1987b; 1987a; PALMER e cols., 1987) e embora existam outros mediadores endoteliais com ações vasoativas, deve ser reafirmada a especificidade do mecanismo de relaxamento endotélio-dependente promovido pelo EDRF. A inibição do mesmo pelas hemoproteínas e pelo azul de metileno, evidencia inconstante em reações similares promovidas por outras substâncias endoteliais vasoativas, vincula definitivamente a participação do EDRF/NO neste processo. Recentemente PALMER e cols. (1988) demonstraram que as células endoteliais são capazes de produzir o nitrocomposto através da metabolização da L-arginina, comprovando pela primeira vez em mamíferos a existência de uma via bioquímica capaz de produzir o EDRF/NO.

#### 1.2.3.3 - Ações do EDRF/NO

Além de causar relaxamento na preparação vascular precontraída através da indução exercida por inúmeras substâncias, o EDRF é capaz de promover ações de grande importância na fisiologia vascular através da sua relação com elementos celulares sanguíneos. Em 1986, AZUMA e cols. publicaram as primeiras observações mostrando a inibição da

agregação plaquetária pelo EDRF, o que foi posteriormente confirmado em preparações "in vitro" (FURLONG e cols., 1987). Um estudo comparativo das ações plaquetárias do EDRF/NO e prostaciclina mostraram ser estas substâncias a gentes antiagregantes plaquetários e reafirmaram a similaridade entre as ações do EDRF e NO (RADOMSKI e cols., 1987a). A inibição da adesividade pelo EDRF foi demonstrada em plaquetas humanas e esta ação se associava também com aumento nos níveis de  $GMP_c$  plaquetário (RADOMSKI e cols., 1987b).

#### 1.2.3.4 - Inativação

As respostas relaxadoras endotélio-dependentes são antagonizadas ou abolidas pela hemoglobina, altas concentrações de oxigênio, pelo azul de metileno e por ânions superóxidos. A hemoglobina e o azul de metileno são inibidores específicos. A primeira, além de ligar-se ao EDRF/NO em sua forma ferrosa (MARTIN e cols., 1985a) pode inativá-lo quimicamente à semelhança do que promove com o NO gerado pela reação com NVD (MARTIN e cols., 1985a, 1985b). O azul de metileno pode inibir tanto a guanilato ciclase (GRUETTER e cols., 1981a, 1981b), como o relaxamento endotélio-dependente produzido pelos indutores da liberação de EDRF/NO (FURCHGOTT, 1984; FURCHGOTT e cols., 1984a, 1984b), bem como o relaxamento endotélio-independente obtido pela ação dos NVD (GRUETTER e cols., 1981a, 1981b). O mecanismo inibitório do azul de metileno é complexo e não

parece depender apenas do bloqueio da guanilato ciclase so nível porquanto já pode ser demonstrada uma potenciação pelo corante do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (MONCADA e cols., 1988).

Processos de oxidação, notadamente os que se relacionam à geração de radicais superóxidos, são responsáveis pela rápida inativação do EDRF/NO. Substâncias como o pirogalol, geradora de oxigênio, são capazes de inibi-lo (IGNARRO e cols., 1988; MONCADA e cols., 1988), enquanto removedores de anions superóxidos, como a SOD, potencializam a ação do EDRF/NO (IGNARRO e cols., 1987b). Hoje sabe-se que a ação inibitória sobre o EDRF/NO desempenhada por substâncias como a hidroquinona, ditiotreitol, fenidona e BW 755C, decorrem da produção de oxigênio livre pelas mesmas.

A estabilidade do EDRF/NO pode também ser modificada por alterações do pH. Em condições de neutralidade ou de discreta alcalinidade a inativação ocorre rapidamente, mas pode ser revertida pela acidificação. O abaixamento do pH do meio para 2,0 permite a estabilidade do fator endotelial por vários dias (FRIDOVICH e cols., 1987).

A diminuição da temperatura do meio é outro fator de estabilização do EDRF/NO, o qual aumenta a sua capacidade de relaxamento se houver abaixamento térmico para 35°C, conforme demonstraram KARAKI & NAGASE (1987).

### 1.2.3.5 - Mecanismo de ação

O mecanismo através do qual o EDRF exerce seus e feitos vasculares e plaquetários confunde-se com aquele promovido pelo óxido nítrico. Uma cascata de eventos tem início com a ativação da guanilato ciclase solúvel (IGNARRO & KADOWITZ, 1985), num processo heme-dependente (MELLION e cols., 1983), para conversão da guanosina trifosfato em guanosina monofosfato cíclico ( $GMP_C$ ). A consequente ativação da proteína quinase C cálcio-dependente se traduz por modificações na fosforilação de proteínas do aparelho contrátil celular, ensejando o relaxamento do músculo liso arterial (FRIDOVICH e cols., 1987). O padrão de fosforilação proteica observada no músculo liso de aorta de rato submetido ao A 23187 e Ach (RAPOPORT e cols., 1983) é idêntico àquele que se observa quando a preparação é tratada com nitroprussiato de sódio ou com 8-bromo- $GMP_C$  (RAPOPORT e cols., 1982), caracterizando-se por fosforilação  $GMP_C$ -dependente e desfosforilação de miosina de cadeia leve.

A ativação da guanilato ciclase em músculo liso e plaquetas determina um acúmulo de  $GMP_C$  intracelular, o qual inibe não apenas o processo contrátil mas também a ativação plaquetária. Esta ação celular é exatamente igual aquela observada com os nitratos orgânicos, usados clínica e terapeuticamente como vasodilatadores.

O maior volume de informações sobre o EDRF à par

tir da descoberta de PALMER e cols. (1987) tornou-se possível mercê de uma metodologia na qual se associam técnicas já conhecidas (WEKSLER e cols., 1978; GRYGLEWSKI e cols., 1986), com a cultura de células endoteliais e bioensaios, onde a superfusão em cascata permitia a transferência do material ativo gerado pelas células endoteliais estimuladas, até células receptoras de preparações arteriais várias. Pode-se estabelecer assim estudos comparativos quanto ao padrão de resposta da substância endotelial que se supunha ser o EDRF com aquele promovido pelo óxido nítrico nas mesmas condições experimentais.

À partir de então vários foram os trabalhos realizados acerca da farmacologia comparativa do EDRF e do NO, todos mostrando resultados indistinguíveis quanto à vida média, ação relaxante sobre musculatura lisa vascular, ações antiagregante e desagregante em plaquetas, inativação, potenciação e inibição específica (IGNARRO e cols., 1987a, 1987b; MONCADA e cols., 1988; RADOMSKI e cols., 1987a) (Tabela II).

Todas as observações realizadas após os resultados de PALMER e cols. (1987) indicam que o EDRF/NO é o nitrovasodilatador endógeno e a guanilato ciclase, seu receptor (MONCADA e cols., 1988). Por ser extremamente sensível à inativação por oxigênio e hemoproteínas fica patente que, de todos os fatores considerados hoje como "hormônios locais" é o EDRF/NO o que menor probabilidade tem de circular, atuando localmente e de modo fugaz (IGNARRO, 1989). Por sua grande difusibilidade é transferido diretamente do en-

TABELA II - Farmacologia comparativa EDRF/Óxido Nítrico

	E D R F	ÓXIDO NÍTRICO
1 - Relaxamento de musculatura lisa vascular	FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980	
2 - Ativação da guanilato ciclase solúvel	IGNARRO e cols., 1986 FORSTERMANN, 1986	KATSUKI & MURAD, 1977 AXELSON e cols., 1979
3 - Relaxamento muscular <u>media</u> do por aumento de <u>GMP<sub>c</sub></u>	HOLZMANN, 1982 RAPOPORT & MURAD, 1983 FURCHGOTT & JOTHIANANDAN, 1983 DIAMOND & CHU, 1983 IGNARRO, 1985	MURAD e cols., 1979 GRUETTER e cols., 1980 GRUETTER e cols., 1981 IGNARRO e cols., 1981
4 - Efeitos plaquetários <u>media</u> dos por aumento de <u>GMP<sub>c</sub></u>	RADOMSKI e cols., 1987a,b	BOHME e cols., 1978 MELLION e cols., 1983 RADOMSKI e cols., 1987a
5 - Efeito inibitório sobre <u>re</u> laxamento vascular		
Azul de Metileno	HOLZMANN, 1982 FURCHGOTT e cols., 1984 MARTIN e cols., 1985b	MURAD e cols., 1979 GRUETTER e cols., 1980 GRUETTER e cols., 1981
Hemoproteínas	MARTIN e cols., 1985a MARTIN e cols., 1986 PALMER e cols., 1987	GRUETTER e cols., 1980 GRUETTER e cols., 1981 PALMER e cols., 1987
6 - Inibição da Agregação Plaquetária	AZUMA e cols., 1986 FURLONG e cols., 1987 RADOMSKI e cols., 1987a	RADOMSKI e cols., 1987a MELLION e cols., 1981

TABELA II - Continuação

	E D R F	ÓXIDO NÍTRICO
7 - Inibição da Adesividade Plaquetária	RADOMSKI e cols., 1987b	RADOMSKI e cols., 1987b
8 - Fosforilação de proteínas GMP <sub>c</sub> -dependente	RAPOPORT e cols., 1983	RAPOPORT e cols., 1982
9 - Vida Média		
Superfusão em cascata	3,6 ± 0,15 (PALMER e cols., 1987)	4,1 ± 0,25 (PALMER e cols., 1987)
Tubos de polipropileno	30,8 ± 1,9 (PALMER e cols., 1987)	30,4 ± 2,25 (PALMER e cols., 1987)
10 - Inativação por Oxigênio	RUBANYI & VANHOUTTE, 1986 MONCADA e cols., 1986 IGNARRO e cols., 1987a,b	IGNARRO e cols., 1987a,b
11 - Potenciação por SOD	IGNARRO e cols., 1987a,b GRYGLEWSKI e cols., 1986	RUBANYI & VANHOUTTE, 1986 PALMER e cols., 1987

dotélio para a célula do músculo liso e para plaquetas que estão em contacto com as células endoteliais onde é produzido.

A denominação Óxido Nítrico Endotélio-Dependente (Endothelium-Dependent Nitric Oxide - EDNO) é proposta por IGNARRO (1989) para identificar a substância cujas ações fisiológicas estão possivelmente relacionadas à modulação localizada, momento a momento, da vasodilatação secundária à alteração de fluxo (shear-stress) e da reatividade vascular.

#### 1.2.4 - Fator ativador de plaquetas

(Platelet-Activating-Factor - PAF)

Em 1960, MUIRHEAD e cols. demonstraram em animais nefrectomizados a ação antihipertensiva de um extrato de medula renal, denominando de "Antihypertensive Renomedullary Hormone (ARH)" ao princípio ativo nele contido. Ainda na década de 60, duas publicações independentes (BARBARO e cols., 1966; SIRAGANIAN & OSLER, 1970) chamavam a atenção para uma reação na qual leucócitos de coelhos sensibilizados promoviam a ativação de plaquetas, com consequente liberação de aminas vasoativas. Em 1972 BENVENISTE e cols. descreveram um fenômeno de ativação plaquetária induzido por uma substância produzida por basófilos de coelhos sensibilizados por IgE. Dois anos depois, semi-purificada e caracterizada como um novo mediador da anafilaxia, esta substância passou a denominar-se Fator Ativador de Plaquetas (Platelet

Activating Factor - PAF) (BENVENISTE, 1974) sendo posteriormente purificada e identificada como um fosfolipídio dependente de fosfolipase A<sub>2</sub> (BENVENISTE e cols., 1977).

Sequenciando as observações iniciadas por MUIRHEAD, PREWITT (1979) denominou de Antihypertensive Renomedullary Lipid (APRL) ao lipídio da medula renal com propriedades vasodilatadoras.

Finalmente, em 1979, três laboratórios independentes (DEMOPOULOS e cols.; BLANK e cols., 1979; BENVENISTE e cols., 1979), descreveram a estrutura química de uma nova classe de fosfolipídios, com atividade biológica idêntica às do PAF e do APRL, tornando implícita a semelhança entre este composto e aquele descrito por MUIRHEAD.

À partir de 1980, com a disponibilidade de preparações sintéticas (GODFROID e cols., 1980) as pesquisas sobre as ações do PAF tiveram amplo progresso. Foi entretanto a descoberta dos antagonistas do fosfolipídio (BRAQUET, 1984) que colaborou decisivamente para um verdadeiro avanço no seu conhecimento, o que tem resultado num número crescente de publicações sobre o tema.

#### 1.2.4.1 - Características bioquímicas

As denominações Platelet Activating Factor (PAF) e Acetyl-Glycerol-Ether-Phosphorylcholine (AGEPC) constituem uma sinonímia que tem sido largamente utilizada para identificar este fosfolipídio. Entretanto o conhecimento atual de sua estrutura química como 1-O-octadecil (ou hexa-

decil) 2-(R)-acetil-glicero-3-fosforilcolina (BENVENISTE e cols., 1979), fez com que a denominação PAF-aceter (ace pa ra acetato e éter da ligação alquil) passasse a ser, do pon to de vista bioquímico, a forma mais correta para a identificação do mediador lipídico.

As formas octadecil e hexadecil dizem respeito a duas espécies de PAF ( $C_{18}$  e  $C_{16}$ , na posição sn-1), produzidos por leucócitos de coelhos sensibilizados (HANAHAH e cols., 1980) ou por neutrófilos estimulados por A 23187 (HANAHAH, 1986). O PAF com cadeia 16:0 na posição sn-1 é mais ativo que o 18:0 (SATOUCHI e cols., 1981). A heterogeneidade das várias espécies moleculares do PAF é responsável pela existência de inúmeros análogos, com atividade biológica de diferentes graus de expressão e cujo significado fisiológico ainda não está totalmente elucidado (SNYDER, 1989). De particular importância são as substituições na posição 2 (acetil): a remoção do fragmento acil origina um liso-derivado destituído de qualquer atividade biológica e encontrado em inúmeros sistemas celulares (BLANK e cols., 1981).

As etapas biossintéticas são complexas e se iniciam com a ativação da fosfolipase  $A_2$ , a qual atua sobre os fosfolipídios da membrana celular num processo cálcio-dependente (BALLOU & CHEUNG, 1983). O PAF não é acumulado na célula, mas sim o precursor alquilacilglicero-fosfocolina. A biossíntese enzimática pode ocorrer através de duas vias diferentes, com características distintas: a primeira, via alquilacetilglicerol, é responsável pela manutenção dos níveis fisiológicos do fosfolipídio, tem a mais alta afinida-

de específica na célula em repouso e é a via biossintética predominante no rim; a segunda, via liso-PAF (forma inativa que sofre acetilação para formar PAF), está diretamente relacionada à resposta inflamatória e tem baixa atividade na célula em repouso (SNYDER, 1989). A inativação intracelular do PAF ocorre através da ação de duas acetilhidrolases, uma plasmática e outra citosólica (BLANK e cols., 1981) e conduz a formação de Liso-PAF. Deste modo a biossíntese do PAF pode ser resumida como sendo constituída por um processo bicíclico, no qual o liso-PAF é o produto intermediário, precursor ou metabólito, e onde os mecanismos de desacetilação e acetilação se alternam na dependência da via predominante, se sintética ou catabólica (VARGAFTIG & BRAQUET, 1987).

Os mecanismos de biossíntese e degradação aqui citados parecem ocorrer de modo semelhante "in vivo". Poucos minutos após a injeção endovenosa de  $[H^3]$ PAF é possível detectar em vários tecidos as formas alquilacilglicerofosfolina e Liso-PAF, assim como o próprio  $[H^3]$ PAF livre no plasma (BRAQUET e cols., 1987).

Os elementos que norteiam a resposta metabólica do PAF ainda não são totalmente entendidos, embora se conheça que o processo que regula a ação de seus receptores esteja relacionado ao "turnover" rápido de fosfoinosítídeos. As ações sinérgicas de ativação de proteína quinase C, liberação de ácido araquidônico, mobilização de cálcio e formação de  $GMP_c$  são todos eventos intracelulares decorrentes das várias etapas da fosforilação do fosfatidil

inositol (NISHIZUKA, 1984). A ativação da proteína quinase C e a mobilização do cálcio intracelular atuam como elementos de grande destaque na amplificação do sinal biológico do PAF (BRAQUET e cols., 1987). A proteína quinase C é responsável pela ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) na formação do composto intermediário Liso-PAF (McINTYRE e cols., 1987) estando os seus inibidores entre aquelas substâncias capazes de bloquear a síntese de PAF. O cálcio inibe várias enzimas participantes da síntese (LEE & SNYDER, 1985) e da degradação do fosfolopídio (TOUQUI e cols., 1987). Por outro lado, o cálcio é essencial para as etapas sintéticas via Liso-PAF. O AMP<sub>c</sub> parece ser o principal mediador inibitório dos processos que regulam o acoplamento estímulo-resposta, já que a elevação de seus níveis na célula é suficiente para bloquear a resposta celular ao PAF (BRAQUET e cols., 1987), embora o PAF também possa inibir a atividade da adenilatociclase (HASLAM e cols., 1982).

#### 1.2.4.2 - Propriedades farmacológicas

O PAF possui propriedades biológicas distintas e a atividade farmacológica das mesmas pode ser modificada na dependência da via de administração do fosfolopídio e da espécie animal estudada. As preparações de órgãos isolados e de tecidos, assim como também experimentos "in vivo" têm sido largamente empregadas para o estudo das complexas relações entre as ações farmacológicas e os diferentes tipos celulares sobre os quais atua o mediador.

A infusão endovenosa de PAF enseja respostas dose dependentes onde o efeito depressor, agudo e prolongado, sobre a pressão arterial, desponta como uma das principais características do fosfolipídio (BLANK e cols., 1979; McMANUS e cols., 1980; SANCHEZ-CRESPO e cols., 1983). Os efeitos hipotensores também se observam em ratos normais, nos da cepa SHR, e parecem não sofrer mediação de qualquer dos mecanismos conhecidos (CAILLARD e cols., 1982; SYBERTZ e cols., 1986). Em cães anestesiados a infusão endovenosa de PAF determina, além da hipotensão sisto-diastólica, redução do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica (SYBERTZ e cols., 1986). Em cobaias a administração endovenosa promove um quadro de anafilaxia cardíaca com liberação acentuada de histamina, prostaglandinas e PAF, redução da força de contração miocárdica e espasmo coronariano (BENVENISTE e cols., 1983). Outras ações farmacológicas têm sido descritas em modelos experimentais nos quais se utilizou a infusão intra-arterial para estudo seletivo de leitos vasculares. Assim é que em cães a injeção intra-coronariana de PAF reduz a pressão, o fluxo sanguíneo local, e a força contrátil do miocárdio (VEMULAPALLI e cols., 1984). A injeção intra-femural em cães também determina vasodilatação acentuada, mesmo no membro desnervado (SYBERTZ, 1986).

As alterações celulares determinadas pela infusão de PAF se caracterizam notadamente por migração e agregação rápida de plaquetas, com secreção de mediadores intracelulares (CHIGNARD e cols., 1979). Leucopenia devido a agregação e/ou quimiotaxia, diapedese e infiltração na parede vascu-

lar (McMANUS e cols., 1980; BOURGAIN e cols., 1985) compõem as principais manifestações leucotáxicas do mediador.

O PAF é capaz de promover ainda reações histamina-símile por suas ações leucotáxicas e vasoativas. A injeção intradérmica induz no homem uma reação inflamatória local onde se identifica uma resposta bifásica, na qual pontificam a migração de neutrófilos com infiltração perivascular e, numa fase mais tardia, surgimento de histiócitos e linfócitos no local (ARCHER e cols., 1985). O aumento da permeabilidade vascular, seguido de extravasamento plasmático e edema intersticial (BRAQUET e cols., 1984), independem da presença de plaquetas e neutrófilos, não sendo afetados pelo tratamento prévio com anti-histamínicos, anti-serotonérgicos e inibidores da ciclooxigenase (PIROTSKY & BENVENISTE, 1984). O PAF é considerado como um importante amplificador da reação inflamatória. É provável que exerça sua ação moduladora diretamente, afetando a superfície vascular, as interações célula-célula e as propriedades de substâncias participantes da reação inflamatória (HANAHAN, 1986). É provável também que interrelações se estabeleçam entre o PAF e outros mediadores como leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas (LEFORT e cols., 1984).

As reações do tecido pulmonar ao PAF são comparáveis àquelas observadas no decurso da crise asmática. VARGAFTIG e cols. (1980), utilizando o cobaio descreveram pela primeira vez o efeito "in vivo" do PAF sobre o pulmão. A resposta brônquica tem alguns aspectos que merecem desta-

que. Ao contrário da reação inflamatória cutânea, a broncoconstricção resultante da administração endovenosa do fosfolipídio é um fenômeno dependente da presença de plaquetas (VARGAFTIG e cols., 1980), fato inexistente quando o mediador é aplicado topicamente sob forma aerolizada (LEFORT e cols., 1984). Estudos morfológicos realizados em pulmões de coelhos e cobaias confirmaram que o PAF induz não apenas à agregação de plaquetas e neutrófilos, mas também promove contração de arteríolas e bronquíolos (VARGAFTIG & BRAQUET, 1987). A análise dos efeitos promovidos pelo PAF no desenvolvimento dos fenômenos de broncoconstricção não poderia excluir o desempenho de outras células, componentes tardios do processo inflamatório e/ou anafilático. Inúmeros elementos celulares podem contribuir para a liberação de PAF no tecido pulmonar, incluindo basófilos, mastócitos e macrófagos alveolares (FITZGERARD e cols., 1986). O PAF exerce grande poder quimiotático sobre os eosinófilos, induzindo não somente a mobilização destas células ao sítio de reação como também promovendo acentuada desgranulação (WARDLAW & KEY, 1986).

#### 1.2.4.3 - PAF no rim ,

CAMUSSI e cols., em 1977, estudando cortes renais submetidos à estimulação antigênica, identificaram a liberação de uma substância com características semelhantes à do PAF. Posteriormente cultura de células renomedulares substanciaram a primeira evidência da liberação ativa de

PAF pelo rim na ausência de células sanguíneas (PIROTSKY & BENVENISTE, 1981). A liberação de PAF sob estímulo imunológico e o reconhecimento de sua produção pelas células corticais renais, sugeriram a participação do fosfolipídio nas doenças glomerulares (PIROTSKY & BIDAULT, 1983). O PAF também pode ser produzido no rim isolado de rato em resposta ao ionóforo A 23187, simultaneamente com outros mediadores (PIROTSKY e cols., 1984).

A tentativa de identificar a origem celular do PAF no rim tem conduzido a inúmeros experimentos com glomerulos e túbulos isolados, além de culturas de células medulares e mesangiais. Os túbulos renais não produzem o fosfolipídio e a identificação do precursor Liso-PAF e de atividade de acetiltransferase em duas populações celulares renais, vinculam a produção de PAF ao glomérulo e às células medulares (PIROTSKY e cols., 1983, 1984). SCHLONDORFF e cols. (1986) puderam detectar expressiva produção de PAF em cultura de células mesangiais de rato estimuladas com A 23187.

Os estudos pioneiros sobre os efeitos do PAF na função renal demonstraram que a infusão venosa do mediador em cães anestesiados se fazia acompanhar por diminuição acentuada nos clearances de creatinina e ácido para-aminohi-púrico, além de redução importante do fluxo urinário (BESSIN e cols., 1983). VEMULAPALLI e cols. (1984) demonstraram em cães anestesiados efeitos caracterizados por redução do fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular, e de considerável diminuição na excreção urinária de sódio. I

nicialmente estes resultados foram interpretados como decorrentes da hipotensão sistêmica que se instalava com a in fusão do fosfolipídio. Entretanto o tratamento prévio dos a nimais com inibidores de ciclooxigenase, se por um lado reverteu os efeitos hipotensores, não foi capaz de alterar os parâmetros renais (HÉBERT e cols., 1987). Essas evi dências mostraram que os efeitos do PAF sobre o rim eram di retos, não mediados por prostaglandinas e independentes das variações tensionais sistêmicas. Em ratos a infusão de PAF não modifica a pressão arterial nem diminui a taxa de filtração glomerular, mas é capaz de induzir ao aumento na reabsorção de sódio, cálcio e magnésio (FRIEDLANDER e cols., 1987). Não deve ser esquecido o fato do PAF ser um potente estimulador da produção renal de prostaglandinas e tromboxanos (WEISMAN e cols., 1985; KAWASAKI & NEEDLEMAN, 1982). É provável que as modificações no fluxo plasmático renal que se seguem à infusão do fosfolipídio sejam mediadas, em parte pelos efeitos do PAF diretamente no rim, mas também pela liberação secundária, por células renais, de me diadores com ações diretas sobre a produção renal do pró prio PAF. A infusão de PAF em artéria renal de cães anestesiados foi capaz de determinar acentuada redução da taxa de filtração glomerular, do fluxo sanguíneo renal, do volu me urinário e da excreção de sódio (SCHERF e cols., 1986).

Em decorrência das semelhanças nas propriedades hipotensoras, as possíveis interrelações entre PAF e Fator Natriurético Atrial (ANF) têm sido investigadas. Ao contrário do PAF, o ANF promove "in vivo" substancial aumento do

fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular e do volume de excreção urinário de sódio. THIEVANT e cols. (1987) estudando os efeitos das duas substâncias em rins de cães sob anestesia, sugeriram a existência de um possível mecanismo de feed-back entre o fosfolipídio e o peptídeo natriurético, à semelhança do que já foi demonstrado entre prostaglandinas e angiotensina (AIKEN, 1974).

As investigações para determinar a natureza dos estímulos fisiológicos na formação do PAF pelas células renais e os efeitos do mesmo sobre os parâmetros funcionais do órgão, têm merecido especial atenção. As interrelações entre o fosfolipídio e outros sistemas mediadores renais com expressões diversas quanto à vasoatividade, a participação do PAF em processos renais de natureza inflamatória, como em doenças autoimunes e na rejeição pós-transplante, deixam antever a riqueza e a complexidade de seu papel na fisiopatologia renal (BRAQUET e cols., 1987a).

#### 1.2.4.4 - Inibidores do PAF

Um marco importante no estudo das ações biológicas e das propriedades farmacológicas do PAF foi a descoberta de compostos antagonistas do mediador. A disponibilidade de preparações sintéticas do fosfolipídio permitiu a progressiva identificação de várias substâncias com propriedades inibitórias, capazes de interferir em etapas-chave da biossíntese e/ou metabolismo. Algumas delas como os bloqueadores de canais de cálcio (COEFFIER e cols., 1983; KHAN e

cols., 1985), os antagonistas da calmodulina (LEVY, 1983) e a mepacrina (BENVENISTE e cols., 1981; ALBERT & SNYDER, 1983), deixam entrever a participação decisiva do cálcio e da fosfolipase  $A_2$  nas etapas biossintéticas. Outros compostos como o TRH, naloxano, antagonistas de tromboxanos e leucotrienos (FEUERSTEIN e cols., 1985; CHILTON e cols., 1982), além de várias substâncias aqui não citadas, antagonizam os efeitos do PAF sobre sistemas celulares vários. Agindo indiretamente, estas substâncias exercem uma ação antagônica inespecífica. Foi entretanto a descoberta de inibidores específicos do PAF que promoveu um enorme salto no conhecimento das ações biológicas e farmacológicas de mediador, abrindo caminho para o surgimento de um número crescente de novos compostos naturais ou sintéticos, com ações antagônicas potentes.

Os antagonistas específicos do PAF englobam hoje uma vasta gama de substâncias bioquimicamente distintas, algumas análogas do PAF porém destituídas de ação agonista, muitas derivadas de produtos naturais, outras obtidas sinteticamente, mas todas com uma propriedade comum: inibir competitivamente o acoplamento do fosfolipídio ao receptor celular.

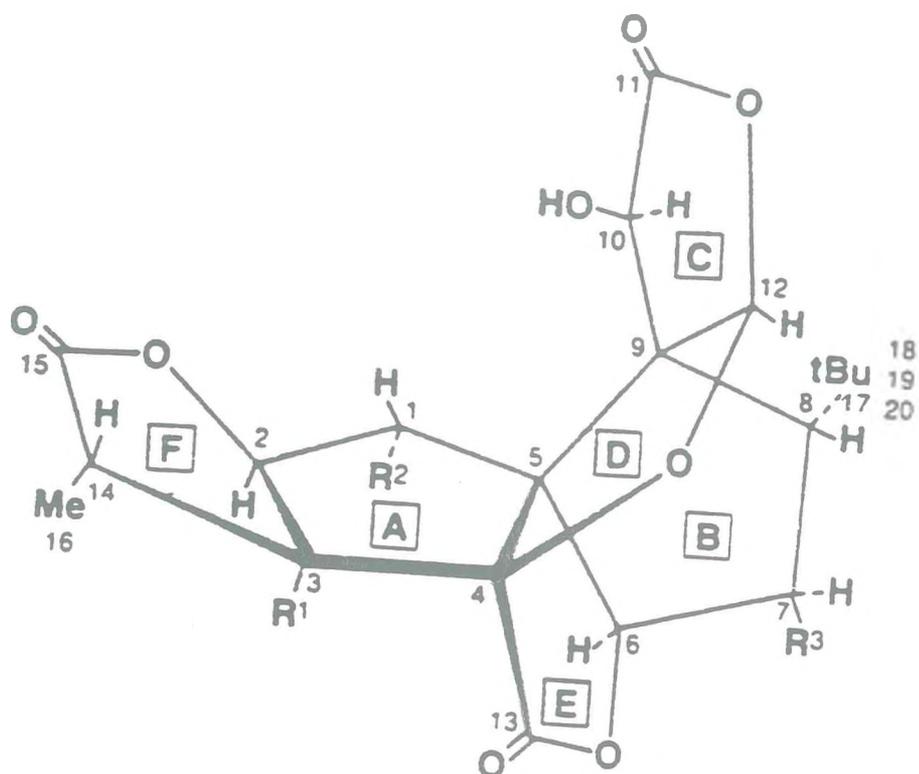
#### 1.2.4.3.1 - Antagonistas naturais

Uma série de compostos naturais com propriedades antagônicas ao PAF está representada pelos derivados da *Ginkgo biloba*, árvore milenar chinesa, componente da farmacopeia popular, cujas folhas em infusão eram utilizadas em inalações para o tratamento da asma e da bronquite. Os compostos extraídos das folhas e raízes foram identificadas como ginkgolídios e embora tenham sido primeiramente isolados em 1932 por FURUKAWA, sua estrutura só veio a se tornar conhecida a partir de 1967 com os trabalhos de MARUYAMA e cols. (1967). Contribuiu para isto o fato de serem os ginkgolídios possuidores de uma complexa estrutura molecular, bastante peculiar, de 20 carbonos, na qual estão incorporadas, em 6 anéis fusionados de 5 elementos cada (A a F), um grupo tetrahydrofurano cíclico, três grupos lactônicos e um espiro-nonane (Figura 2). Embora a estrutura molecular básica seja idêntica em todos os compostos, diferenças no número e na posição de grupos hidroxilas em  $C_1$ ,  $C_3$  e  $C_7$  determinam o surgimento de isômeros denominados ginkgolídios A, B, C, J e M, cuja correspondência à nomenclatura adotada pelo Instituto Henri Beaufour (Paris, França) e utilizada neste trabalho, pode ser vista na Figura 2.

Em 1984 BRAQUET demonstrou que o extrato dessecado de folhas de *Ginkgo biloba* era capaz de inibir seletivamente a agregação plaquetária induzida pelo PAF. A partir de então a disponibilidade do extrato natural tornou possí-

FIGURA 2 - Estrutura dos ginkgolídeos

- a) Representação esquemática dos ginkgolídeos A, B, C, J e M com a respectiva nomenclatura adotada pelo Instituto Henri Beaufour (IHB) e utilizada neste trabalho.
- b)  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  referem-se ao número e posições dos grupos hidroxilas nos carbonos  $C_1$ ,  $C_3$  e  $C_7$  do núcleo espirononane.



GINKGOLIDIO	I H B	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
A	BN 52020	OH	H	H
B	BN 52021	OH	OH	H
C	BN 52022	OH	OH	OH
J	BN 52024	OH	H	OH
M	BN 52023	H	OH	OH

vel uma extensa produção científica que elucidava a cada etapa novas e surpreendentes propriedades destas substâncias no bloqueio às ações do mediador fosfolipídio, tanto "in vitro" como "in vivo" (BRAQUET e cols., 1987a), deixando antever o imensurável potencial terapêutico dos ginkgolídeos.

A principal característica destes compostos é a propriedade inibitória sobre a ligação do PAF com seu receptor celular. A utilização de  $[H^3]$  PAF em plaquetas humanas e de coelhos demonstra que esta inibição é competitiva, dose-dependente e altamente específica, já que os ginkgolídeos não interagem com nenhum outro sistema de receptores conhecidos (BRAQUET e cols., 1985). Os valores obtidos para  $IC_{50}$  demonstram que o BN 52021 ( $2,5 \times 10^{-7}M$ ) é o mais potente antagonista, seguido pelo BN 52020 ( $7,4 \times 10^{-7}M$ ), estando o BN 52022 ( $7,1 \times 10^{-6}M$ ) e o BN 52024 ( $5,4 \times 10^{-5}M$ ) entre aqueles de menor expressão competitiva frente ao receptor de membrana do fosfolipídio (BRAQUET, 1984; BRAQUET e cols. 1985). Recentemente COREY e cols. (1988) obtiveram a síntese total dos ginkgolídeos.

#### 1.2.4.3.2 - Antagonista sintético

Dentre os poucos produtos sintéticos com propriedades antagonistas ao PAF está o 48740 RP (SEDIVY e cols., 1985) ou 3-(3-piridil)-1H,3H pirrolo [1,2-c]tiazol-carboxamida. O 48740 RP apresenta-se como inibidor competitivo "in vitro", sem ação inibitória sobre ciclooxigenase, lipooxigenase, fosfolipase  $A_2$  e fosfodiesterase (SEDIVY e cols., 1985). Esta ação inibitória entretanto não é seleti-

va já que o composto interfere com a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico, U 46619 (tromboxanomimético), colágeno e altas concentrações de trombina (citado em BRAQUET e cols., 1987a).

O 48740 RP é capaz de inibir em coelhos a trombocitopenia e o edema cutâneo desencadeados pela administração endovenosa e intradérmica de PAF, respectivamente. Outros efeitos incluem a proteção ao broncoespasmo em cobaias, e à fibrinólise e hipotensão em ratos (SÈDIVY e cols., 1985).

#### 1.2.4.3.3 - Antagonistas farmacológicos

KORNECKI e cols. (1984) demonstraram que os triazolobenzodiazepínicos, agentes psicotrópicos usados clinicamente como ansiolíticos e hipnóticos, eram capazes de inibir a resposta agregante plaquetária induzida pelo PAF. Este composto, derivado benzodiazepínico com anel triazol, exerce seus efeitos anti-PAF independentemente de suas ações hipnóticas e sedativas conforme demonstraram CASALS-STENZEL & WEBER (1987).

Os efeitos inibitórios sobre a agregação de plaquetas humanas são específicas para o PAF já que não se reproduzem quando o indutor é ácido araquidônico, colágeno, A 23187 ou trombina.

Recentemente foi sintetizado um novo triazolobenzodiazepínico destituído de efeito hipnótico e capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo PAF. Este composto, WEB 2086 (CASALS-STENZEL e cols., 1986), à semelhança

de outros antagonistas específicos, é capaz de inibir em a n i m a i s de e x p e r i m e n t a ç ã o o s e f e i t o s c i r c u l a t ó r i o s e b r õ n q i c o s d a i n f u s ã o d e P A F (CASALS-STENZEL & WEBER, 1987).

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Procedimento cirúrgico

Coelhos California, de ambos os sexos, provenientes da Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará pesando em média 1,5kg, eram mantidos em jejum alimentar e com ingestão de água "ad libitum" nas 24 horas prévias aos experimentos, realizados no Laboratório de Farmacologia Renal e Metabólica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais eram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital, 50mg/kg de peso, e em seguida tratados com 500U de heparina/kg de peso, administrada por injeção endovenosa na veia marginal da orelha. Uma incisão abdominal mediana permitia evidenciar as vísceras, as quais, rebatidas para a direita, expunham o rim esquerdo, o primeiro a ser excisado. Após limpeza cuidadosa da gordura perirrenal, eram expostos e identificados os vasos renais, procedendo-se a ligadura da artéria renal bem próximo à aorta abdominal. A veia renal era seccionada junto à pelve renal e o ureter, em seu terço-médio. A transferência do rim para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (KH) (KREBS & HENSELEIT, 1932) ocorria imediatamente para permitir a canulação arterial com tubo de polietilenó PE 50. Iniciava-se de imediato infusão com solução de KH, ao mesmo tempo em que o ureter era também canulado com tubo de polietileno. Garantidos perfusão renal e fluxo ureteral, procedia-se à descapsulação renal, realizada com

extrema cautela, para evitar laceração do parenquima. O rim era então levado ao sistema onde recebia solução de KH com pH 7.2 - 7.3, aerado com mistura de 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, com temperatura média de 37°C, decorridos, em média 4 minutos desde a ligadura da artéria renal. Mantendo-se o animal anestesiado procedia-se a retirada do rim direito após 120 minutos, seguindo-se os mesmos tempos cirúrgicos já descritos.

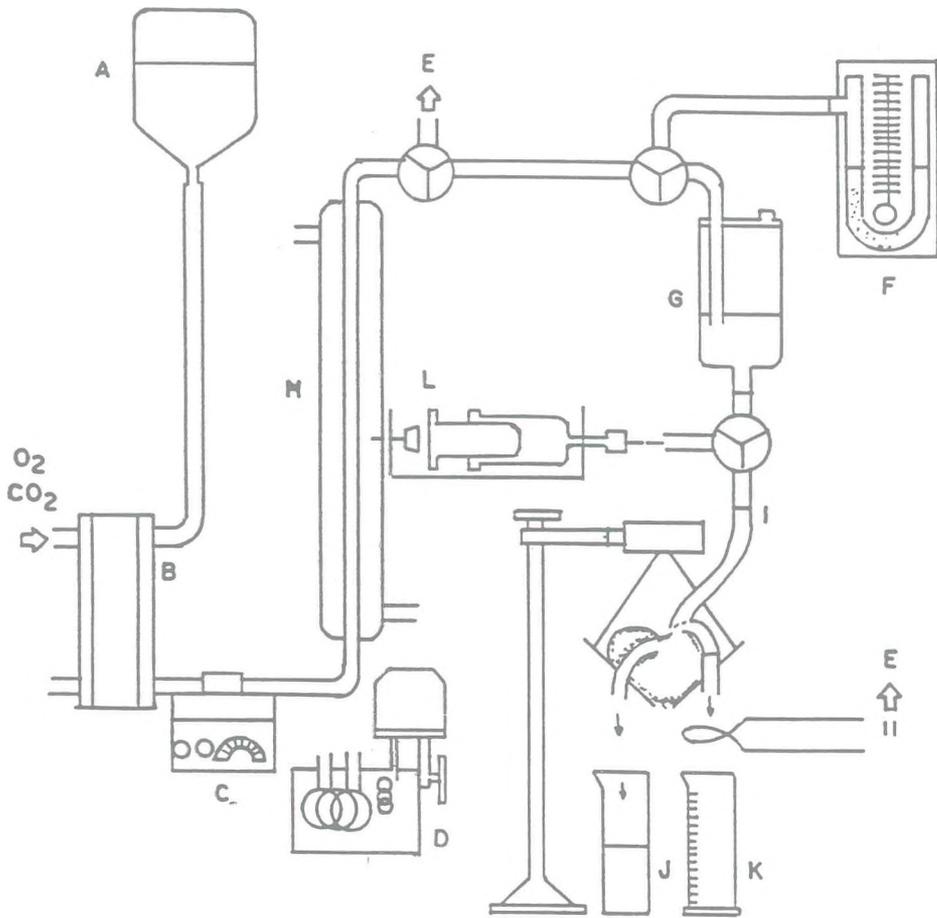
## 2.2 - Sistema de perfusão

O sistema de perfusão adotado é o mesmo descrito por FONTELES e cols. (1973) e sua principal característica é a de ser aberto e utilizar perfusato sem recirculação. Detalhes técnicos mais ilustrativos podem ser observados na Figura 3. Esquemáticamente, o sistema é composto por:

- a) Bomba peristáltica marca Gilson Minipuls II, previamente calibrada para perfusão de 7,7 ml/minuto;
- b) Membrana silástica Travenol para oxigenação, acoplada à bomba de perfusão e por onde circula o perfusato aerado, com pH final entre 7,2-7,4;
- c) Sistema de aquecimento composto por termostato com temperatura mantida em  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- d) Permutador de calor constituído por ampola de vidro;
- e) Bomba de Infusão Imbracrios, calibrada para in

FIGURA 3 - Sistema de Perfusão

- A - Reservatório
- B - Membrana oxigenadora
- C - Bomba de Perfusão
- D - Termostato
- E - Válvula de controle de bolhas
- F - Manômetro de Mercúrio
- G - Catabolhas
- I - Cânula Arterial
- J - Depósito de Perfusato
- K - Proveta coletora de urina
- L - Bomba de Infusão
- M - Permutador de Calor



fusão de 0,11ml/minuto.

- f) Manômetro de Mercúrio para registro das variações na pressão de perfusão;
- g) Quimógrafo para registro gráfico das variações da pressão de perfusão.

### 2.3 - Medidas fisiológicas

Foram estudadas as seguintes medidas da dinâmica de perfusão renal:

- a) Pressão de Perfusão (PP): refere-se à pressão existente em todo o leito vascular renal, e registrada a intervalos de 5 minutos ao longo de todo o experimento. É medida por manômetro e expressa em mmHg.
- b) Fluxo do Perfusato (FP): coletado e medido a intervalos de 10 minutos. Resultado é expresso em ml/g/min., correspondendo ao valor medido, dividido pelo intervalo de tempo respectivo e pelo peso do rim.

$$FP = \frac{\text{volume (ml)}}{\text{Tempo (min.)}} \div \text{peso do rim (g)}.$$

- c) Fluxo Urinário (FU): coletado e medido no mesmo intervalo de tempo do fluxo do perfusato, tem o seu cálculo e expressão também semelhante ao primeiro.

$$FU = \frac{\text{volume (ml)}}{\text{Tempo (min.)}} \div \text{peso do rim (g)}$$

- d) Resistência (R): A resistência vascular foi calculada dividindo-se a média da pressão de perfusão (mmHg) pelo fluxo do perfusato (ml/g/min.):

$$R = \frac{PP \text{ (mmHg)}}{FP \text{ (ml/g/min.)}}$$

- e) Escape Vascular (E): Consideramos haver presença de escape renovascular quando, à pressão máxima obtida com a infusão de noradrenalina (NOR), registrava-se decréscimo da pressão de perfusão, independentemente de situarem-se os valores mínimos ao final do período de infusão do  $\alpha$  agonista. O escape foi calculado segundo HENRICH & LUTZ (1971) e FARA & ROSS (1972), adaptada por FONTELES e cols. (1974), sendo expresso em percentagem de acordo com o que se segue:

$$\% E = \frac{P_{mx} - P_{mn}}{P_{mx} - P_i} \times 100$$

$P_{mx}$  é a pressão de perfusão máxima obtida após a infusão da substância vasoconstrictora;  $P_{mn}$  é a pressão de perfusão mínima observada durante a infusão de NOR e  $P_i$  é a pressão de perfusão registrada imediatamente antes da infusão do  $\alpha$  agonista.

- f) Taquifilaxia: a observação gráfica das curvas de infusão de NOR caracterizam-se por uma tendência à queda dos valores tensionais máximos,

ao longo de todo o experimento. Assim a observação de três curvas de infusão de NOR intercaladas por períodos de lavagem da preparação, mostra uma tendência ao decaimento dos níveis tensionais. Inexistem expressões matemáticas para a taquifilaxia.

#### 2.4 - Protocolo de perfusão

Logo após colocação no sistema o rim era perfundido com solução KH (mM/L: NaCl 120, KCl 3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,62,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  14,  $NaHCO_3$  25,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  2, glicose 8) contendo 1000 U de heparina/litro de solução, tendo os tempos experimentais sido divididos em:

- a) Período de Controle (20 minutos): necessário à lavagem do leito vascular renal, retirada de restos sanguíneos e estabilização da pressão de perfusão:
- b) Períodos de Infusão de Noradrenalina (20 minutos): compostos de 3 etapas, iniciada a primeira imediatamente após o período de controle;
- c) Períodos de Lavagem (10 minutos cada): lavagem com líquido de perfusato, intercalada aos períodos de infusão de NOR.

Com exceção dos experimentos com Colagenase e Azul de Metileno, todas as demais substâncias estudadas foram adicionadas à solução de KH. Os Ginkgolídeos (BN 52021, BN 52022 e BN 52024) e o inibidor de lipooxigenase EP 10 161, foram diluídos previamente em dimetilsulfóxido (DMSO).

O estudo dos efeitos dos vários tratamentos sobre o escape vascular e a taquifilaxia no rim isolado e infundido com noradrenalina, ensejou a formação de quatro grupos experimentais:

- a) Reatividade adrenérgica (n = 26)
  - a.1 - Rins com cápsula (n = 6)
  - a.2 - Rins sem cápsula (n = 10)
  - a.3 - Rins perfundidos com dimetilsulfóxido (DMSO) (n = 10)
  
- b) Bloqueio da ação do EDRF (n = 20)
  - b.1 - Infusão de Colagenase (n = 7)
  - b.2 - Infusão de Azul de Metileno (n = 6)
  - b.3 - Perfusão com EP 10 161 (n = 7)
  
- c) Estudo com Eterfosfolipídios (n = 14)
  - c.1 - Perfusão com PAF (n = 7)
  - c.2 - Perfusão com Liso-PAF (n = 7)
  
- d) Bloqueio de receptores do PAF (n = 35)
  - d.1 - Com antagonistas naturais
    - d.1.1 - BN 52021 (n = 7)
    - d.1.2 - BN 52022 (n = 7)
    - d.1.3 - BN 52024 (n = 7)
  - d.2 - Com antagonista sintético
    - d.2.1 - 48740 RP (n = 7)
  - d.3 - Com antagonista farmacológico
    - d.3.1 - WEB 2086 (n = 7)

## 2.5 - Produtos químicos

2.5.1 - Reagentes utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit (NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Glicose): Merck.

2.5.2 - Reagentes utilizados no preparo da solução vasoconstritora (Bitartarato de Noradrenalina, Ácido Ascórbico): Sigma.

2.5.3 - Solvente orgânico  
Dimetilsulfóxido: Merck

2.5.4 - Inibidores do Relaxamento Endotélio Dependente  
Colagenase: Sigma  
Azul de Metileno: Reagen  
EP 10161: IHB - IPSEN (France)

2.5.5 - Anticoagulante  
Heparina: Roche

2.5.6 - Anestésico  
Pentobarbital sódico: Merck

2.5.7 - Eterfosfolipídios  
PAF: Bachem, Switzerland (1-alkuil-2-acetil-glicero fosfocolina)

Liso-PAF: Bachem, Switzerland

(1-alkil-2-liso-glicerofosfocolina).

Albumina bovina (Sigma)

#### 2.5.8 - Antagonista do PAF

Ginkgolídio B (BN 52021), Ginkgolídio C (BN 52022)  
e Ginkgolídio J (BN 52024): IHB-IPSEN, Le Plessis  
Robinson, France

48740 RP: Rhone - Poulenc, France

WEB 2086: Böerhinger - Ingelheim, Germany

PAF e os ginkgolídios BN 52021, BN 52022 e BN 52024 foram-nos presenteados pelo Dr. Pierre Braquet, Laboratório de Pesquisas Henri Beaufour, França. 48740 RP e Liso-PAF foram-nos doados pelo Dr. Boris B. Vargaftig, Instituto Pasteur, França. WEB 2086 foi-nos gentilmente cedido pelo Laboratório Böerhinger - Ingelheim, Alemanha.

#### 2.6 - Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística em computador PC com programa STRATGRAPHICS, versão 210. Os seguintes cálculos foram efetuados: média, desvio padrão, erro padrão da média, mediana, variância e estatística-t com um nível de confiança de 95%.

O procedimento inicial objetivou a pesquisa de flutuações de parâmetros nas populações (subgrupos) que compunham cada grupo experimental, sendo para tanto utilizada

estatística t.

Os efeitos dos vários tratamentos sobre a fisiologia renal foram estudados através de análise de variância para comparação de valores referentes à pressão de perfusão, resistência e escape vascular, nas três fases do experimento correspondentes à infusão de noradrenalina.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Reatividade adrenérgica

Os resultados do estudo da reatividade adrenérgica do rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit (KH) e infundido com noradrenalina (NOR) são apresentados nas Tabelas III, IV, V e VI. Neste grupo foram analisados rins com cápsula previamente removida (n = 10), rins com cápsula íntegra (n = 6) e rins com cápsula removida e perfundidos com dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado em preparações de outros subgrupos.

##### 3.1.1 - Rins descapsulados

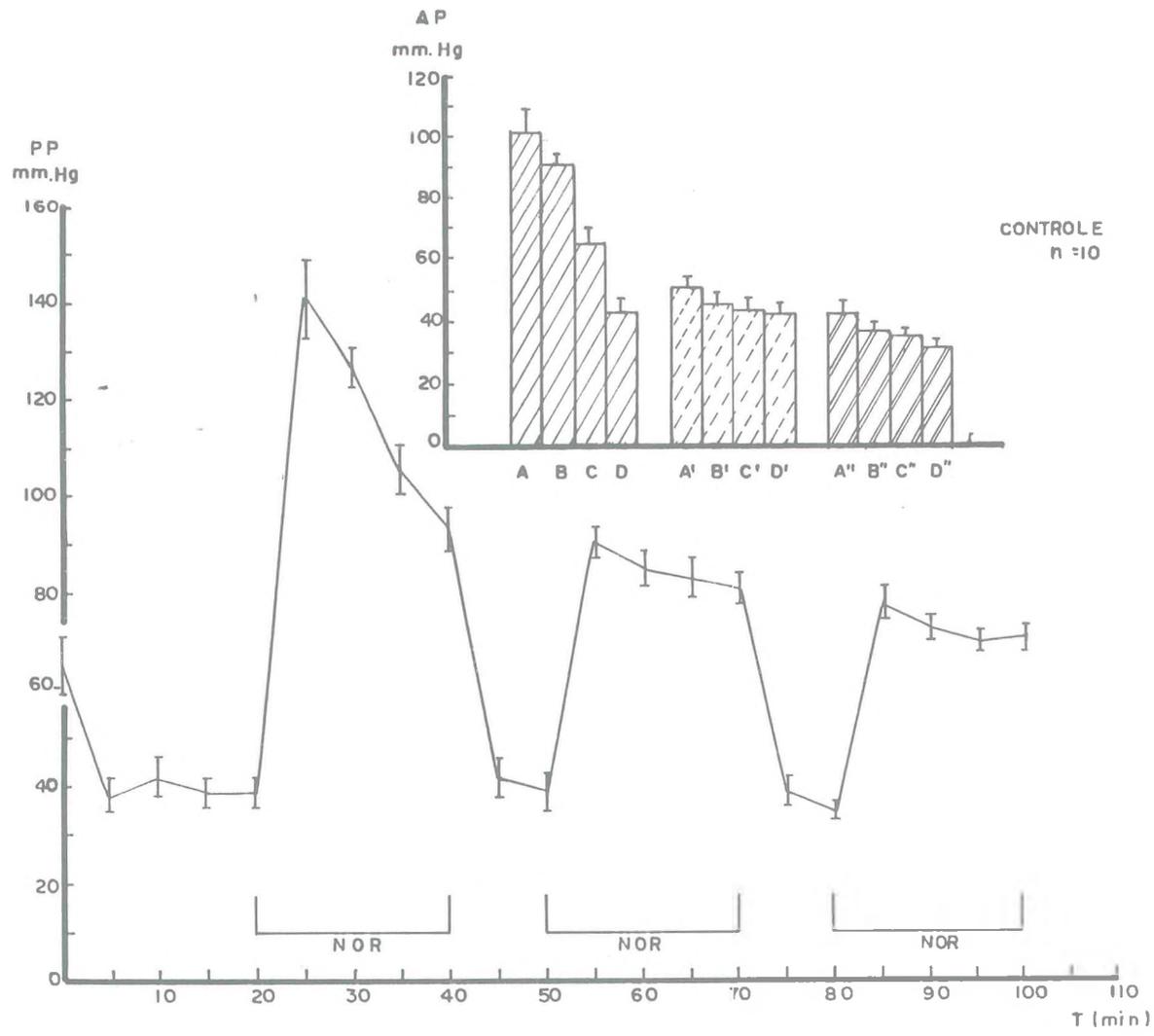
As Tabelas III e VI mostram os resultados dos parâmetros deste subgrupo. Os rins descapsulados foram utilizados como controle de todos os experimentos. Durante os vinte minutos iniciais da perfusão, período no qual a preparação é lavada com solução de KH aerada, com pH 7.2 e temperatura de  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , observa-se uma nítida tendência à estabilização da pressão de perfusão e aumento gradual do fluxo urinário. A infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}\text{M}$ ) durante 20 minutos, sob fluxo constante, determina rápido incremento da pressão de perfusão, a qual atinge seus mais altos valores durante os primeiros 10 minutos (Figura 4). O fenômeno do escape vascular po-

TABELA III - Dinâmica de perfusão de rins de coelho, descapsulados, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e infundidos com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6} M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	65,20 $\pm$ 6,44			
	5	38,60 $\pm$ 3,46			
	10	42,10 $\pm$ 4,34	55,44 $\pm$ 13,97	0,038 $\pm$ 0,006	1,002 $\pm$ 0,108
	15	39,20 $\pm$ 3,03			
	20	39,60 $\pm$ 3,06	51,16 $\pm$ 9,89	0,045 $\pm$ 0,008	0,901 $\pm$ 0,085
NOR	25	140,80 $\pm$ 8,04			
	30	126,80 $\pm$ 3,89	145,02 $\pm$ 14,73	0,038 $\pm$ 0,008	0,962 $\pm$ 0,076
	35	105,60 $\pm$ 5,09			
	40	93,20 $\pm$ 4,83	101,60 $\pm$ 12,27	0,039 $\pm$ 0,007	0,990 $\pm$ 0,074
LAV	45	42,00 $\pm$ 4,49			
	50	39,00 $\pm$ 3,99	46,61 $\pm$ 10,98	0,080 $\pm$ 0,013	1,009 $\pm$ 0,022
NOR	55	90,10 $\pm$ 3,50			
	60	85,60 $\pm$ 3,67	92,40 $\pm$ 11,03	0,050 $\pm$ 0,008	1,007 $\pm$ 0,078
	65	83,40 $\pm$ 3,81			
	70	81,90 $\pm$ 3,60	91,63 $\pm$ 9,86	0,051 $\pm$ 0,007	1,000 $\pm$ 0,069
LAV	75	39,00 $\pm$ 3,18			
	80	35,80 $\pm$ 1,98	39,21 $\pm$ 4,75	0,093 $\pm$ 0,015	0,988 $\pm$ 0,078
NOR	85	78,40 $\pm$ 3,53			
	90	73,60 $\pm$ 2,68	81,84 $\pm$ 9,82	0,062 $\pm$ 0,010	0,978 $\pm$ 0,078
	95	70,40 $\pm$ 2,39			
	100	71,40 $\pm$ 2,72	78,10 $\pm$ 8,49	0,059 $\pm$ 0,008	0,979 $\pm$ 0,076

FIGURA 4 - Efeitos da infusão de noradrenalina no rim de coelho, isolado e perfundido, previamente descapsulado (Rins Descapsulados).

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins descapsulados, submetidos à infusão repetida de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), durante três períodos consecutivos de 20 minutos.
- b)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores pressóricos basais e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- c) Resultados referentes a 10 experimentos (n = 10), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



de ser observado já nos primeiros 5 minutos da infusão de NOR e se continua durante todo o período de infusão do  $\alpha$  agonista (Figura 4). A resistência vascular também sofre substancial incremento e concomitantemente observa-se marcante redução do fluxo urinário, enquanto o fluxo do perfusato tende a se manter inalterado.

Após o primeiro período de infusão de NOR, a lavagem com solução de KH durante 10 minutos, permite a recuperação da preparação, fazendo cair a pressão de perfusão e a resistência para níveis basais, enquanto o fluxo urinário aumenta para valores superiores àqueles do período controle (Tabela III).

A infusão de NOR nas duas etapas subsequentes, cada uma de 20 minutos, intercaladas por lavagem durante 10 minutos, mostra respostas nítidamente taquifiláticas. A pressão de perfusão máxima atinge valores menores a cada nova infusão do  $\alpha$  agonista (Figura 4), sendo acompanhada também de decréscimo acentuado da resistência vascular.

O fluxo urinário cai durante a infusão do  $\alpha$  agonista, mas os valores registrados durante as duas etapas são maiores que os observados durante a primeira curva de NOR (Tabela III).

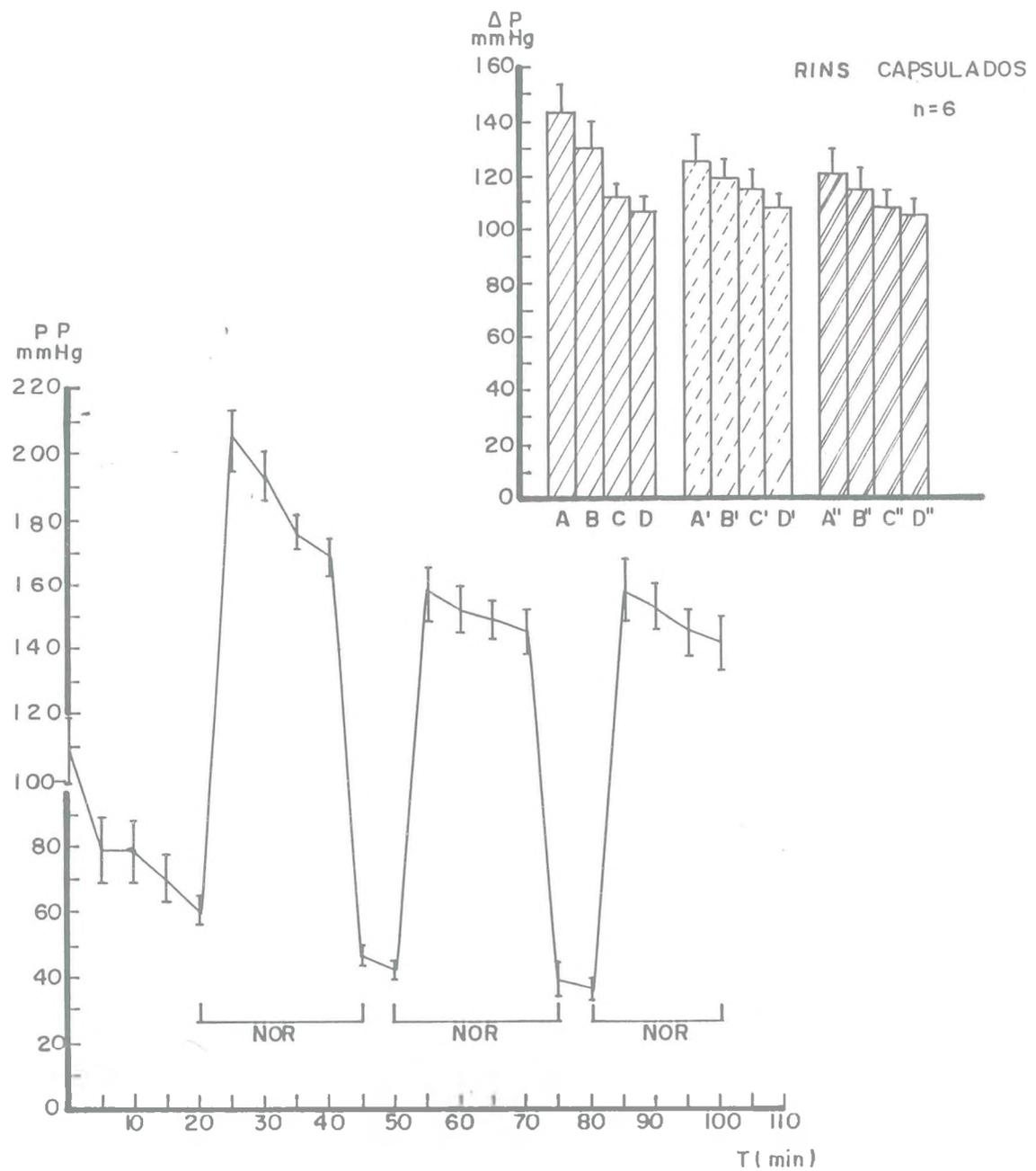
A percentagem de escape vascular tende a diminuir nas duas infusões subsequentes conforme pode ser observado na Tabela VI. A Figura 4 mostra a representação gráfica do escape e taquifilaxia noradrenérgicos neste subgrupo controle.

TABELA IV - Sumário da dinâmica de perfusão de rins de coelho com cápsula renal, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e infundidos com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$ E.P.M

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
CONTROLE	0	108,33 $\pm$ 10,75			
	5	79,33 $\pm$ 9,03			
	10	79,66 $\pm$ 9,44	74,84 $\pm$ 11,90	0,076 $\pm$ 0,021	1,261 $\pm$ 0,100
	15	71,00 $\pm$ 5,15			
	20	62,33 $\pm$ 6,04	65,15 $\pm$ 7,81	0,066 $\pm$ 0,019	1,055 $\pm$ 0,070
NOR	25	205,33 $\pm$ 10,31			
	30	192,16 $\pm$ 8,61	204,90 $\pm$ 16,62	0,043 $\pm$ 0,011	1,016 $\pm$ 0,101
	35	174,66 $\pm$ 7,78			
	40	168,33 $\pm$ 7,31	163,71 $\pm$ 15,12	0,029 $\pm$ 0,009	1,106 $\pm$ 0,115
LAV	45	47,33 $\pm$ 2,82			
	50	43,00 $\pm$ 2,82	43,94 $\pm$ 6,34	0,076 $\pm$ 0,014	1,118 $\pm$ 0,126
NOR	55	168,00 $\pm$ 9,42			
	60	162,33 $\pm$ 8,07	169,70 $\pm$ 16,24	0,041 $\pm$ 0,010	1,030 $\pm$ 0,104
	65	159,33 $\pm$ 6,28			
	70	150,33 $\pm$ 6,87	150,27 $\pm$ 13,80	0,038 $\pm$ 0,009	1,086 $\pm$ 0,111
LAV	75	41,00 $\pm$ 1,75			
	80	38,00 $\pm$ 2,50	40,14 $\pm$ 5,35	0,086 $\pm$ 0,016	1,068 $\pm$ 0,120
NOR	85	158,33 $\pm$ 9,75			
	90	152,00 $\pm$ 7,06	155,27 $\pm$ 15,39	0,043 $\pm$ 0,009	1,051 $\pm$ 0,100
	95	146,33 $\pm$ 7,72			
	100	143,00 $\pm$ 7,50	145,03 $\pm$ 14,23	0,038 $\pm$ 0,007	1,060 $\pm$ 0,115

FIGURA 5 - Efeitos da infusão noradrenalina no rim de coelho, isolado e perfundido, com cápsula renal íntegra (Rins Capsulados).

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins capsulados submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), durante três períodos consecutivos de 20 minutos, intercalados por 10 minutos de lavagem.
- b)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores pressóricos basais e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- c) Resultados referentes a 6 experimentos (n = 6), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



### 3.1.2 - Rins capsulados

As Tabelas IV e VI mostram o sumário dos parâmetros analisados neste subgrupo. A presença da cápsula renal interfere seguramente com a expressão da dinâmica de perfusão, notadamente com a pressão e com a resistência vasculares, as quais apresentam valores médios mais elevados que os subgrupo controle ao longo das três etapas de infusão de NOR ( $p < 0,001$ ). Neste subgrupo experimental a pressão de perfusão se manteve sempre acima de 150 mmHg durante as curvas de infusão do  $\alpha$  agonista, partindo de níveis basais também mais elevados do que aqueles observados nos rins descapsulados (Tabela IV). Os fluxos urinário e do perfusato comportaram-se similarmente aos do subgrupo controle descapsulado, o mesmo ocorrendo com a resposta taquifilática da preparação.

Houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) nas reações de escape vascular renal, notadamente nas duas primeiras curvas de infusão do  $\alpha$  agonista (Tabela VI).

A Figura 5 mostra a expressão gráfica do escape e da taquifilaxia em rins capsulados.

### 3.1.3 - Rins perfundidos com DMSO

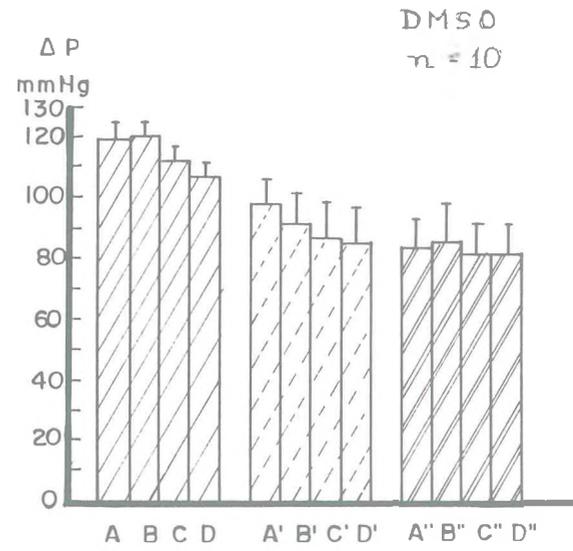
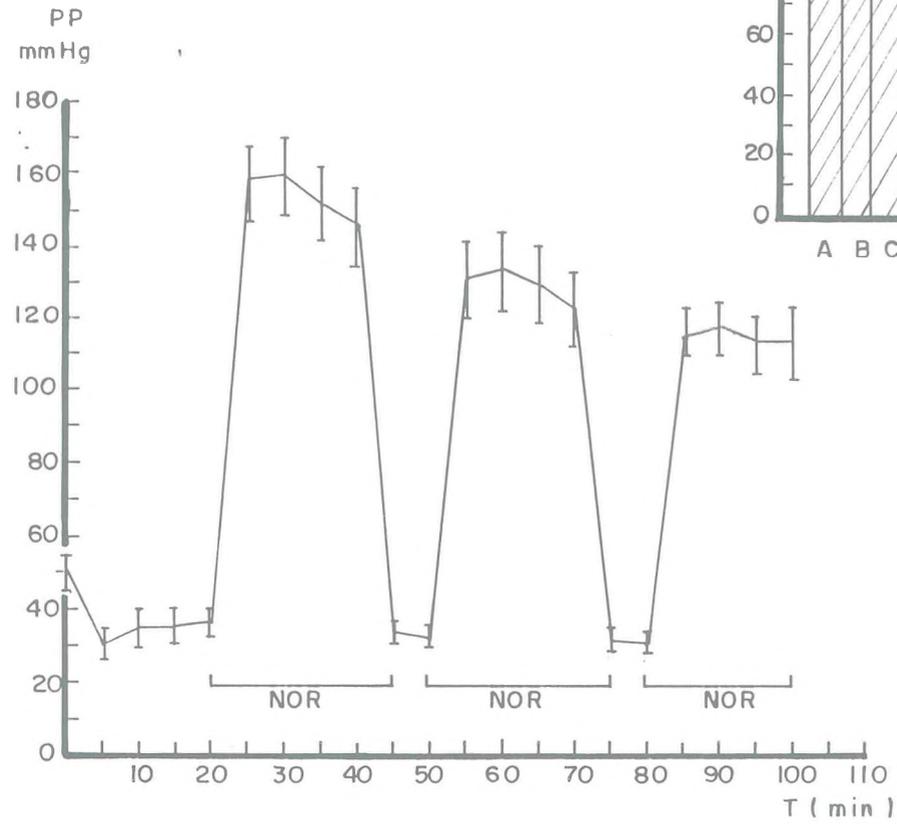
As Tabelas V e VI mostram os parâmetros fisiológicos estudados neste grupo. Para determinar a possível interferência do DMSO na função renal foram utilizados rins descapsulados infundidos com solução de KH e DMSO a 0,65%, nas mes

TABELA V - Parâmetros da perfusão de rins de coelhos, descapsulados, perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e dimetilsulfóxido (0,65%), infundidos com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	52,20 $\pm$ 5,62			
	5	31,60 $\pm$ 4,73			
	10	36,20 $\pm$ 4,96	35,38 $\pm$ 4,30	0,035 $\pm$ 0,010	1,212 $\pm$ 0,069
	15	36,60 $\pm$ 4,69			
	20	37,70 $\pm$ 4,93	36,54 $\pm$ 5,50	0,034 $\pm$ 0,008	1,050 $\pm$ 0,040
NOR	25	157,00 $\pm$ 9,31			
	30	158,80 $\pm$ 11,47	156,82 $\pm$ 15,15	0,027 $\pm$ 0,003	1,037 $\pm$ 0,039
	35	151,40 $\pm$ 12,55			
	40	145,00 $\pm$ 11,62	143,73 $\pm$ 15,06	0,033 $\pm$ 0,004	1,067 $\pm$ 0,045
LAV	45	34,80 $\pm$ 3,98			
	50	32,20 $\pm$ 3,38	30,75 $\pm$ 4,22	0,061 $\pm$ 0,012	1,132 $\pm$ 0,052
NOR	55	131,80 $\pm$ 10,43			
	60	134,20 $\pm$ 12,47	122,71 $\pm$ 13,00	0,042 $\pm$ 0,009	1,109 $\pm$ 0,050
	65	129,60 $\pm$ 11,45			
	70	123,80 $\pm$ 10,42	121,68 $\pm$ 12,13	0,037 $\pm$ 0,005	1,063 $\pm$ 0,039
LAV	75	33,40 $\pm$ 3,87			
	80	32,00 $\pm$ 3,53	31,91 $\pm$ 4,79	0,067 $\pm$ 0,013	1,096 $\pm$ 0,065
NOR	85	116,40 $\pm$ 6,94			
	90	118,60 $\pm$ 8,68	111,97 $\pm$ 9,64	0,038 $\pm$ 0,005	1,096 $\pm$ 0,049
	95	114,80 $\pm$ 10,64			
	100	114,40 $\pm$ 10,97	98,94 $\pm$ 14,81	0,035 $\pm$ 0,005	1,078 $\pm$ 0,046

FIGURA 6 - Efeitos do dimetilsulfóxido (DMSO) (0,65%) no rim de coelho isolado e perfundido, submetido à infusão de noradrenalina.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) durante três períodos consecutivos intercalados por lavagens da preparação.
- b)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e dos picos resultados da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- c) Resultados referentes a 10 experimentos ( $n = 10$ ), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



mas condições experimentais já citadas. A pressão de perfusão, após atingir a estabilidade no período de controle, tende a elevar-se rapidamente quando a infusão de NOR é iniciada. Há retorno rápido aos níveis basais pré-infusão imediatamente após cessar o fluxo do  $\alpha$  agonista, permanecendo assim durante todo o período de lavagem da preparação. O fluxo urinário diminuiu de  $0,061 \pm 0,012$  para  $0,037 \pm 0,005$  e de  $0,067 \pm 0,0013$  para  $0,035 \pm 0,005$ , durante o segundo e terceiro período de infusão de NOR, respectivamente, à semelhança do que ocorreu com o grupo controle descapsulado. Tanto a pressão de perfusão como a resistência vascular evoluíram com valores superiores àqueles observados nos rins descapsulados (Tabela V), embora tenha sido mantida a resposta taquifilática da preparação (Figura 6).

A percentagem de reações de escape observada na primeira e segunda curvas de NOR também são menores que as do grupo controle descapsulado e se mantem inalterada entre o segundo e terceiro período de infusão da substância vasoconstrictora (Tabela VI).

### 3.2 - Bloqueio do EDRF

Os experimentos deste grupo foram realizados vários meses antes da elucidação da natureza química do EDRF. Já era descrito amplamente o fenômeno da vasodilatação dependente do endotélio e inúmeras substâncias, por mecanismos ainda não esclarecidos, inibiam a resposta relaxadora endotélio-dependente mediada pelo EDRF.

TABELA VI - Percentagem de escape vascular à NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ) observada em rins de coelho descapsulados previamente, com cápsula mantida e perfundidos com dimetilsulfóxido (DMSO). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

SUBGRUPOS	n <sup>(a)</sup>	C <sub>1</sub> <sup>(b)</sup>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
Descapsulados	10	50,32 $\pm$ 4,61	31,87 $\pm$ 3,81	22,65 $\pm$ 4,22
Capsulados	6	28,33 $\pm$ 2,59*	17,19 $\pm$ 2,47*	13,94 $\pm$ 1,18
DMSO	10	30,77 $\pm$ 3,71*	22,22 $\pm$ 2,23*	22,43 $\pm$ 4,69

(a) Número de rins estudados

(b) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> correspondem aos períodos de infusão de NOR

Níveis de significância: \* p < 0,05    \*\* p < 0,001    \*\*\* p < 0,0001

A hipótese de que o escape vascular renal pudes-  
se estar vinculado à liberação de EDRF e o reconhecimento  
deste mediador como capaz de ser produzido pelo endotélio  
vascular mesmo na ausência de estimulação, sugeriu-nos que  
o uso de bloqueadores poderia resultar numa apreciável redu-  
ção ou abolição do fenômeno vascular.

Os resultados dos parâmetros analisados no grupo  
de Bloqueadores de EDRF podem ser vistos nas Tabelas VII,  
VIII, IX e X. Foram estudados rins infundidos com Azul de  
Metileno (n = 6), com Colagenase (n = 7) e com EP 10161  
(n = 7).

### 3.2.1 - Rins infundidos com Azul de Metileno

As Tabelas VII e X mostram os resultados deste  
subgrupo. O azul de metileno tem a propriedade de inibir  
tanto o relaxamento arterial endotélio-dependente como aque-  
le não dependente de EDRF. Para determinar os efeitos deste  
inibidor de EDRF, rins descapsulados foram infundidos com o  
azul de metileno (0,1%), com fluxo constante, durante 10  
minutos, entre o primeiro período de lavagem e a segunda in-  
fusão de NOR. Imediatamente, após cessar o fluxo do coran-  
te, foi iniciada a infusão de NOR o que determinou um rápi-  
do aumento da pressão de perfusão e da resistência vascular  
(Tabela VII). Nas infusões subsequentes de NOR a resposta  
pressórica foi maior que a observada no subgrupo controle  
( $p < 0,001$ ), embora tenha sido mantida a resposta taquifilá-  
tica (Figura 7).

TABELA VII - Efeitos da infusão de azul de metileno (0,1%) no rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e submetido à vasoconstricção com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	61,66 $\pm$ 8,98			
	5	55,33 $\pm$ 5,88			
	10	55,00 $\pm$ 5,67	45,44 $\pm$ 4,85	0,082 $\pm$ 0,013	1,254 $\pm$ 0,054
	15	57,66 $\pm$ 4,90			
	20	59,33 $\pm$ 4,69	59,22 $\pm$ 6,48	0,087 $\pm$ 0,014	1,016 $\pm$ 0,055
NOR	25	167,66 $\pm$ 12,74			
	30	167,66 $\pm$ 5,06	149,26 $\pm$ 12,43	0,061 $\pm$ 0,008	0,195 $\pm$ 0,083
	35	154,33 $\pm$ 4,66			
	40	149,00 $\pm$ 4,43	132,29 $\pm$ 9,43	0,042 $\pm$ 0,005	0,170 $\pm$ 0,061
LAV	45	57,00 $\pm$ 3,02			
	50	51,33 $\pm$ 4,08	45,59 $\pm$ 3,68	0,118 $\pm$ 0,022	1,217 $\pm$ 0,072
AM	5	64,33 $\pm$ 4,52			
	10	70,66 $\pm$ 2,53	56,09 $\pm$ 5,13	0,143 $\pm$ 0,024	1,193 $\pm$ 0,054
NOR	55	157,00 $\pm$ 8,28			
	60	164,16 $\pm$ 6,54	141,14 $\pm$ 10,39	0,065 $\pm$ 0,014	1,157 $\pm$ 0,059
	65	155,66 $\pm$ 3,73			
	70	147,00 $\pm$ 3,62	129,28 $\pm$ 9,15	0,044 $\pm$ 0,012	1,189 $\pm$ 0,063
LAV	75	64,33 $\pm$ 3,35			
	80	57,66 $\pm$ 2,54	54,72 $\pm$ 3,46	0,142 $\pm$ 0,029	1,065 $\pm$ 0,050
NOR	85	138,66 $\pm$ 5,46			
	90	138,00 $\pm$ 5,09	120,87 $\pm$ 9,09	0,077 $\pm$ 0,018	1,065 $\pm$ 0,060
	95	131,33 $\pm$ 5,56			
	100	126,33 $\pm$ 6,28	113,45 $\pm$ 8,57	0,065 $\pm$ 0,017	1,156 $\pm$ 0,053

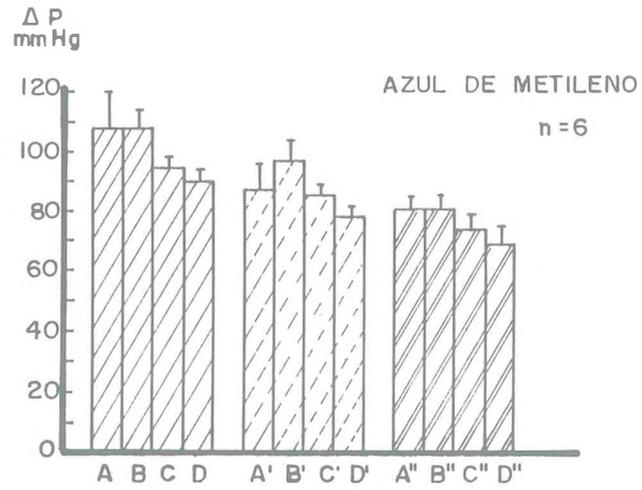
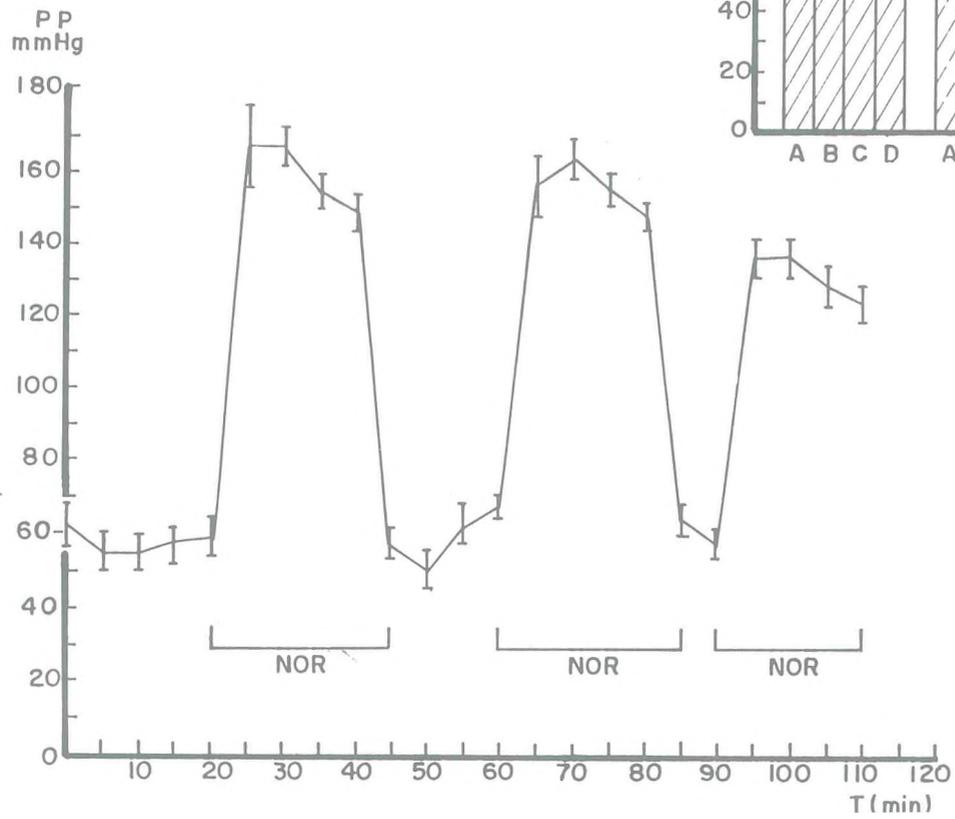
FIGURA 7 - Efeitos do Azul de Metileno (0,1%) no rim de coelho, isolado e perfundido.

a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) em três períodos consecutivos.

b) Solução de Azul de Metileno a 0,1% foi infundida (0,1ml/min) durante 10 minutos, após o primeiro período de lavagem e imediatamente antes da segunda curva de infusão de NOR.

c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e dos picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).

d) Resultados referente a 6 experimentos (n = 6), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



O escape vascular não apresentou redução significativa na segunda e terceira curvas de NOR, embora este subgrupo tenha apresentado também baixos índices de escape na primeira infusão da substância vasoconstrictora, quando a preparação ainda não havia sido submetida ao azul de metileno (Tabela X).

### 3.2.2 - Rins infundidos com colagenase

A desendotelização química do leito arterial renal foi obtida com o emprego de colagenase (320UI/min), infundida com fluxo constante durante 15 minutos, imediatamente antes da primeira infusão de NOR. Os resultados deste subgrupo podem ser observados nas Tabelas VIII e X.

A pressão de perfusão, assim como também a resistência, sofreram incremento rápido com o início da infusão de NOR, decrescendo durante os períodos de lavagem da preparação, demonstrando que a ausência do endotélio não alterou a resposta noradrenérgica. O comportamento da pressão de perfusão ao longo de todo o experimento também foi taquifilática (Figura 8). Os resultados relativos à pressão de perfusão e à resistência foram idênticos aos do subgrupo controle. O aspecto mais chamativo na análise dos parâmetros deste subgrupo foi a intensa retração do volume urinário, iniciada logo no primeiro período de infusão de NOR, continuando-se durante todo o experimento, fazendo desaparecer o característico aumento do fluxo urinário que acompanha o período de lavagem, quando cessam os efeitos do  $\alpha$  agonista.

TABELA VIII - Efeitos da infusão colagenase (320UI/min.) sobre a dinâmica de perfusão renal de rins de coelho perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e submetidos à vasoconstrição com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	62,85 $\pm$ 9,43			
	5	44,28 $\pm$ 4,89			
	10	39,71 $\pm$ 6,34	35,90 $\pm$ 4,32	0,050 $\pm$ 0,004	1,466 $\pm$ 0,136
	15	38,00 $\pm$ 4,61			
	20	36,28 $\pm$ 4,74	32,11 $\pm$ 2,62	0,040 $\pm$ 0,004	1,168 $\pm$ 0,118
C O L A G	25	44,85 $\pm$ 4,24			
	30	44,28 $\pm$ 4,01			
	35	44,85 $\pm$ 4,48	24,91 $\pm$ 3,85	0,057 $\pm$ 0,004	1,931 $\pm$ 0,206
NOR	25	113,71 $\pm$ 23,93			
	30	109,14 $\pm$ 26,02	94,96 $\pm$ 31,96	0,015 $\pm$ 0,003	1,410 $\pm$ 0,183
	35	106,85 $\pm$ 25,85			
	40	107,42 $\pm$ 26,03	97,65 $\pm$ 30,13	0,009 $\pm$ 0,002	1,232 $\pm$ 0,135
LAV	45	24,28 $\pm$ 8,79			
	50	21,42 $\pm$ 9,14	17,78 $\pm$ 6,89	0,008 $\pm$ 0,002	1,387 $\pm$ 0,123
NOR	55	88,00 $\pm$ 15,72			
	60	87,71 $\pm$ 15,39	72,90 $\pm$ 15,92	0,006 $\pm$ 0,004	1,297 $\pm$ 0,141
	65	83,42 $\pm$ 15,21			
	70	80,85 $\pm$ 15,09	68,46 $\pm$ 13,85	0,005 $\pm$ 0,001	1,239 $\pm$ 0,119
LAV	75	23,42 $\pm$ 5,95			
	80	16,00 $\pm$ 5,56	17,44 $\pm$ 5,09	0,007 $\pm$ 0,002	1,350 $\pm$ 0,139
NOR	85	75,14 $\pm$ 12,21			
	90	71,42 $\pm$ 11,97	60,42 $\pm$ 13,14	0,005 $\pm$ 0,001	1,312 $\pm$ 0,149
	95	69,42 $\pm$ 11,39			
	100	67,71 $\pm$ 11,28	57,35 $\pm$ 11,71	0,004 $\pm$ 0,001	1,276 $\pm$ 0,131

TABELA VIII - Efeitos da infusão colagenase (320UI/min.) sobre a dinâmica de perfusão renal de rins de coelho perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e submetidos à vasoconstricção com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	62,85 $\pm$ 9,43			
	5	44,28 $\pm$ 4,89			
	10	39,71 $\pm$ 6,34	35,90 $\pm$ 4,32	0,050 $\pm$ 0,004	1,466 $\pm$ 0,136
	15	38,00 $\pm$ 4,61			
	20	36,28 $\pm$ 4,74	32,11 $\pm$ 2,62	0,040 $\pm$ 0,004	1,168 $\pm$ 0,118
C O L A G	25	44,85 $\pm$ 4,24			
	30	44,28 $\pm$ 4,01			
	35	44,85 $\pm$ 4,48	24,91 $\pm$ 3,85	0,057 $\pm$ 0,004	1,931 $\pm$ 0,206
NOR	25	113,71 $\pm$ 23,93			
	30	109,14 $\pm$ 26,02	94,96 $\pm$ 31,96	0,015 $\pm$ 0,003	1,410 $\pm$ 0,183
	35	106,85 $\pm$ 25,85			
	40	107,42 $\pm$ 26,03	97,65 $\pm$ 30,13	0,009 $\pm$ 0,002	1,232 $\pm$ 0,135
LAV	45	24,28 $\pm$ 8,79			
	50	21,42 $\pm$ 9,14	17,78 $\pm$ 6,89	0,008 $\pm$ 0,002	1,387 $\pm$ 0,123
NOR	55	88,00 $\pm$ 15,72			
	60	87,71 $\pm$ 15,39	72,90 $\pm$ 15,92	0,006 $\pm$ 0,004	1,297 $\pm$ 0,141
	65	83,42 $\pm$ 15,21			
	70	80,85 $\pm$ 15,09	68,46 $\pm$ 13,85	0,005 $\pm$ 0,001	1,239 $\pm$ 0,119
LAV	75	23,42 $\pm$ 5,95			
	80	16,00 $\pm$ 5,56	17,44 $\pm$ 5,09	0,007 $\pm$ 0,002	1,350 $\pm$ 0,139
NOR	85	75,14 $\pm$ 12,21			
	90	71,42 $\pm$ 11,97	60,42 $\pm$ 13,14	0,005 $\pm$ 0,001	1,312 $\pm$ 0,149
	95	69,42 $\pm$ 11,39			
	100	67,71 $\pm$ 11,28	57,35 $\pm$ 11,71	0,004 $\pm$ 0,001	1,276 $\pm$ 0,131

FIGURA 8 - Efeitos da infusão de colagenase (320UI) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos de 20 minutos intercalados por 10 minutos de lavagem de preparação.
- b) Colagenase (320UI/min) foi infundida durante 15 minutos antes do primeiro período de infusão de NOR.
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos de resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos (n = 7), expressos em média  $\pm$  E.P.M.

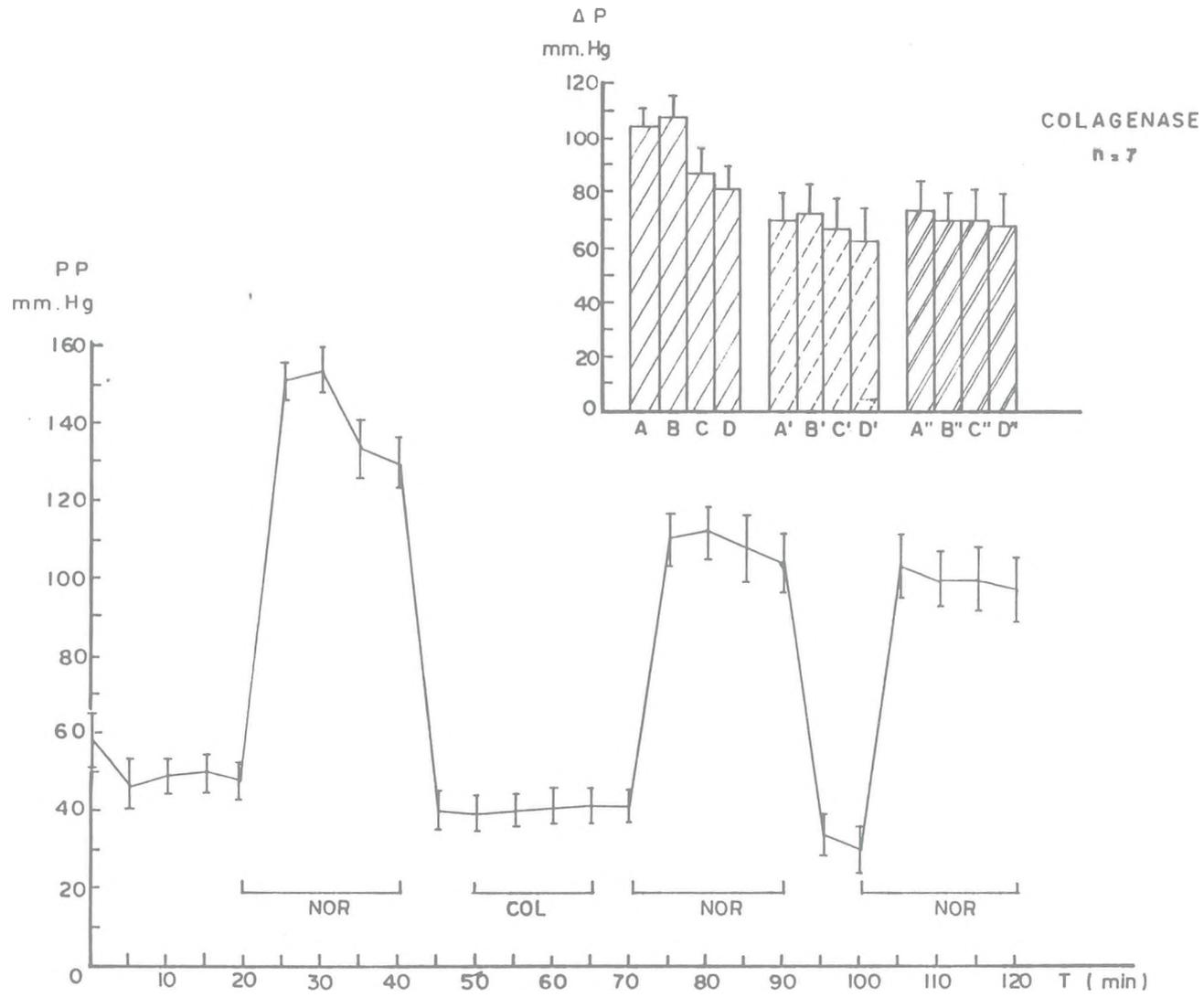


TABELA IX - Efeitos do EP 10161 ( $3,4 \times 10^{-5}M$ ) sobre o rim de coelho perfundi-  
do com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina  
( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	64,28 $\pm$ 3,97			
	5	41,00 $\pm$ 3,57			
	10	38,71 $\pm$ 2,89	42,89 $\pm$ 4,63	0,083 $\pm$ 0,004	1,175 $\pm$ 0,091
	15	42,42 $\pm$ 3,74			
	20	42,85 $\pm$ 3,94	42,36 $\pm$ 4,31	0,098 $\pm$ 0,001	1,019 $\pm$ 0,056
NOR	25	88,85 $\pm$ 6,95			
	30	90,00 $\pm$ 3,43	84,11 $\pm$ 5,01	0,091 $\pm$ 0,011	1,079 $\pm$ 0,062
	35	81,42 $\pm$ 6,48			
	40	74,57 $\pm$ 5,91	72,65 $\pm$ 7,06	0,097 $\pm$ 0,018	1,108 $\pm$ 0,068
LAV	45	38,57 $\pm$ 4,42			
	50	35,71 $\pm$ 3,27	34,38 $\pm$ 4,27	0,162 $\pm$ 0,023	1,105 $\pm$ 0,084
NOR	55	68,85 $\pm$ 4,43			
	60	70,00 $\pm$ 4,66	67,54 $\pm$ 5,77	0,108 $\pm$ 0,020	1,056 $\pm$ 0,065
	65	68,28 $\pm$ 2,95			
	70	67,14 $\pm$ 3,38	66,38 $\pm$ 4,85	0,120 $\pm$ 0,022	1,041 $\pm$ 0,055
LAV	75	38,28 $\pm$ 3,49			
	80	36,14 $\pm$ 3,39	35,40 $\pm$ 3,72	0,173 $\pm$ 0,033	1,076 $\pm$ 0,081
NOR	85	62,00 $\pm$ 7,04			
	90	66,57 $\pm$ 7,47	58,79 $\pm$ 4,98	0,126 $\pm$ 0,026	1,085 $\pm$ 0,060
	95	62,14 $\pm$ 4,77			
	100	64,85 $\pm$ 5,30	60,84 $\pm$ 3,35	0,127 $\pm$ 0,028	1,043 $\pm$ 0,051

FIGURA 9 - Efeitos do EP 10161 ( $3,4 \times 10^{-5}M$ ), inibidor de lipooxigenase, sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos intercalados por períodos de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo o inibidor de lipooxigenase EP 10161 ( $3,4 \times 10^{-5}M$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos (n = 7), expressos em média  $\pm$  E.P.M.

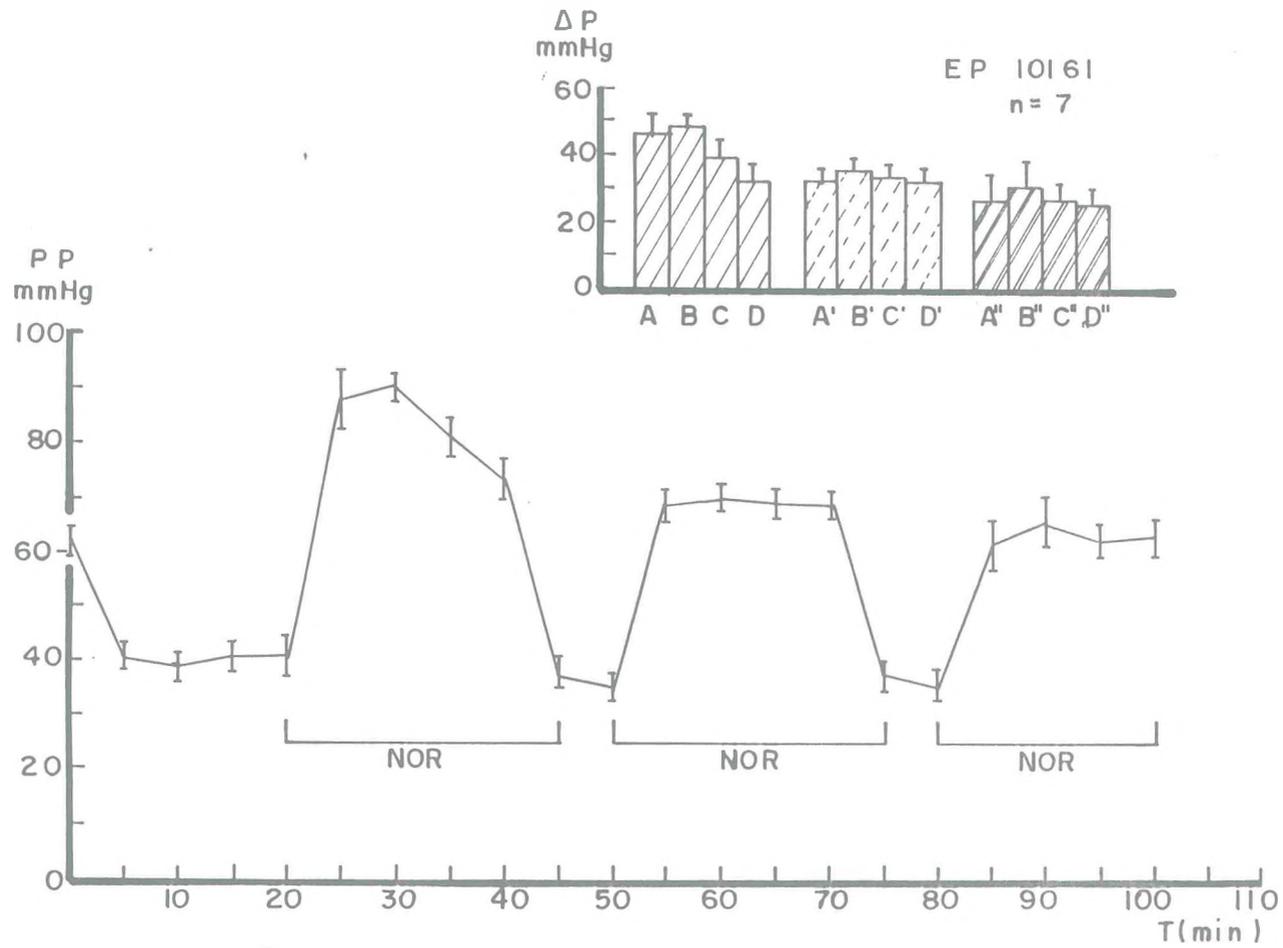


TABELA X - Efeitos dos bloqueadores de EDRF sobre a percentagem de escape vascular do rim isolado de coelho infundido com NOR ( $1,3 \times 10^{-6}$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

SUBGRUPOS	n <sup>(a)</sup>	n <sub>1</sub> <sup>(b)</sup>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
Azul de Metileno	6	28,53 $\pm$ 2,11 *	22,03 $\pm$ 3,39	19,49 $\pm$ 4,16
Colagenase	7	34,06 $\pm$ 7,65	24,95 $\pm$ 3,28	22,05 $\pm$ 3,60
EP 10161	7	52,01 $\pm$ 7,45	28,13 $\pm$ 7,55	4,76 $\pm$ 4,41 ***

(a) Número de rins estudados

(b) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> correspondem aos valores de escape observados durante os períodos de infusão de NOR

Níveis de significância: \* p < 0,05    \*\* p < 0,05    \*\*\* p < 0,001

do subgrupo controle, a taquifilaxia também se fez presente (Figura 9).

A análise da percentagem de escape mostrou resultados semelhantes aos controles, tanto na primeira como na segunda curva de NOR, porém exibiu um efeito tardio significativo no último período de infusão do vasoconstrictor, com a abolição quase completa do fenômeno do escape noradrenérgico (Tabela X).

### 3.3 - Estudo com eterfosfolipídios

A disponibilidade de Fator de Ativação de Plaquetas sintético, permitiu a observação de seus efeitos renais, através da adição do mesmo em solução de KH e infusão no rim isolado de coelho. Por suas propriedades vasodilatadoras e hipotensoras, e ainda por ser produzido por células renais, foi aventada a possibilidade da participação do PAF no mecanismo do escape vascular renal. O Liso-PAF, análogo destituído de ação farmacológica, foi empregado como controle negativo na avaliação dos parâmetros renais aqui estudados. Neste grupo experimental foram utilizados rins descapsulados infundidos com PAF (n = 7) e Liso-PAF (n = 7), cujos resultados respectivos são apresentados nas Tabelas XI, XII e XIII.

#### 3.3.1 - Perfusão com PAF

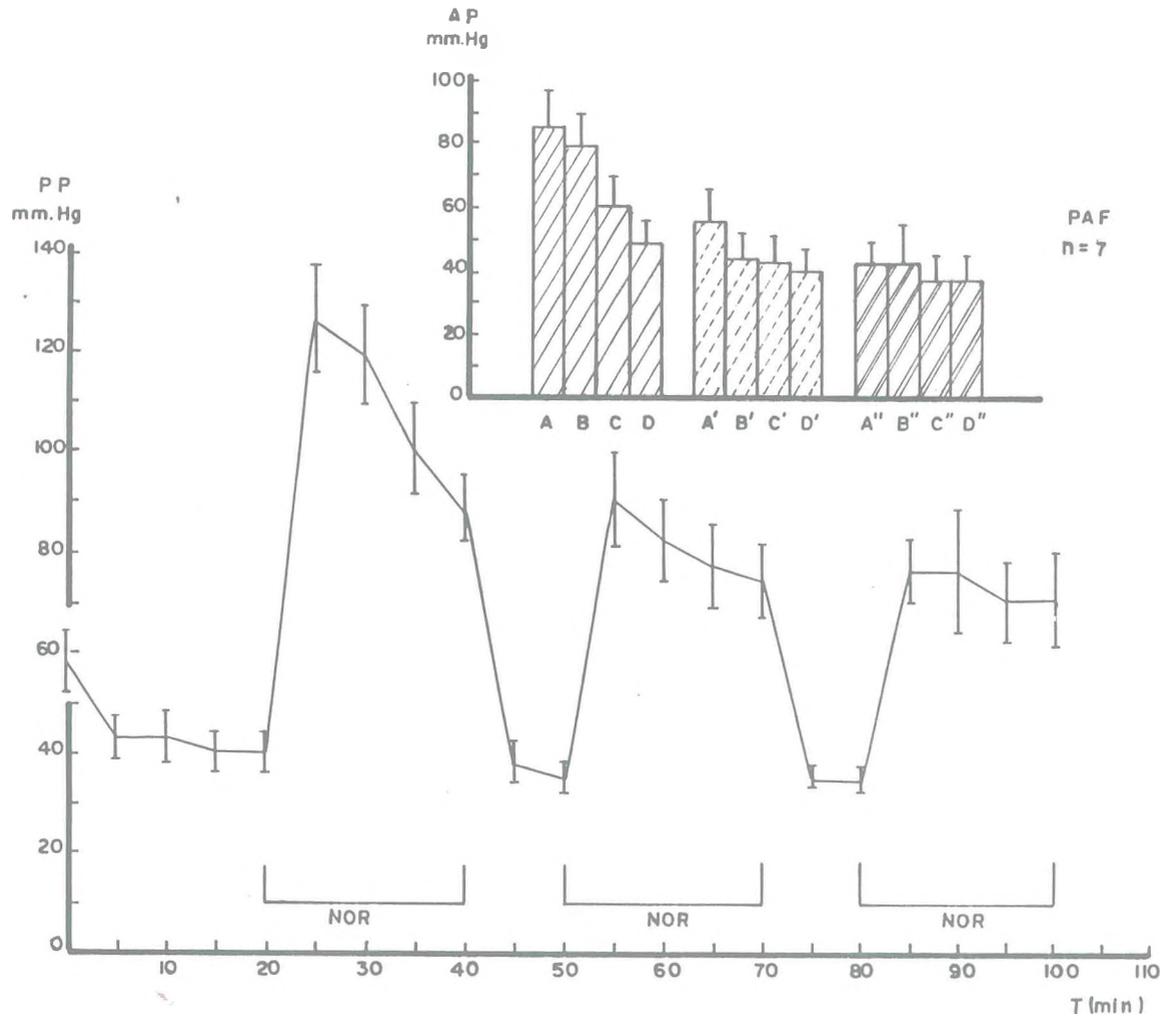
A infusão de solução de KH contendo Fator de Ati-

TABELA XI - Efeitos do PAF ( $2,76 \times 10^{-6}M$ ) no rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
CONTROLE	0	57,19 $\pm$ 6,32			
	5	43,19 $\pm$ 4,80			
	10	43,42 $\pm$ 5,17	35,31 $\pm$ 4,77	0,058 $\pm$ 0,010	1,299 $\pm$ 9,127
	15	40,85 $\pm$ 4,57			
	20	40,00 $\pm$ 4,08	39,77 $\pm$ 4,60	0,057 $\pm$ 0,009	1,049 $\pm$ 0,108
NOR	25	126,85 $\pm$ 11,65			
	30	119,14 $\pm$ 10,65	111,82 $\pm$ 11,78	0,019 $\pm$ 0,007	1,125 $\pm$ 0,099
	35	100,57 $\pm$ 9,42			
	40	88,28 $\pm$ 7,60	81,23 $\pm$ 9,81	0,051 $\pm$ 0,007	1,157 $\pm$ 0,095
LAV	45	38,57 $\pm$ 4,50			
	50	35,19 $\pm$ 3,10	31,51 $\pm$ 3,54	0,096 $\pm$ 0,012	1,149 $\pm$ 0,079
NOR	55	90,00 $\pm$ 9,55			
	60	82,85 $\pm$ 8,84	76,46 $\pm$ 10,26	0,056 $\pm$ 0,007	1,123 $\pm$ 0,083
	65	77,71 $\pm$ 8,32			
	70	74,57 $\pm$ 7,48	69,90 $\pm$ 10,30	0,066 $\pm$ 0,009	1,126 $\pm$ 0,093
LAV	75	35,77 $\pm$ 2,07			
	80	34,28 $\pm$ 2,78	31,39 $\pm$ 3,62	0,107 $\pm$ 0,009	1,135 $\pm$ 0,083
NOR	85	76,85 $\pm$ 6,48			
	90	76,00 $\pm$ 12,12	70,60 $\pm$ 16,14	0,072 $\pm$ 0,009	1,170 $\pm$ 0,103
	95	70,57 $\pm$ 8,29			
	100	70,28 $\pm$ 8,96	64,80 $\pm$ 11,39	0,078 $\pm$ 0,010	1,144 $\pm$ 0,083

FIGURA 10 - Efeitos do PAF ( $2,76 \times 10^{-6} \text{M}$ ) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ ), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo PAF ( $2,76 \times 10^{-6} \text{M}$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos ( $n = 7$ ), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



vação de Plaquetas (PAF), na concentração de  $2,76 \times 10^{-6} M$ , permitiu a observação de alterações da reatividade noradrenergica de rins descapsulados, conforme protocolo já descrito. Tanto a pressão de perfusão como a resistência vascular não mostraram diferenças significativas, o mesmo ocorrendo com o fluxo urinário e do perfusato (Tabela XI). A perfusão com o PAF não diminuiu o incremento pressórico determinado pela infusão de NOR, e manteve o caráter taquifilático da resposta adrenérgica (Figura 10).

Os valores do escape vascular mostraram resultados semelhantes aos do subgrupo controle (Tabela XIII).

### 3.3.2 - Perfusão com Liso-PAF

A perfusão de rins descapsulados com solução de KH contendo Liso-PAF na concentração de  $3,23 \times 10^{-6} M$ , produziu resultados que diferiram do subgrupo controle no tocante à pressão de perfusão e resistência vascular. Aqui foi observado uma tendência a níveis tensionais mais baixos que os verificados no subgrupo controle (Tabela XII), com diferenças significativas quanto à pressão de perfusão nas duas últimas curvas de NOR ( $p < 0,001$ ). A resistência vascular diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) nas duas últimas etapas de infusão do  $\alpha$  agonista. A taquifilaxia também ocorreu com as três sucessivas infusões de NOR (Figura 11). Entretanto a percentagem de escape vascular apresentou resultados significativamente elevados como resposta à infusão do  $\alpha$  agonista. Nos três períodos de vasoconstricção a percenta

TABELA XII - Efeitos do Liso-PAF ( $3,23 \times 10^{-6}$  M) no rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$  M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	57,14 $\pm$ 9,43			
	5	36,85 $\pm$ 6,48			
	10	34,00 $\pm$ 4,70	30,99 $\pm$ 4,15	0,064 $\pm$ 0,017	1,357 $\pm$ 0,048
	15	40,85 $\pm$ 3,57			
	20	40,28 $\pm$ 3,06	36,25 $\pm$ 4,46	0,060 $\pm$ 0,009	1,201 $\pm$ 0,070
NOR	25	130,85 $\pm$ 9,37			
	30	131,71 $\pm$ 8,60	91,20 $\pm$ 14,73	0,049 $\pm$ 0,006	1,245 $\pm$ 0,060
	35	109,14 $\pm$ 7,61			
	40	78,85 $\pm$ 8,91	74,38 $\pm$ 5,51	0,053 $\pm$ 0,008	1,269 $\pm$ 0,057
LAV	45	31,71 $\pm$ 0,94			
	50	31,42 $\pm$ 1,12	26,13 $\pm$ 1,68	0,083 $\pm$ 0,012	1,227 $\pm$ 0,064
NOR	55	84,85 $\pm$ 8,11			
	60	71,14 $\pm$ 4,85	62,15 $\pm$ 4,69	0,061 $\pm$ 0,009	1,262 $\pm$ 0,060
	65	66,85 $\pm$ 3,33			
	70	63,71 $\pm$ 3,21	52,87 $\pm$ 2,82	0,072 $\pm$ 0,001	1,244 $\pm$ 0,051
LAV	75	35,14 $\pm$ 2,79			
	80	32,00 $\pm$ 1,51	27,31 $\pm$ 1,94	0,107 $\pm$ 0,013	0,156 $\pm$ 0,059
NOR	85	71,74 $\pm$ 4,40			
	90	68,57 $\pm$ 4,10	56,49 $\pm$ 3,14	0,081 $\pm$ 0,014	1,250 $\pm$ 0,058
	95	58,00 $\pm$ 3,16			
	100	53,71 $\pm$ 4,07	45,24 $\pm$ 2,80	0,090 $\pm$ 0,017	1,241 $\pm$ 0,057

FIGURA 11 - Efeitos do Liso-PAF ( $3,23 \times 10^{-6}M$ ) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo Liso-PAF ( $3,23 \times 10^{-6}M$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos ( $n = 7$ ), expressos em média  $\pm$  E.P.M.

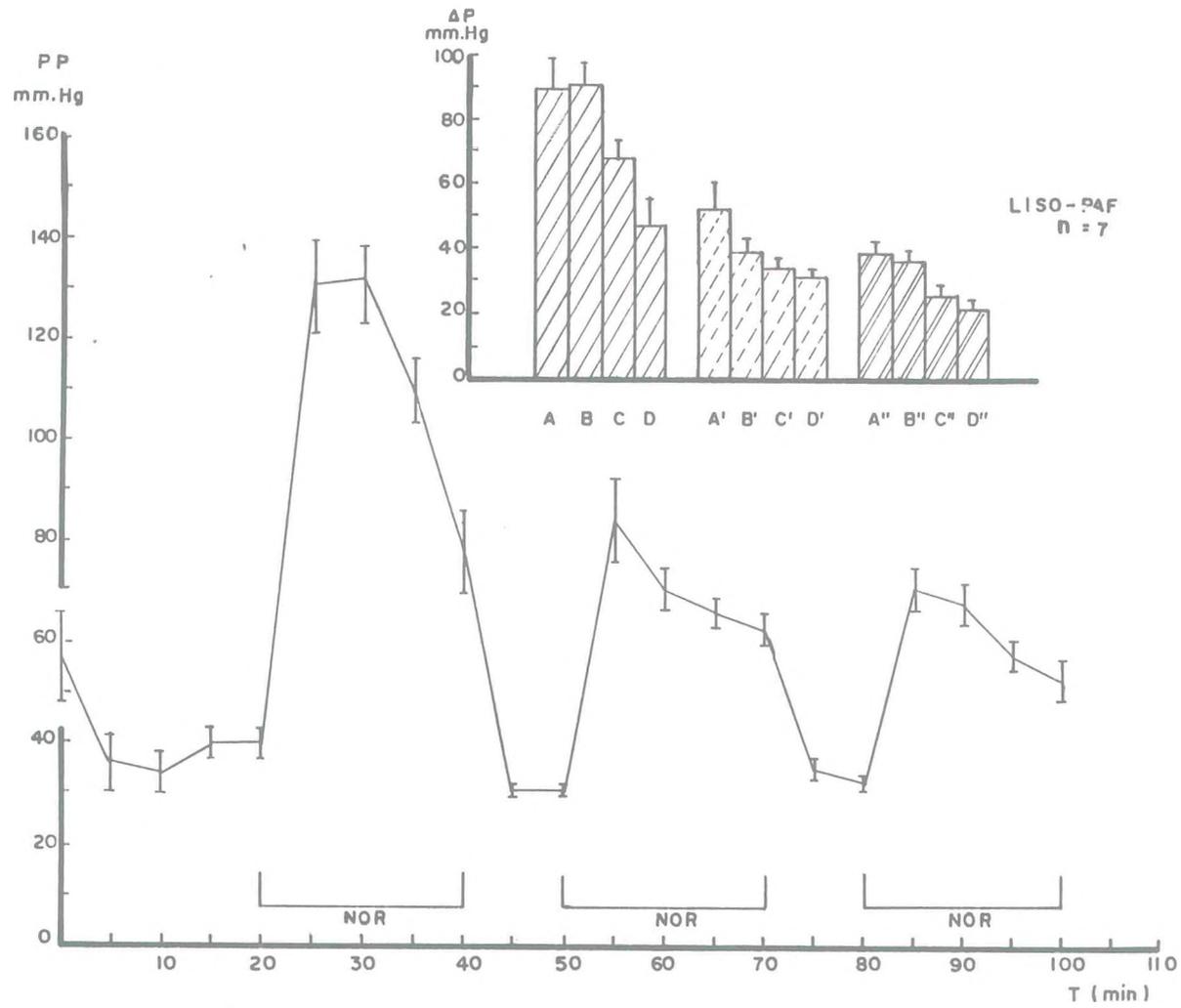


TABELA XIII - Efeitos da infusão de PAF ( $2,76 \times 10^{-6}M$ ) e de Liso-PAF ( $3,23 \times 10^{-6}M$ ) sobre a percentagem de escape vascular em rins de coelho infundidos com NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

SUBGRUPOS	n (a)	(b) C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
PAF	7	45,85 $\pm$ 6,52	32,87 $\pm$ 7,01	33,49 $\pm$ 7,23
Liso-PAF	7	65,74 $\pm$ 6,40*	46,31 $\pm$ 4,51	51,21 $\pm$ 7,39**

(a) Número de experimentos realizados

(b) Períodos de infusão de NOR durante os quais são observados os escapes

Níveis de significância: \* p < 0,05    \*\* p < 0,001    \*\*\* p < 0,0001

gem de escape foi superior aos valores observados no subgrupo controle de rins descapsulados (Tabela XIII), apresentando valores significativamente elevados na primeira ( $p < 0,001$ ) e última curva de infusão de NOR ( $p < 0,001$ ).

### 3.4 - Bloqueio de receptores do PAF

A utilização de inibidores específicos do PAF objetivou a análise de sua possível participação na gênese do escape renovascular. A inibição competitiva de receptores celulares do fosfolipídio foi conseguida mediante o emprego de diferentes antagonistas de origens bioquímicas distintas mas, possuidores todos eles, de reconhecida potência inibitória sobre as inúmeras ações biológicas do PAF.

Neste grupo foram utilizados rins descapsulados e perfundidos com solução de KH na qual foram diluídos os antagonistas, obedecendo ao protocolo de perfusão já descrito. Antagonistas naturais BN 52021 ( $n = 7$ ), BN 52022 ( $n = 7$ ) e BN 52024 ( $n = 7$ ); antagonista sintético 48740 RP ( $n = 7$ ) e antagonista farmacológico WEB 2086 ( $n = 7$ ), têm seus resultados expressos nas Tabelas XIV, XV, XVI, XVII e XVIII, respectivamente. A Tabela XIX mostra os dados comparativos das percentagens de escape de todo o grupo de antagonistas do PAF.

### 3.4.1 - Antagonistas naturais

#### 3.4.1.1 - BN 52021

O ginkgolídio B é considerado o antagonista de maior afinidade pelo receptor celular de PAF dentre a série de compostos extraídos da Ginkgo biloba. Os efeitos do BN 52021 na concentração de  $3,05 \times 10^{-5} \text{M}$ , adicionado ao líquido de perfusão, se caracterizaram essencialmente por elevação da pressão de perfusão durante a infusão de NOR, com marcada tendência para a manutenção desses níveis significativamente elevados ao longo dos períodos de 20 minutos correspondentes a ação do  $\alpha$  agonista ( $p < 0,01$ ). Contrapondo-se a esse fato, a cada período de lavagem a pressão de perfusão atingia níveis progressivamente menores, sempre inferiores aos valores basais do período de controle ou de estabilização. A resistência vascular acompanhou de perto a tendência pressórica, mantendo valores mais elevados que os do subgrupo controle, notadamente na segunda ( $p < 0,05$ ) e na terceira ( $p < 0,001$ ) curvas de infusão da substância vasoconstrictora (Tabela XIV).

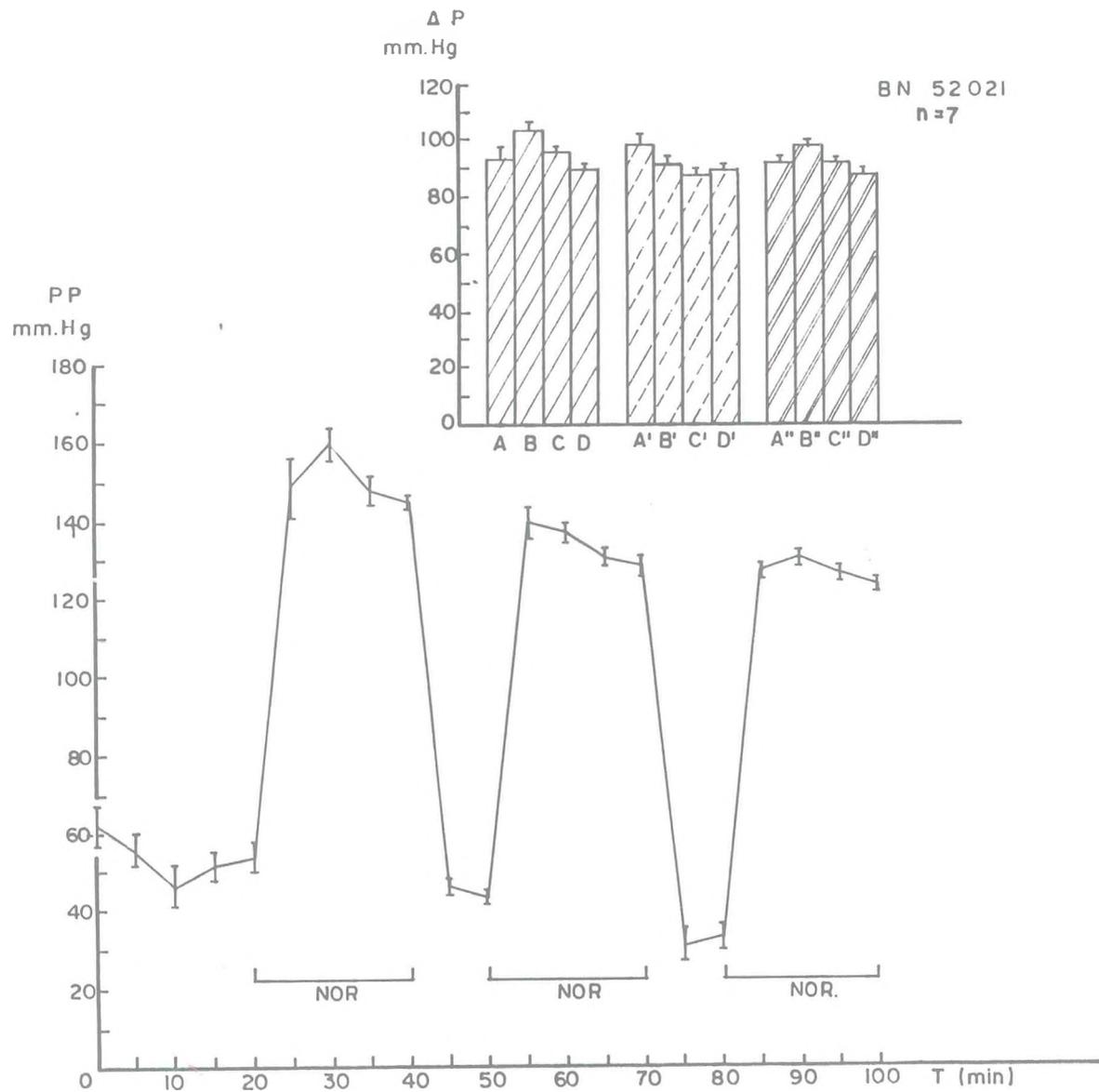
Com estas características na dinâmica de perfusão renal o subgrupo do BN 52021 mostrou uma significativa redução na taquifilaxia, o que pode ser melhor observado na Figura 12. O escape vascular teve uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) na primeira curva, em relação aos controles e manteve os mesmos níveis nos dois períodos seguintes da infusão de NOR (Tabela XIX).

TABELA XIV - Efeitos do BN 52021 ( $3,05 \times 10^{-5}M$ ) no rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusato (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	62,85 $\pm$ 8,13			
	5	56,57 $\pm$ 6,30			
	10	48,00 $\pm$ 7,89	44,73 $\pm$ 4,87	0,042 $\pm$ 0,009	1,351 $\pm$ 0,139
	15	52,85 $\pm$ 4,54			
	20	54,00 $\pm$ 4,71	51,08 $\pm$ 5,41	0,042 $\pm$ 0,009	1,111 $\pm$ 0,128
NOR	25	148,00 $\pm$ 11,02			
	30	160,00 $\pm$ 5,46	141,71 $\pm$ 15,46	0,053 $\pm$ 0,011	1,162 $\pm$ 0,115
	35	148,57 $\pm$ 4,21			
	40	145,42 $\pm$ 2,85	135,12 $\pm$ 13,31	0,040 $\pm$ 0,013	1,167 $\pm$ 0,124
LAV	45	46,42 $\pm$ 3,51			
	50	44,14 $\pm$ 3,59	41,20 $\pm$ 5,83	0,078 $\pm$ 0,017	1,198 $\pm$ 0,124
NOR	55	140,00 $\pm$ 5,08			
	60	137,71 $\pm$ 3,60	128,58 $\pm$ 12,88	0,047 $\pm$ 0,013	1,158 $\pm$ 0,123
	65	131,71 $\pm$ 2,90			
	70	130,57 $\pm$ 4,55	119,98 $\pm$ 10,76	0,045 $\pm$ 0,013	1,165 $\pm$ 0,129
LAV	75	31,71 $\pm$ 7,08			
	80	33,71 $\pm$ 5,07	38,79 $\pm$ 5,43	0,091 $\pm$ 0,025	1,157 $\pm$ 0,117
NOR	85	128,57 $\pm$ 1,79			
	90	132,28 $\pm$ 2,87	119,70 $\pm$ 12,40	0,046 $\pm$ 0,011	1,164 $\pm$ 0,111
	95	128,85 $\pm$ 2,55			
	100	123,45 $\pm$ 2,73	113,16 $\pm$ 10,57	0,51 $\pm$ 0,012	1,181 $\pm$ 0,111

FIGURA 12 - Efeitos do BN 52021 ( $3,05 \times 10^{-5}M$ ) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo BN 52021 ( $3,05 \times 10^{-5}M$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos ( $n = 7$ ), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



#### 3.4.1.2 - BN 52022

O ginkgolídiu C foi perfundido juntamente com solução de KH, na concentração de  $2,27 \times 10^{-5} M$  e resultou em alterações que se caracterizaram por acentuada redução da resistência vascular e do fluxo urinário, notadamente na última curva de infusão de NOR ( $p < 0,05$ ). A pressão de per fusão mostrou níveis discretamente mais elevados que os do grupo controle, notadamente nos dois últimos períodos de in fusão do  $\alpha$  agonista ( $p < 0,001$ ), não podendo portanto ser responsabilizada pela expressiva diminuição da resistência vascular observada nesse subgrupo (Tabela XV). Vale ressal tar ainda o caráter taquifilático da resposta adrenérgica, bem diferente daquela obtida com o tratamento com o BN 52021 (Figura 13).

Um bloqueio parcial do escape vascular pode ser observado ao longo de todo o experimento, notadamente na segunda curva de NOR (Tabela XIX).

#### 3.4.1.3 - BN 52024

O ginkgolídiu J adicionado à solução de KH foi u tilizado, na concentração de  $2,35 \times 10^{-6} M$ , como controle negativo devido a pouca afinidade pelo receptor de PAF, o que lhe confere uma potência antagônica bem menor que a do BN 52021.

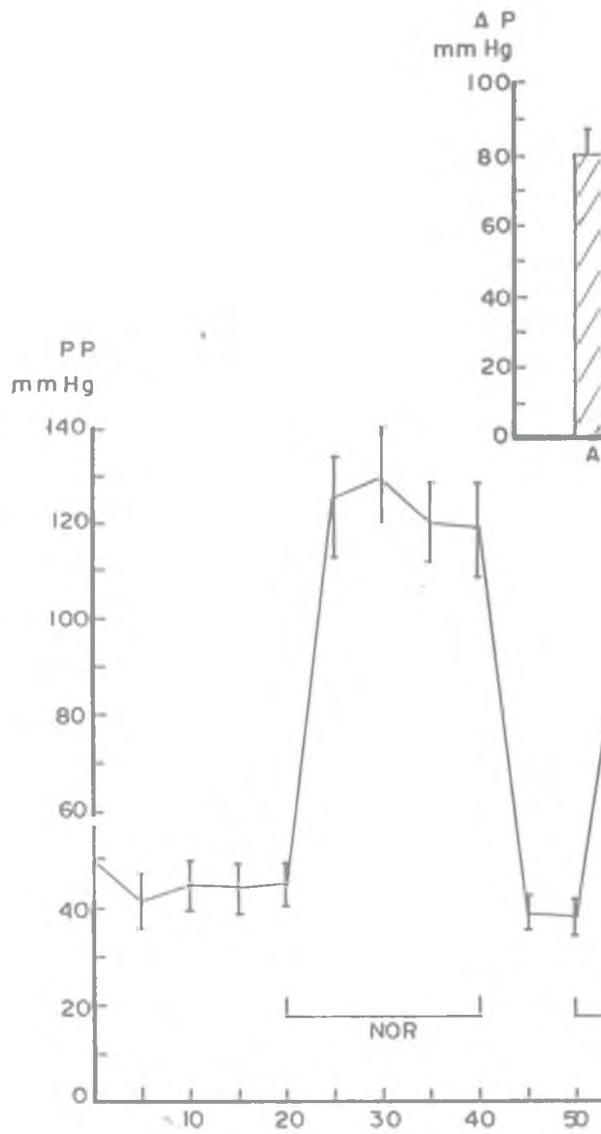
Neste subgrupo os resultados observados na pres são de perfusão mostram uma elevação sustentada durante as

TABELA XV - Efeitos do BN 52022 ( $2,27 \times 10^{-5}M$ ) no rim isolado de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	48,57 $\pm$ 7,68			
	5	42,85 $\pm$ 5,66			
	10	45,14 $\pm$ 5,00	46,19 $\pm$ 10,32	0,034 $\pm$ 0,006	1,091 $\pm$ 0,114
	15	44,85 $\pm$ 5,18			
	20	45,71 $\pm$ 4,74	64,44 $\pm$ 12,40	0,036 $\pm$ 0,006	0,783 $\pm$ 0,069
NOR	25	124,85 $\pm$ 10,37			
	30	128,00 $\pm$ 10,37	151,23 $\pm$ 18,93	0,040 $\pm$ 0,003	1,091 $\pm$ 0,114
	35	120,00 $\pm$ 8,48			
	40	118,28 $\pm$ 8,37	137,10 $\pm$ 17,68	0,045 $\pm$ 0,008	0,903 $\pm$ 0,086
LAV	45	38,85 $\pm$ 4,68			
	50	37,28 $\pm$ 4,31	41,58 $\pm$ 7,34	0,060 $\pm$ 0,005	0,965 $\pm$ 0,095
NOR	55	103,71 $\pm$ 7,10			
	60	108,00 $\pm$ 8,65	37,32 $\pm$ 14,13	0,039 $\pm$ 0,008	0,929 $\pm$ 0,090
	65	101,42 $\pm$ 6,47			
	70	97,71 $\pm$ 5,39	22,48 $\pm$ 8,51	0,040 $\pm$ 0,010	0,933 $\pm$ 0,081
LAV	75	36,14 $\pm$ 4,79			
	80	34,71 $\pm$ 5,61	15,39 $\pm$ 5,82	0,041 $\pm$ 0,010	0,868 $\pm$ 0,072
NOR	85	92,57 $\pm$ 4,42			
	90	96,57 $\pm$ 4,51	29,58 $\pm$ 11,20	0,027 $\pm$ 0,010	0,787 $\pm$ 0,096
	95	92,00 $\pm$ 9,79			
	100	89,14 $\pm$ 3,02	30,12 $\pm$ 11,40	0,026 $\pm$ 0,006	1,008 $\pm$ 0,082

FIGURA 13 - Efeitos do BN 52022 ( $2,27 \times 10^{-5}M$ ) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo BN 52022 ( $2,27 \times 10^{-5}M$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos ( $n = 7$ ), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



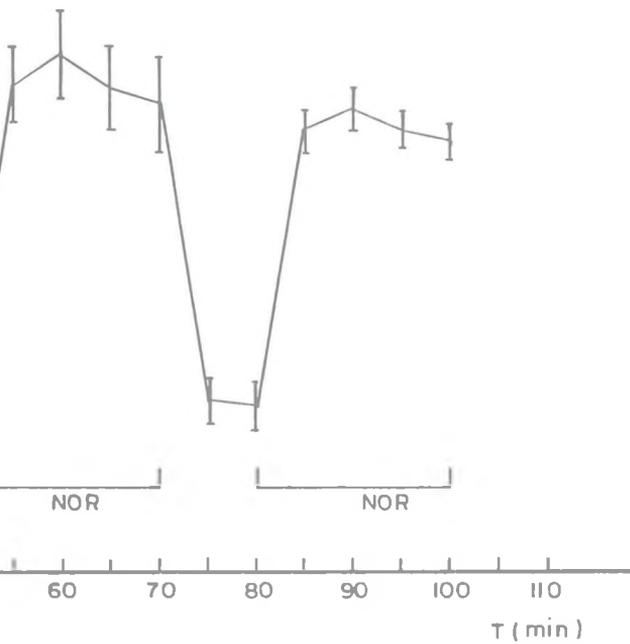
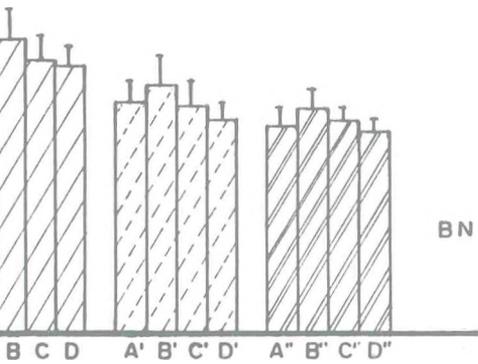


TABELA XVI - Efeitos do BN 52024 ( $2,35 \times 10^{-6}M$ ) no rim de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
CONTROLE	0	52,85 $\pm$ 11,64			
	5	27,42 $\pm$ 2,54			
	10	25,14 $\pm$ 2,35	19,09 $\pm$ 2,40	0,043 $\pm$ 0,009	1,601 $\pm$ 0,014
	15	23,42 $\pm$ 1,85			
	20	22,57 $\pm$ 1,55	16,52 $\pm$ 1,70	0,053 $\pm$ 0,012	1,376 $\pm$ 0,116
NOR	25	124,85 $\pm$ 11,67			
	30	132,28 $\pm$ 9,84	91,04 $\pm$ 5,43	0,036 $\pm$ 0,007	1,426 $\pm$ 0,109
	35	138,85 $\pm$ 6,46			
	40	137,42 $\pm$ 5,80	105,60 $\pm$ 12,09	0,027 $\pm$ 0,005	1,397 $\pm$ 0,129
LAV	45	22,00 $\pm$ 3,59			
	50	20,57 $\pm$ 2,20	12,43 $\pm$ 1,70	0,085 $\pm$ 0,016	1,622 $\pm$ 0,105
NOR	55	126,00 $\pm$ 4,28			
	60	128,57 $\pm$ 7,09	91,28 $\pm$ 6,34	0,038 $\pm$ 0,004	1,437 $\pm$ 0,109
	65	130,00 $\pm$ 4,54			
	70	127,71 $\pm$ 4,86	90,90 $\pm$ 6,50	0,043 $\pm$ 0,007	1,469 $\pm$ 0,115
LAV	75	22,00 $\pm$ 2,42			
	80	20,85 $\pm$ 2,13	12,96 $\pm$ 1,11	0,116 $\pm$ 0,022	1,646 $\pm$ 0,095
NOR	85	122,85 $\pm$ 4,73			
	90	128,28 $\pm$ 4,67	83,54 $\pm$ 7,84	0,055 $\pm$ 0,006	1,468 $\pm$ 0,104
	95	126,28 $\pm$ 5,31			
	100	130,00 $\pm$ 5,75	89,92 $\pm$ 6,06	0,050 $\pm$ 0,009	1,478 $\pm$ 0,098

FIGURA 14 - Efeitos do BN 52024 ( $2,35 \times 10^{-6}M$ ) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}M$ ), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo BN 52022 ( $2,47 \times 10^{-6}M$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultados da in fusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos (n = expressos em média  $\pm$  E.P.M.

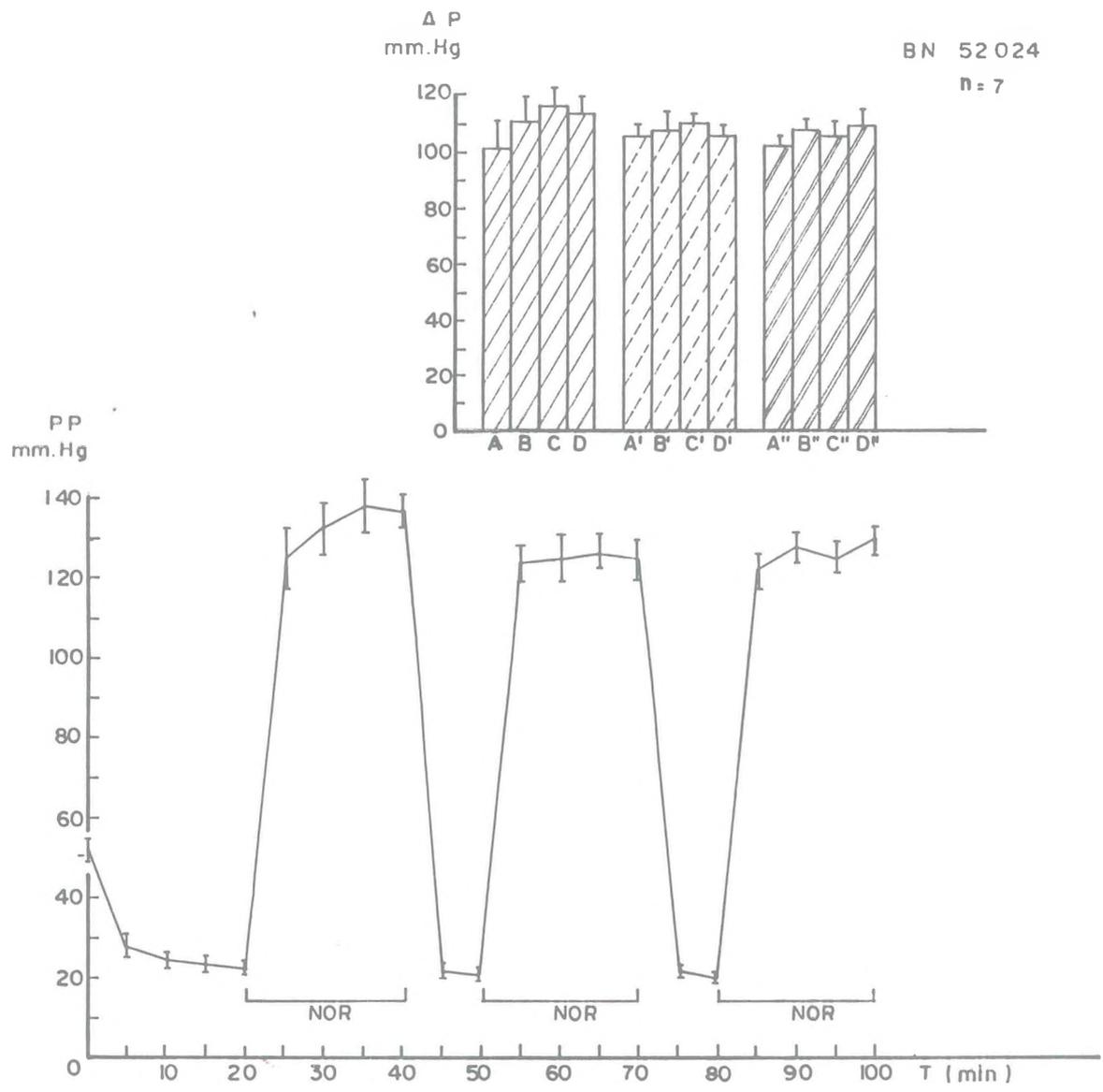
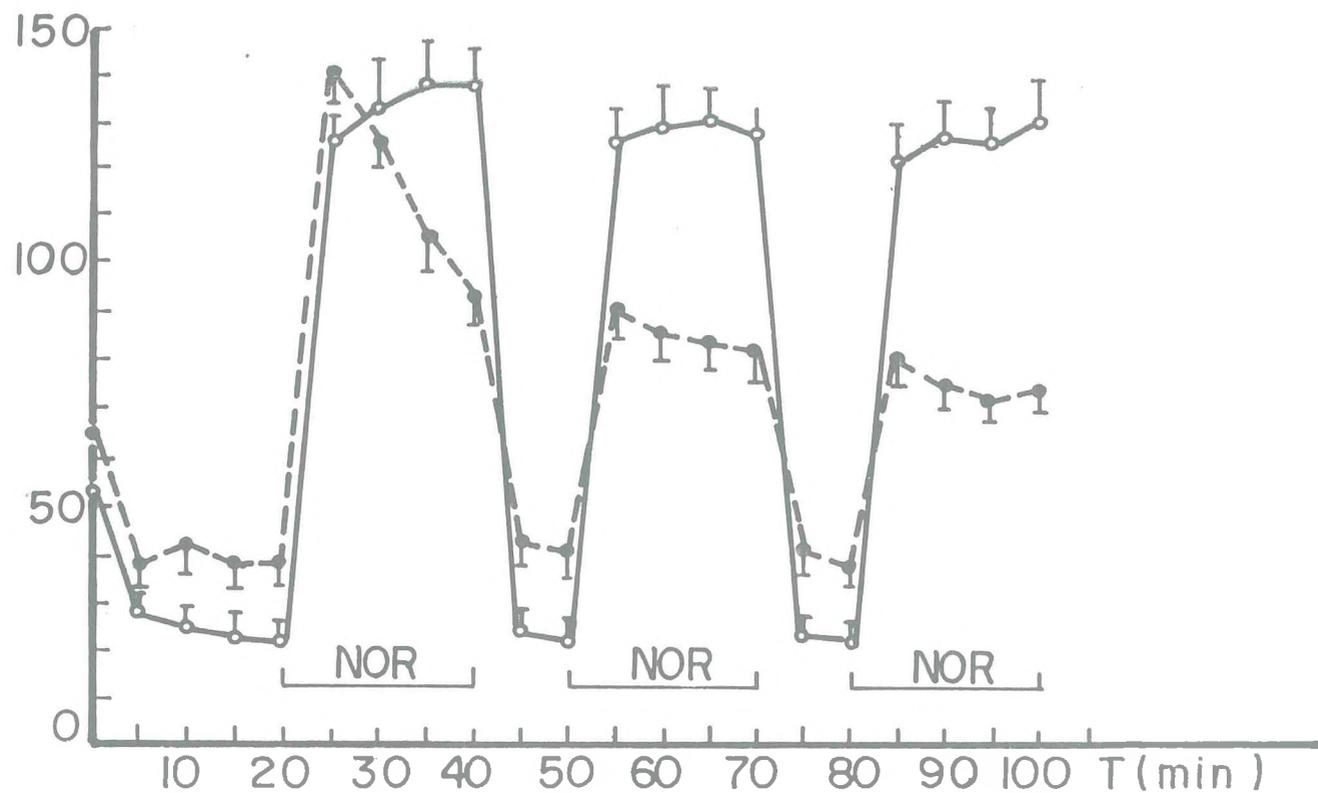


FIGURA 15 - Bloqueio da taquifilaxia noradrenérgica pelo BN 52024 ( $2,35 \times 10^{-6}M$ ).

- a) Rins foram perfundidos com soluçãc de Krebs-Henseleit contendo ( $2,35 \times 10^{-6}M$ ) de BN 52024.
- b) Os rins controle foram comparados para demonstrar a reversão completa da taquifilaxia.
- c) Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PP  
mmHg

○—○ BN 52024 (n=7)  
●- -● CONTROLE (n=10)



três curvas de infusão de NOR ( $p < 0,05$ ), com acentuada queda dos níveis pressóricos durante os períodos de lavagem, fazendo-os atingir índices bastante críticos. A resistência vascular mostrou valores semelhantes aos do subgrupo controle, o mesmo ocorrendo com os fluxos urinário e do perfusato (Tabela XVI). A tendência à manutenção dos elevados valores da pressão de perfusão durante todos os períodos de infusão do  $\alpha$  agonista, resultou na abolição da taquifilaxia noradrenérgica conforme pode ser observado na Figura 14.

O resultado da ausência de dessensibilização à NOR apresentada pela preparação submetida à ação do BN 52024, pode ser traduzida pelo bloqueio quase completo das reações de escape vascular renal nesse subgrupo, ocorrendo indistintamente nos três períodos de infusão de NOR (Tabela XIX).

#### 3.4.2 - Antagonista sintético

48740 RP, produto de síntese com propriedades antagonicas ao PAF, foi diluído em solução de KH e perfundido em rins descapsulados na concentração de  $10^{-5}M$ , nos tempos experimentais já citados. Os resultados referentes a esse subgrupo podem ser analisados nas Tabelas XVII e XIX.

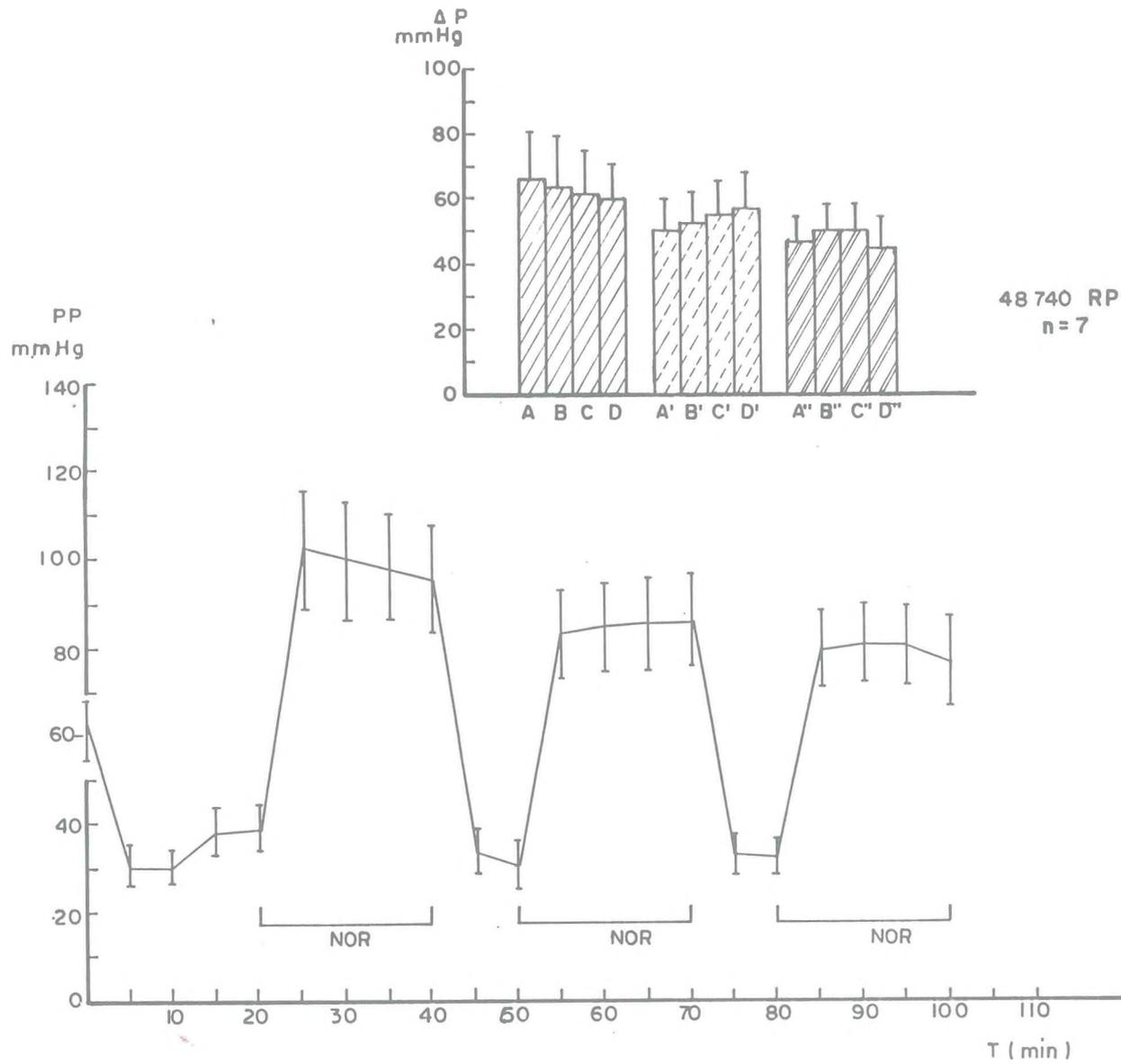
A principal alteração decorrente do tratamento da preparação com o antagonista sintético caracterizou-se por manutenção dos níveis de resistência vascular durante todo o experimento, mesmo quando a pressão de perfusão decresceu, como era esperado, devido ao fenômeno da taquifilaxia nora-

TABELA XVII - Efeitos do 48740 RP ( $10^{-5}$ M) no rim isolado de coelho perfundi-  
do com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenali-  
na ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	62,85 $\pm$ 6,30			
	5	30,71 $\pm$ 4,10			
	10	30,42 $\pm$ 2,81	31,52 $\pm$ 4,56	0,047 $\pm$ 0,009	1,076 $\pm$ 0,176
	15	36,57 $\pm$ 3,95			
	20	37,14 $\pm$ 4,52	47,72 $\pm$ 5,60	0,054 $\pm$ 0,008	0,806 $\pm$ 0,071
NOR	25	102,57 $\pm$ 14,69			
	30	100,00 $\pm$ 13,97	124,08 $\pm$ 20,22	0,097 $\pm$ 0,035	0,856 $\pm$ 0,076
	35	98,28 $\pm$ 13,63			
	40	96,85 $\pm$ 13,22	117,67 $\pm$ 17,83	0,097 $\pm$ 0,036	0,858 $\pm$ 0,070
LAV	45	36,85 $\pm$ 4,62			
	50	33,71 $\pm$ 4,98	40,39 $\pm$ 3,87	0,069 $\pm$ 0,014	0,855 $\pm$ 0,070
NOR	55	83,71 $\pm$ 10,80			
	60	85,71 $\pm$ 11,23	106,10 $\pm$ 15,85	0,049 $\pm$ 0,012	0,876 $\pm$ 0,082
	65	86,28 $\pm$ 10,91			
	70	86,85 $\pm$ 11,44	110,95 $\pm$ 15,26	0,050 $\pm$ 0,011	0,851 $\pm$ 0,071
LAV	75	33,19 $\pm$ 4,12			
	80	32,00 $\pm$ 3,96	34,94 $\pm$ 3,10	0,049 $\pm$ 0,010	0,886 $\pm$ 0,059
NOR	85	78,57 $\pm$ 8,29			
	90	82,57 $\pm$ 9,34	101,44 $\pm$ 13,76	0,044 $\pm$ 0,010	0,889 $\pm$ 0,074
	95	82,28 $\pm$ 9,65			
	100	76,85 $\pm$ 10,18	100,71 $\pm$ 14,74	0,039 $\pm$ 0,009	0,840 $\pm$ 0,081

FIGURA 17 - Efeitos do 48740 RP ( $10^{-5}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}$ M), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo RP 48740 ( $10^{-5}$ ).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos resultantes da infusão de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C. D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos (n = 7), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



drenérgica. Tanto o fluxo urinário como o fluxo do perfusato evoluíram sem modificações apreciáveis comparados aos controles. A pressão de perfusão e a resistência vascular mostraram os mais elevados índices de dispersão dentre todos os subgrupos estudados (Tabela XVIII).

O escape vascular apresentou-se reduzido apenas no primeiro período de infusão de NOR, permanecendo com valores semelhantes ao do subgrupo controle nos demais períodos (Tabela XIX). Detalhes da taquifilaxia e do escape vascular desse subgrupo podem ser observados na Figura 16.

#### 3.4.3 - Antagonista farmacológico

WEB 2086, derivado triazolobenzodiazepínico destituído de ação hipnótica, foi utilizado neste estudo na concentração de  $10^{-6}$  M. Como os demais compostos analisados, foi infundido juntamente com solução de KH em rins descapsulados conforme protocolo.

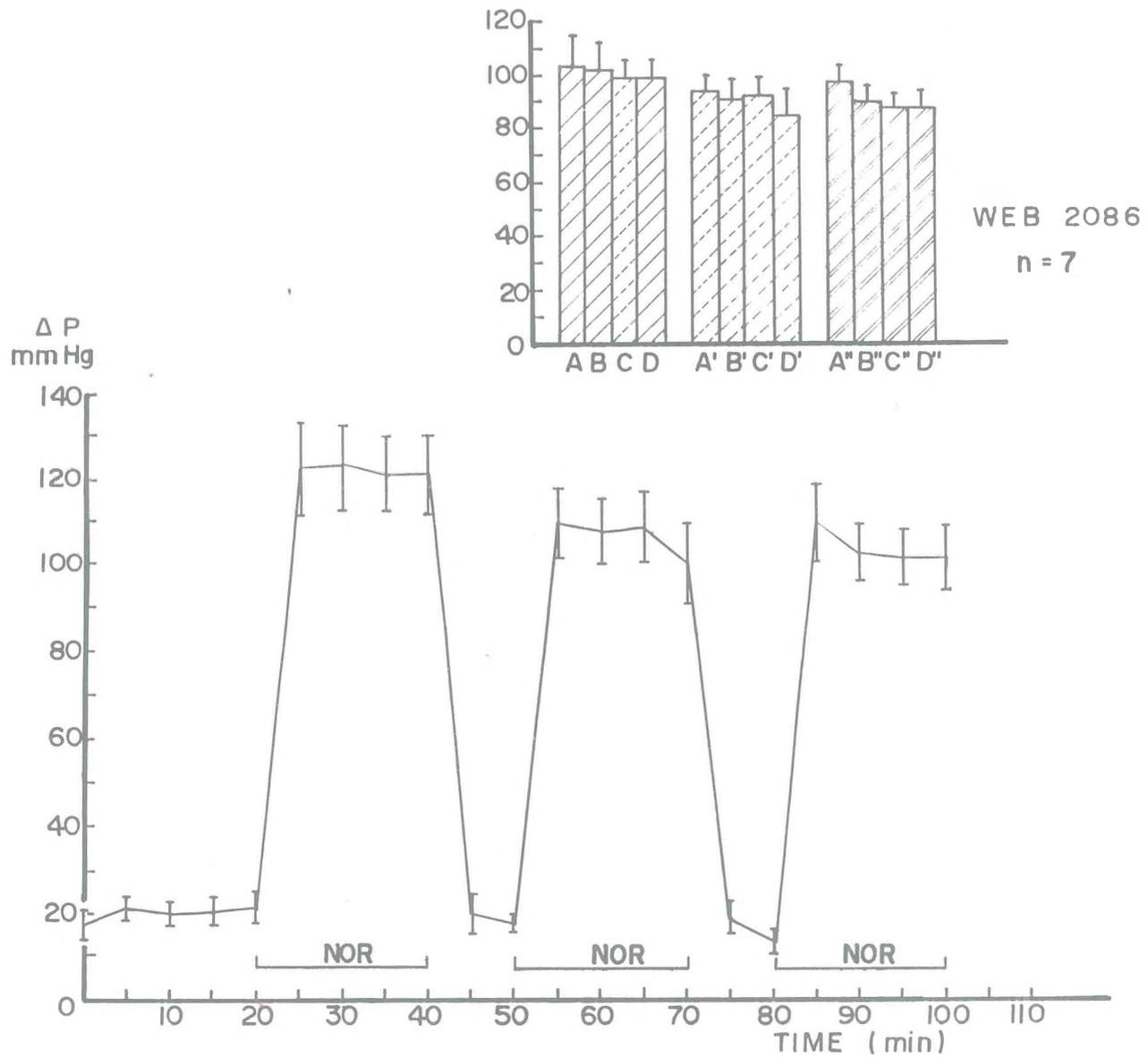
Os dados referentes aos parâmetros funcionais renais obtidos com a infusão de WEB 2086 diferiram daqueles observados no período controle em alguns pontos: foi identificado neste subgrupo um bloqueio parcial da resposta taquifilática, principalmente nas duas últimas curvas de NOR (Figura 17). Outro aspecto chamativo refere-se à pressão de perfusão dos períodos de lavagem, as quais mantiveram os mais baixos níveis de todos os grupos experimentais, atingindo valores críticos de 15 mmHg. Apesar desse fato, foi mantido um fluxo urinário com redução insignificante se com

TABELA XVIII - Efeitos de WEB 2086 ( $10^{-6}$ M) no rim isolado de coelho perfundido com solução de Krebs-Henseleit e infundido com noradrenalina ( $1,3 \times 10^{-6}$ M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

PERÍODO	Tempo (min)	P. Perfusão (mmHg)	Resistência (mmHg/ml/g/min)	F. Urinário (ml/g/min)	F. Perf. (ml/g/min)
C O N T R O L E	0	18,57 $\pm$ 5,51			
	5	23,14 $\pm$ 3,05			
	10	20,71 $\pm$ 3,76	14,81 $\pm$ 2,37	0,031 $\pm$ 0,006	1,493 $\pm$ 0,122
	15	21,71 $\pm$ 4,17			
	20	22,28 $\pm$ 4,21	16,79 $\pm$ 3,33	0,035 $\pm$ 0,009	1,356 $\pm$ 0,083
NOR	25	125,14 $\pm$ 12,07			
	30	126,85 $\pm$ 9,11	80,35 $\pm$ 12,45	0,033 $\pm$ 0,009	1,388 $\pm$ 0,107
	35	122,57 $\pm$ 8,96			
	40	122,85 $\pm$ 8,58	74,00 $\pm$ 10,50	0,031 $\pm$ 0,007	1,404 $\pm$ 0,090
LAV	45	20,00 $\pm$ 4,04			
	50	16,00 $\pm$ 2,83	11,66 $\pm$ 1,98	0,072 $\pm$ 0,013	1,540 $\pm$ 0,111
NOR	55	109,71 $\pm$ 8,23			
	60	106,00 $\pm$ 7,02	65,30 $\pm$ 10,20	0,042 $\pm$ 0,008	1,398 $\pm$ 0,089
	65	107,71 $\pm$ 7,44			
	70	105,42 $\pm$ 9,29	79,47 $\pm$ 7,62	0,041 $\pm$ 0,007	1,378 $\pm$ 0,087
LAV	75	18,00 $\pm$ 3,28			
	80	13,57 $\pm$ 2,98	10,89 $\pm$ 2,59	0,088 $\pm$ 0,012	0,518 $\pm$ 0,085
NOR	85	110,28 $\pm$ 8,83			
	90	102,00 $\pm$ 6,65	79,67 $\pm$ 6,65	0,045 $\pm$ 0,007	1,360 $\pm$ 0,083
	95	102,57 $\pm$ 6,86			
	100	100,57 $\pm$ 8,03	73,41 $\pm$ 6,70	0,047 $\pm$ 0,009	1,406 $\pm$ 0,085

FIGURA 17 - Efeitos do WEB 2086 ( $10^{-6}$ M) sobre o rim de coelho, isolado e perfundido.

- a) PP representa a pressão de perfusão em rins submetidos à infusão de NOR ( $1,3 \times 10^{-6}$ M), em três períodos consecutivos intercalados com etapas de lavagem.
- b) Rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo WEB 2086 ( $10^{-6}$ M).
- c)  $\Delta P$  representa a diferença entre os valores da pressão basal e os picos de NOR a intervalos de 5 minutos (A, B, C, D).
- d) Resultados referentes a 7 experimentos (n = 7), expressos em média  $\pm$  E.P.M.



parada ao subgrupo controle (Tabela XVIII).

Os resultados referentes à percentagem de escape vascular mostraram bloqueio parcial do fenômeno, notadamente durante o primeiro período de infusão do  $\alpha$  agonista (Tabela XIX).

A análise comparativa da percentagem de escape pode ser melhor analisada na Tabela XX, onde são expressos os resultados dos 13 subgrupos aqui apresentados, com os respectivos níveis de significância.

A Figura 15 mostra o bloqueio da taquifilaxia à NOR promovido pela infusão de BN 52024m quando se compara a evolução de pressão de perfusão deste subgrupo com os valores observados no subgrupo controle.

TABELA XIX - Efeitos de diversos antagonistas específicos do PAF sobre a percentagem de escape vascular induzido por NOR ( $1,3 \times 10^{-6}$  M). Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

SUBGRUPOS	n <sup>(a)</sup>	C <sub>1</sub> <sup>(b)</sup>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
BN 52021	7	24,78 $\pm$ 4,19 <sup>**</sup>	25,91 $\pm$ 5,07	21,96 $\pm$ 3,15
BN 52022	7	35,69 $\pm$ 8,16	16,72 $\pm$ 3,50 <sup>**</sup>	14,62 $\pm$ 3,00
BN 52024	7	9,70 $\pm$ 2,46 <sup>***</sup>	11,51 $\pm$ 1,87 <sup>***</sup>	6,47 $\pm$ 1,68 <sup>***</sup>
48740 RP	7	30,18 $\pm$ 5,35 <sup>*</sup>	21,28 $\pm$ 6,50	20,47 $\pm$ 5,55
WEB 2086	7	33,18 $\pm$ 5,48 <sup>*</sup>	23,94 $\pm$ 5,52	18,09 $\pm$ 3,09

(a) Número de experimentos realizados

(b) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> correspondem aos valores de escape obtidos durante a infusão de NOR

Níveis de significância: \* p < 0,05    \*\* p < 0,001    \*\*\* p < 0,0001

TABELA XX - Percentagem de escape vascular. Resumos dos subgrupos estudados e níveis de significância<sup>(a)</sup>

GRUPO	SUBGRUPO	n <sup>(b)</sup>	C <sub>1</sub> <sup>(c)</sup>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
<u>1. REATIVIDADE ADRENÉRGICA</u>					
	Descapsulados <sup>d</sup>	10	50,32 ± 4,61	31,87 ± 3,81	22,65 ± 4,22
	Capsulados	6	28,33 ± 2,59*	17,19 ± 2,47*	13,94 ± 1,18
	DMSO	10	30,77 ± 3,71*	22,22 ± 2,23*	22,43 ± 4,69
<u>2. BLOQUEADORES DO EDRF</u>					
	Azul de Metileno	6	28,53 ± 2,11*	22,03 ± 3,39	19,49 ± 4,16
	Colagenase	7	34,06 ± 7,65	24,95 ± 3,28	22,05 ± 3,60
	EP 10161	7	52,01 ± 7,45	28,13 ± 7,55	4,76 ± 4,41***
<u>3. ETÉR-FOSFOLIPÍDIOS</u>					
	PAF	7	45,85 ± 6,52	32,87 ± 7,01	33,49 ± 7,23
	Liso-PAF	7	65,74 ± 6,40*	46,31 ± 4,51	51,21 ± 7,39**
<u>4. ANTAGONISTAS DO PAF</u>					
	BN 52021	7	24,78 ± 4,19**	25,91 ± 5,07	21,96 ± 3,15
	BN 52022	7	35,69 ± 8,16	16,72 ± 3,50**	14,62 ± 3,00
	BN 52024	7	09,70 ± 2,46***	11,51 ± 1,87***	06,47 ± 1,68***
	48740 RP	7	30,18 ± 5,35*	21,28 ± 6,50	20,47 ± 5,55
	WEB 2086	7	33,18 ± 5,48*	23,94 ± 2,52	18,09 ± 3,09

(a) Níveis de significância:

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

\*\*\* p < 0,001

(b) Número de experimentos de cada subgrupo

(c) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> representam períodos de infusão de NOR durante os quais foi observada a ocorrência de escape.

(d) Subgrupo controle constituído por rins descapsulados previamente.

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Reatividade adrenérgica em rim perfundido com solução de Krebs-Henseleit

A ocorrência de reações vasculares autoregulatórias promovidas pela noradrenalina (NOR) sempre foram interpretadas de modo cauteloso. Constantemente surgiam questionamentos sobre a possibilidade de se estar analisando como noradrenérgicas, reações inespecíficas oriundas da interação do  $\alpha$  agonista com outros sistemas mediadores, em função da identificação de um número crescente dos chamados "hormônios locais". Este fato se tornou mais patente quando as reações de escape noredrenérgico passaram a ser referidas como um fenômeno inconstante, ora expresso com grande magnitude (ROSS, 1967; RICHARDSON & JOHNSON, 1969), ora incipiente (KERR e cols., 1978), podendo mesmo, em alguns casos, estar totalmente ausente (JOHNSON e cols., 1970). A inevitável comparação com as reações autoregulatórias promovidas por estimulação simpática colaborou mais ainda para confundir a interpretação do fenômeno, já que muitas vezes, uma preparação responsiva a um estímulo simpático, não reproduzia a mesma resposta quando o indutor da contração era a NOR (LUTZ & HENRICH, 1973). Por outro lado, a correlação do fenômeno com a participação de  $\beta$  receptores em seu mecanismo, fez com que reações de escape em preparações submetidas a bloqueio com propranolol, fossem estudadas. Dificuldades in

terpretativas surgiram quando os resultados destes experimentos mostraram-se também conflitantes, ora com redução ou abolição do escape vascular frente ao  $\beta$  bloqueador (ROSS, 1967), ora revelando ausência completa da interferência do bloqueio  $\beta$  no processo autoregulatório (FARA & ROSS, 1972). Tantos eram os resultados discrepantes dos experimentos com NOR na avaliação do escape autoregulatório, que GREENWAY (1984), numa revisão sobre o assunto, afirmava que a reação vascular do escape noradrenérgico ainda não se constituía num evento conclusivamente demonstrável.

Foi à partir de 1973 que FONTELES e cols., (1973a, b; 1974; 1980), desenvolveram um modelo experimental de perfusão de rim de coelho através do qual parâmetros funcionais hemodinâmicos passaram a ser estudados sob diferentes condições experimentais. A utilização de um sistema de perfusão aberto, sem recirculação, evitava o acúmulo de metabólitos e permitia a preservação do rim sem alterações funcionais durante 90 minutos em temperatura de 37°C (FONTELES e cols., 1973; JESKE e cols., 1973). As reações de escape vascular noradrenérgico puderam então ser estudadas sob condições de normo e hipotermia (FONTELES e cols., 1974), em animais geneticamente hipertensos e normotensos (FONTELES & JESKE, 1980), e em todas estas situações havia uma clara manifestação do escape tanto no que se referia à frequência quanto à intensidade do fenômeno. A demonstração por FONTELES & AHLQUIST (1980) da ausência de receptores  $\beta$  em rins de coelho submetidos à diferentes condições térmicas, ampliou decisivamente a compreensão dos eventos relativos à rea-

tividade vascular no modelo estudado, afastando definitivamente qualquer questionamento quanto à participação de receptores  $\beta$  no processo. Por outro lado a determinação de concentrações ótimas de NOR para a indução do escape no rim de coelho pode ser estudada por FONTELES e LIMA E FORTI (1984), ao analisar o fenômeno sob concentrações crescentes do  $\alpha$  agonista. Foi possível assim detectar valores significativos de escape vascular renal à partir de concentrações de NOR da ordem de  $10^{-7}$  M, encontrando esses autores uma frequência significativa de escape na faixa de  $10^{-6}$  M, dose essa usada nesta pesquisa.

O modelo experimental proposto no presente trabalho é portanto resultante da experiência desenvolvida com um sistema de perfusão de órgão isolado, o qual tem permitido, com bastante acurabilidade, o estudo da reatividade adrenérgica pela avaliação das reações de escape vascular e taquifilaxia, assim como de outros parâmetros fisiológicos renais, quando submetida a preparação aos efeitos de diferentes substâncias possivelmente envolvidas na mediação da resposta vascular renal.

No presente trabalho a escolha do grupo controle foi precedida da análise de três subgrupos distintos. Rins perfundidos sob situações de stress físico (retirada de cápsula renal) e físico-químico (retirada de cápsula renal e perfusão com dimetilsulfóxido - DMSO), foram comparados com rins cujas cápsulas permaneceram íntegras e sofreram unicamente infusão com solução de KH, como habitualmente ocorre nos experimentos com perfusão renal (FONTELES e cols, 1973;

COSTA E FORTI & FONTELES, 1979). No que pese as múltiplas ações farmacológicas descritas como decorrentes de seu emprego, o DMSO permite uma melhor penetração no tecido alvo da substância nele dissolvida pelas relações de equilíbrio que estabelece com a água tecidual, comportando-se por isso como o solvente orgânico preferencial em inúmeras situações (JACOB & HERSCHLER, 1986). A utilização do DMSO na dissolução de alguns compostos estudados neste trabalho, justificou a análise de um subgrupo controle perfundido com solução de KH contendo o solvente.

Ficou patente pelos resultados obtidos que a presença da cápsula renal pode se constituir num elemento limitante à expressão plena da reatividade adrenérgica, quer se ja ela traduzida pela percentagem de escape ou pela intensidade da reação taquifilática. Por outro lado o relato de vasodilatação e aumento de fluxo urinário como ações farmacológicas atribuídas ao DMSO (FORMANECK & SUCKER, 1966; ROTH, 1968), suscitou a expectativa de um possível diminuição na pressão de perfusão renal quando fosse o solvente perfundido juntamente com a solução KH. A análise dos parâmetros relativos à resistência vascular e ao fluxo urinário entretanto não reproduziu, nesse subgrupo, os efeitos previstos pela adição de DMSO, provavelmente devido a sua grande diluição, da ordem de 0,65%. Quando se comparou entretanto esses rins com aqueles cujas cápsulas haviam sido previamente retiradas, estas últimas apresentaram pressões de perfusão médias inferiores, inclusive àqueles cujas cápsulas haviam sido mantidas, certamente porque a cápsula funcionava como um fator que

restringia o processo de vasodilatação. Desse modo a descapsulação prévia dos órgãos passou a ser preconizada como método que, induzindo à ocorrência de níveis basais menores, permitia uma maior amplitude dos valores máximo e mínimo da pressão de perfusão, concorrendo para tornar melhor evidenciado o efeito vasoconstrictor do  $\alpha$  agonista. Assim posto, a descapsulação do rim passou à rotina experimental nos estudos de perfusão dos demais grupos, com os rins descapsulados sendo utilizados como padrão comparativo de todos subgrupos.

O padrão de resposta obtida em rins descapsulados não diferiu em sua essência dos demais resultados da literatura, os quais utilizaram experimentos realizados com rins em cápsulas íntegras (FONTELES e cols., 1973a,b; FONTELES & MOREIRA LIMA, 1984; COSTA E FORTI & FONTELES, 1979). Ademais, a resposta pressórica dos rins descapsulados aos efeitos vasoconstrictores é mais homogênea, já que em muitas preparações o rompimento da cápsula durante o experimento enseja maior dispersão nos valores obtidos com a pressão de perfusão.

#### 4.2 - Bloqueio do EDRF/NO (EDNO)

A descoberta da dependência do endotélio na vasodilatação induzida por inúmeras substâncias endógenas (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980) tornou imperativa a investigação de sua possível participação nos fenômenos renais vasoativos. A natureza bioquímica do EDRF ainda era especulada

quando os primeiros experimentos em rim de coelho foram foram realizados utilizando o azul de metileno. HOLZMANN (1982) já havia demonstrado que o corante era capaz de abolir não só o relaxamento da musculatura lisa vascular como também a elevação de  $GMP_c$  que acompanhava esta reação. Inúmeros outros trabalhos relatavam que a estimulação da guanilato ciclase solúvel determinada pela ação de óxido nítrico e outros compostos nitrosos, assim como o relaxamento muscular liso decorrentes da ação destes compostos, eram eficazmente bloqueados pelo azul de metileno (GRUETTER e cols., 1980; 1981; MARTIN e cols., 1984). A ausência na época de um melhor conhecimento sobre a natureza físico-química do EDRF determinou a modificação no protocolo de perfusão, o qual passou a prever um período de infusão direta e contínua do azul de metileno, após a lavagem consecutiva à primeira curva de NOR e imediatamente antes do segundo período de infusão do  $\alpha$  agonista. A constatação da responsividade da preparação à NOR antes do tratamento com o corante e a comparação com as curvas subsequentes de infusão após o azul de metileno, permitiu a observação de uma resposta contrátil eficaz, porém parcialmente bloqueada quanto aos fenômenos de escape e da taquifilaxia. Inexistem na literatura dados referentes à perfusão de órgãos com azul de metileno relacionando-os ao estudo da vasoatividade. Esse fato dificultou a comparação dos resultados do presente trabalho, notadamente porque são conhecidas as respostas vasculares de preparações arteriais isoladas, íntegras ou com endotélio removido. Ademais, os segmentos arteriais são previamente estimulados por indu

tores da liberação de EDRF/NO, geralmente Ach e do agonista de cálcio A 23187 (HOLZMANN, 1982; FURCHGOTT, 1984, IGNARRO & KADOWITZ, 1985; MARTIN e cols., 1984), responsáveis pelo aumento da atividade da guanilato ciclase solúvel no músculo liso arterial. É possível que os efeitos inibitórios exercidos sobre o rim isolado tenham sido apenas parcialmente manifestos, decorrentes unicamente da ação bloqueadora sobre a produção contínua e basal do EDRF/NO, que sabemos ocorrer em artérias não estimuladas (GRIFFITH, 1984). Também é possível que o corante exerça seu efeito inibitório na dependência da elevação de  $GMP_c$ , o qual se constituiria assim no elemento detonador da reação específica do corante sobre os segmentos arteriais previamente estimulados para liberar o EDRF/NO.

Os resultados inconclusivos obtidos com o emprego do azul de metileno no bloqueio das prováveis ações mediadoras do EDRF/NO sobre o escape e a taquifilaxia, conduziram as investigações para a análise destes parâmetros em preparações submetidas à desendotelização química com colagenase. Se correta a hipótese de uma mediação do escape e da taquifilaxia à NOR pelo EDRF/NO, a desendotelização da preparação deveria mostrar abolição dos dois fenômenos vasculares. Por outro lado profundas modificações eram esperadas, notadamente na pressão de perfusão e na resistência, já que inúmeros trabalhos sugeriam o papel modulador do endotélio na resposta contrátil. COCKS & ANGUS (1983) estudando os efeitos contráteis da adrenalina e da NOR em coronária de cão, observaram um aumento da resposta contrátil em

artérias desendotelizadas, fato que atribuíram à eliminação da produção de substâncias vasodilatadoras habitualmente aí produzidas. VERRECHIA e cols. (1985) obtiveram resultados semelhantes em artéria cerebral média de coelho, uma preparação que, endotelizada, responde debilmente à NOR. ANGUS & COCKS (1984) admitiam a dependência do endotélio intacto na resposta contrátil como resultante do equilíbrio entre as ações diretas, constrictoras, sobre as células do músculo liso, e sinais dilatadores gerados pelas células endoteliiais. A remoção destas sensibilizaria o vaso à ação de constrictores, aumentando porisso o efeito da NOR. Em aorta de rato ÈGLEME e cols. (1984) observaram que a retirada do endotélio provocava uma exacerbação preferencial dos efeitos da clonidina sobre os da NOR, sugerindo a participação de receptores  $\alpha_2$  no processo. Recentemente O'MALLEY e cols. (1986) confirmaram estes dados "in vitro" e acrescentaram resultados "ex vivo", ao observarem que o tratamento prévio de coelhos com prazosin inibia a resposta contrátil à NOR aumentada pela remoção do endotélio.

Os nossos resultados, obtidos com a infusão de colagenase no rim isolado, não confirmou a maioria dos dados da literatura relativos às observações do comportamento de artérias isoladas e desendotelizadas frente à NOR. Mais uma vez a inexistência de resultados referentes a observação desta resposta em órgãos isolados e perfundidos dificultou a comparação dos dados observados aqui. Alguns aspectos entretanto merecem comentário, notadamente no que se refere ao tipo de preparação empregada. Com exceção da etapa perti

nente à remoção química do endotélio, foram utilizadas sempre artérias não danificadas ou submetidas a qualquer tipo de seccionamento. Sabe-se que em animais intactos a resposta muscular lisa à agentes circulantes é decorrente da difusão da substância através da via íntima-média, enquanto que nas preparações isoladas a via adventícia-média pode ser preferencial (CARRIER & WHITE, 1985). Talvez este fato justifique a ausência em nossos experimentos de alterações da resposta contrátil à NOR, comportando-se o subgrupo da colagenase semelhantemente ao subgrupo controle na grande maioria dos parâmetros estudados, excetuando-se uma discreta redução na percentagem do escape vascular na primeira curva de infusão de NOR. Não foram registrados também aumentos da pressão de perfusão, o que revelaria um incremento na resposta contrátil vascular frente à NOR na artéria desendotelizada. Estes resultados corroboram os trabalhos pioneiros de DE MEY & VANHOUTTE (1981), os quais estudando a sensibilidade de artéria femural do cão às catecolaminas, não evidenciaram nenhum aumento da resposta contrátil após a remoção do endotélio. CARRIER & WHITE (1985), utilizando aorta de rato desendotelizada mecanicamente, porém com controle de microscopia eletrônica na avaliação da integridade das células do músculo liso, não conseguiram estabelecer diferenças entre as preparações desendotelizadas e íntegras quanto a resposta contrátil frente à NOR. Fica estabelecido assim que no modelo atual de perfusão renal, a desendotelização arterial com colagenase não produziu amplificação da resposta contrátil à NOR encontrada em preparações de arté-

rias isoladas.

Tendo em vista as evidências que vinculavam a produção de EDRF à produtos da via da lipooxigenação (FURCHGOTT, 1983; FORSTERMANN & NEUFGANG, 1985), e as observações de FONTELES & LIMA E FORTI (1984) acerca da significativa inibição do escape vascular por bloqueadores da ciclooxigenase como a aspirina e a indometacina, foram estudados também os efeitos do EP 10161, potente bloqueador da lipooxigenase, sobre os parâmetros funcionais hemodinâmicos no rim isolado. Os resultados deste subgrupo mostraram um significativo bloqueio do escape vascular na última curva de NOR, num efeito tardio porém expressivo ( $p < 0,001$ ). Este fato pode decorrer da existência de um período de latência necessário para que o composto manifeste seus efeitos e por certo ensejará futuras investigações quanto ao significado da lipooxigenase no mecanismo do escape vascular.

À luz do atual conhecimento acerca da origem do EDRF/NO (EDNO) algumas considerações são oportunas para a conclusão dos resultados aqui apresentados. Acreditamos não ser o modelo experimental proposto o ideal para a observação dos efeitos do EDNO. Ao longo do experimento inúmeras circunstâncias tornam desfavorável a obtenção de resultados mais conclusivos. Apesar de sua produção contínua, o EDNO é facilmente inativado por níveis fisiológicos de temperatura e pH, normalmente utilizados nos trabalhos com perfusão de órgãos. Ademais, a mistura de carbogênio usada na oxigenação do tecido renal é outro fator que contribui negativamente para a preservação do composto que se sabe ser extrem

mamente lábil. O uso de NOR como  $\alpha$  agonista para o estudo da vasoatividade frente ao EDNO tem sido discutido pela possibilidade de ser a catecolamina igualmente um inativador do vasodilatador endógeno por sua ação antioxidante.

#### 4.3 - Estudo com eterfosfolipídios

O tecido renal dispõe de condições extremamente favoráveis para a síntese e metabolização do PAF. Tanto o substrato 1-alkil-2-acyl-glicerofosfocolina, como a fosfolipase  $A_2$  e as demais enzimas do sistema colinacetilase, estão presentes no glomérulo e nas células mesangiais do rim (PIROTSKY e cols., 1984). A capacidade do rim em produzir o mediador já foi demonstrada em cultura de tecido renal (CAMUSSI e cols., 1983), em rim isolado e estimulado com ionóforo A 23187 (PIROTSKY e cols., 1984), em glomérulo isolado e em cultura de células mesangiais (SCHLONDORFF e cols., 1986). A presença de substância PAF-símile foi também observada em urina normal por SANCHEZ-CRESPO (1983).

Apesar das repercussões renais da infusão de PAF sistêmico serem bastante conhecidas, são poucos os dados referentes às ações primárias do fosfolipídio sobre o rim. Alguns trabalhos como o de SCHERF e cols. (1986), mostram efeito constrictor do PAF infundido em rim de cão anestesiado, acompanhado de diminuição do fluxo sanguíneo renal (RBF), do quociente de filtração glomerular (GFR), do volume urinário (UV) e da excreção renal de sódio ( $U_{Na}V$ ). Todas estas alterações ocorreram simultaneamente ao registro de

pressão sistêmica normal. SCHWERTSCHLAG e cols. (1986) mostraram resultados inversos ao de SCHERF e cols., ao relatarem que no rim de rato os efeitos da infusão de L-PAF na artéria renal se caracterizavam por potente vasodilatação acompanhada por redução da resistência vascular renal. HÉBERT e cols. (1987) demonstraram que no cão anestesiado e pretratado com indometacina, a perfusão de PAF na artéria renal se fazia acompanhar por redução do fluxo plasmático e da taxa de filtração glomerular, embora fosse mantida a pressão sistêmica dentro dos níveis de normalidade. Estes resultados sugerem a existência de uma clara dissociação entre os efeitos sistêmicos e renais promovidos pelo éterfosfolípido, o que por certo resulta também das interrelações entre o mesmo e outros mediadores presentes no tecido renal.

Em nossos experimentos com o rim isolado de coelho tanto o PAF como o Liso-PAF foram infundidos em rins previamente lavados com solução de KH, sendo com isso evitada a presença de elementos sanguíneos que, de algum modo, pudessem interferir com a resposta aos éterfosfolípídios. Para confirmar a especificidade das respostas vasculares, o Liso-PAF, isômero sem ação farmacológica, foi infundido nas mesmas condições experimentais, constituindo outro subgrupo.

Os resultados obtidos com a análise dos dois subgrupos permite afirmar conclusivamente sobre a existência de uma participação do PAF no mecanismo do escape vascular renal. A significativa elevação dos valores da percentagem de escape nos rins tratados com Liso-PAF demonstra claramen

te essa evidência. Este achado vincula a participação do PAF endógeno ao fenômeno vasoativo, já que o Liso-PAF é o substrato para a sua síntese na presença do sistema enzimático específico, no qual o rim é extremamente rico. A ausência de efeitos sobre o escape vascular observados com a infusão do PAF sugere também que as variações da resistência registradas durante a infusão de NOR decorrem da liberação do PAF endógeno, deixando entrever que o PAF exógeno, infundido, é ineficaz na promoção do escape renovascular.

As observações de FONTELES & LIMA E FORTI (1984) sobre o significativo bloqueio da percentagem de escape vascular em rins de coelhos pretratados com indometacina, sugere a participação de PG neste fenômeno vascular. O PAF é um grande estimulador da síntese de PG e tromboxanos pelo rim (SCHLONDORFF, 1984). Além desse fato, os efeitos do esterfosfolipídio sobre a microcirculação renal parecem ocorrer independentemente dos eventos hemodinâmicos sistêmicos. Entretanto não podemos atribuir unicamente às PG os resultados observados em nosso trabalho, já que as mesmas não são estimuladas em sua síntese pela infusão de Liso-PAF em rim de coelho (WEISMAN e cols., 1985). É provável que o PAF endógeno exerça seus efeitos renais próprios, independentemente da mediação de outros reguladores locais da vasoatividade. É plausível também que esta ação biológica na microcirculação renal se efetue através da amplificação do estímulo em receptores  $\alpha$  adrenérgicos largamente encontrados no rim de coelho.

#### 4.4 - Antagonistas do PAF

Os resultados obtidos com a observação dos efeitos dos esterfosfolipídios sobre o escape noradrenérgico, conduziram resolutamente nossos experimentos ao estudo da reatividade adrenérgica do rim de coelho frente a vários antagonistas específicos do PAF. Dentre eles, os derivados naturais da Ginkgo biloba são reconhecidamente inibidores competitivos do acoplamento PAF-receptor (BRAQUET, 1984). Entre os ginkgolídios, o BN 52021 é aquele que apresenta maior poder de competição com o receptor de  $[H^3]$ PAF. (BRAQUET e cols., 1985; NUNEZ e cols., 1986). Estruturalmente o BN 52021 é caracterizado pela presença de dois grupamentos hidroxilas em  $C_1$  e  $C_3$ , o que confere a este composto grande poder antagônico. Já o BN 52022 e o BN 52024 guardam entre si semelhanças estruturais quanto à localização de um grupamento hidroxila em  $C_7$ , próximos à fração terc-butil, fato que torna estes dois compostos bem menos competitivos quanto ao acoplamento com o receptor de PAF (BRAQUET e cols., 1987). No que se refere ao BN 52024, a perda de um grupamento hidroxila em  $C_1$ , mais o distancia do BN 52022, resultando num composto com a menor atividade antagônica dentre os ginkgolídios (BRAQUET, 1988). Estudo comparativo das potências inibitórias relativas dos ginkgolídios BN 52020, BN 52021 e BN 52022 sobre o metabolismo do PAF, revelou que estes compostos comportam-se semelhantemente como o fazem em relação à agregação plaquetária e a competição com o receptor específico de PAF (BRAQUET & GODFROID, 1986; LAMANT e

cols., 1987).

Os resultados obtidos em nossos experimentos demonstraram que o escape vascular foi parcialmente bloqueado, notadamente na primeira curva de infusão de NOR, por todos os antagonistas, naturais ou sintéticos, utilizados no experimento. Eles revelaram ainda um significativo bloqueio da taquifilaxia com o BN 52021. No entanto, foi com o ginkgolídeo J, BN 52024, detentor do menor poder antagônico, que pode ser observado bloqueio simultâneo da taquifilaxia e do escape noradrenérgicos, em níveis altamente significativos. Estes resultados sugerem que, pelo menos para o BN 52024, a capacidade em inibir os dois fenômenos vasoativos renais parece não estar relacionada apenas ao processo de acoplamento do composto ao receptor de PAF, podendo depender também de efeitos intrínsecos exercidos pela substância sobre o tecido alvo. Esta impressão é reforçada pelos resultados obtidos em nosso estudo com o WEB 2086 e o 48740 RP, potentes antagonistas dos eterfosfolipídios, porém incapazes de induzir bloqueio significativo na reatividade adrenérgica. Por outro lado, deve ser salientado que a grande maioria dos estudos de ligação do  $[H^3]$ PAF têm sido realizados em plaquetas, neutrófilos, macrófagos e células do tecido pulmonar (SNYDER, 1989), conhecendo-se pouco sobre o comportamento renal dos receptores de PAF e de seus análogos. O bloqueio pelo BN 52024, de um evento vascular exacerbado pelo Liso-PAF, conduz à reflexão sobre a possível existência de uma afinidade do tecido renal pelo ginkgolídeo, resultante da presença de receptores nas várias linhagens celulares

com capacidade para produzir e metabolizar o eterfosfolipí-  
dio.

Outro aspecto que deve ser enfatizado é o blo-  
queio parcial da taquifilaxia noradrenérgica promovido pelo  
BN 52021 e bloqueio completo resultante da ação do BN  
52024, num modelo experimental no qual as respostas à infu-  
são de NOR sempre se revelaram taquifiláticas (FONTELES &  
MOREIRA LIMA, 1984). Tem sido demonstrado que a taquifila-  
xia promovida pela NOR pode ser abolida por altas concentra-  
ções de cálcio na solução perfusora quando o modelo utiliza-  
do é o rim isolado de coelho (COSTA E FORTI & FONTELES,  
1989b. Contrariamente, pequenas concentrações de cálcio e  
glicose favorecem a taquifilaxia à Angiotensina II. (PAIVA  
e cols., 1977a). Um dos efeitos mais proeminentes dos gink-  
golídios é o de bloquear o mecanismo geral da transdução de  
sinais de membrana celular envolvidos na mobilização de cálcio  
e na ativação da fosfolipase C, os quais agem sinergis-  
ticamente na amplificação do sinal biológico do PAF. Foi  
possível demonstrar a inibição pelo BN 52021 da mobilização  
e do influxo intracelular de cálcio, em plaquetas colocadas  
em meio rico em cálcio (SIMON e cols., 1988). Também em pla-  
quetas o BN 52021 foi capaz de abolir completamente a mobili-  
zação de cálcio do citoplasma com a mesma potencia com que  
bloqueia a agregação (ETIENNE & BAROGGI, 1988). Assim pois  
parece improvável que a inibição da taquifilaxia à NOR ob-  
servada sobretudo com o BN 52024, possa de algum modo, es-  
tar relacionada à ação antagonística ao PAF. Este achado po-  
de refletir uma propriedade específica dessa classe de com-

postos, resultante de uma possível ação sobre a membrana celular, provocando na mesma modificações relativas à mobilização do cálcio.

Foi relatada uma provável dissociação entre o estímulo necessário para iniciar os processos de sinalização e, conseqüentemente, o movimento do cálcio de depósitos intracelulares, daqueles relacionados à geração de diacilglicerol (SIMON e cols., 1987) ou mesmo fosfatidil - inositol. Talvez a possibilidade de permear a membrana celular e ligar-se a alguns sítios dos "pools" intra-celulares de cálcio, possa representar um efeito específico dos ginkgolídi na abolição da taquifilaxia noradrenérgica, sem que este fato necessariamente se vincule ao seu poder antagônico sobre o eterfosfolipídio.

## 5 - CONCLUSÕES

Para a avaliação da participação do Fator de Relaxamento Endotélio-Dependente (EDRF) e do Fator de Ativação de Plaquetas (PAF) sobre o escape vascular e a taquifilaxia induzidos por noradrenalina, foi proposto o modelo experimental de rim de coelho, isolado e perfundido.

Foi utilizado sistema de perfusão com comprovada adequação ao estudo de parâmetros vasoativos e hemodinâmicos renais, tendo como líquido perfusor a solução de Krebs-Henseleit infundida sob fluxo constante.

Protocolo experimental previu experimentos com substâncias bloqueadoras de EDRF/NO, com eterfosfolipídios (PAF e Liso-PAF) e com antagonistas específicos do PAF, naturais e sintéticos. Com exceção das infusões de colagenase e azul de metileno, todas as demais substâncias em estudo foram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit e perfundidas separadamente.

A análise funcional do rim abrangeu o estudo de parâmetros vasoativos, representados pela percentagem de escape vascular e observação de taquifilaxia, induzidos pela infusão de noradrenalina. As alterações hemodinâmicas foram estudadas através da análise da pressão de perfusão, da resistência vascular e dos fluxos urinário e do perfusato.

A avaliação da participação do EDRF/NO nos fenôme

nos vasoativos e hemodinâmicos resultou inconclusiva, provavelmente em decorrência de: I) inativação rápida do EDRF/NO produzido basalmente; II) ausência no líquido perfusor de substâncias indutoras da produção de EDRF/NO; III) utilização de leito vascular com comprovada integridade endotelial e/ou muscular. Estes fatos justificam a ausência de resposta significativa nos parâmetros hemodinâmicos quando a preparação foi submetida ao bloqueador específico de EDRF/NO e à ação desendotelizante potente da colagenase.

O resultado significativo, porém tardio, obtido com o EP 10161 na redução do escape vascular, deixa em aberto futuras investigações para a avaliação da participação de produtos da via de lipooxigenação no processo vasoativo em estudo.

As observações com eterfosfolipídios comprovaram a participação relevante do PAF endógeno nos processos vasoativos e hemodinâmicos aqui estudados. Foi detectado significativo aumento na percentagem do escape vascular quando da infusão de Liso-PAF, análogo precursor do PAF. A redução da resistência vascular e a manutenção da pressão de perfusão em níveis semelhantes aos controles foram observados com a infusão de Liso-PAF. Ficou evidenciada a completa ineficácia do PAF exógeno na promoção de alterações nas respostas vasoativas e hemodinâmicas, fato que demandará por certo futuras investigações, tendo em vista a escassez de dados na literatura referentes aos efeitos do fosfolipídio em rins isolados e perfundidos.

A confirmação da participação do PAF nos eventos vasculares aqui estudados foi conseguida com a observação sobre a função renal, dos efeitos de antagonistas específicos do fosfolipídio. Foram empregados: I) antagonistas naturais, derivados da Ginkgo biloba (ginkgolídios B, C e J); II) composto sintético 48740 RP, possuidor de comprovados efeitos antagonistas e III) composto triazolobenzodiazepínico WEB 2086, potente inibidor das ações dos fosfolipídio.

Todos os antagonistas estudados foram capazes de inibir significativamente o escape vascular em uma das três etapas de infusão do  $\alpha$  agonista. O BN 52021 mostrou bloqueio significativo apenas na primeira curva de NOR e foi capaz de bloquear parcialmente a taquifilaxia.

Os resultados mais significativos entretanto foram obtidos com o BN 52024, no bloqueio simultâneo da taquifilaxia e do escape vascular nos três períodos de infusão de NOR.

É sugerido que os resultados obtidos com os ginkgolídios, BN 52021 e, notadamente, com o BN 52024, possam refletir efeitos próprios desta classe de compostos, não necessariamente relacionados apenas às reações antagônicas ao PAF. É aventada a possibilidade de que a dissociação entre os eventos sinalizadores da mobilização do cálcio intracelular e a produção de fosfatidil-inositol já descritas com o PAF, possa representar o mecanismo pelo qual os ginkgolídios exercem seus efeitos, notadamente na redução da resposta taquifilática, evento reconhecidamente associado ao aumento de cálcio intracelular.

## SUMÁRIO

Foi realizado estudo para determinar a participação do EDRF e PAF no mecanismo do escape vascular e da taquifilaxia.

Rins de coelho, isolados e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit foram comparados com órgãos infundidos com substâncias bloqueadoras da ação do EDRF (azul de metileno, colagenase e EP 10161), eterfosfolipídios (PAF e Liso-PAF) e antagonistas do PAF (produtos naturais derivados da Ginkgo biloba e compostos sintéticos 48740 RP e WEB 2086).

O estudo da reatividade renal demonstrou que o Liso-PAF, isômero do PAF destituído de ação farmacológica, foi capaz de aumentar significativamente as reações de escape.

O PAF exógeno, entretanto não modificou os parâmetros de função renal nos rins perfundidos.

EP 10161, um inibidor da lipooxigenase, promoveu uma redução significativa porém tardia na reação de escape.

Os antagonistas do PAF, ginkgolídeos B, C e J, com diferentes potências de afinidade pelo receptor de PAF, foram utilizados com a finalidade de confirmar a participação do PAF no escape vascular e na taquifilaxia do leito da artéria renal. O ginkgolídeo B (BN 52021) bloqueou

parcialmente a taquifilaxia e reduziu significativamente as reações de escape no segundo período da infusão de noradrenalina. Ginkgolídeo J (BN 52024), que tem a menor potência antagonística, foi capaz de bloquear completamente o escape vascular e a taquifilaxia induzidos por noradrenalina.

Os resultados sugerem a participação do PAF endógeno no mecanismo do escape vascular à partir das observações obtidas com seu precursor, Liso-PAF.

Os efeitos do BN 52024 no escape vascular e na taquifilaxia foram caracterizados por bloqueio completo dos dois fenômenos vasoativos. Este resultado pode ser atribuído também a uma propriedade única desta classe de compostos, os quais poderiam exercer sua ação específica sobre os depósitos intracelulares de cálcio, tornando possível e bloqueio da taquifilaxia.

## SUMMARY

The participation of EDRF and PAF in the mechanism of the vascular escape and tachyphylaxis was evaluated using rabbit kidneys, isolated and perfused with Krebs-Henseleit solution. The kidneys were compared with organs infused with EDRF blockers agents (methylene blue, collagenase and EP 10161), etherphospholipids (PAF and Lyso - PAF) and PAF antagonists (naturally occurring products derived from Ginkgo biloba tree and synthetic compounds, 48740 RP and WEB 2086).

The study of renal reactivity showed that kidneys perfused with Lyso - PAF, an isomer of PAF devoided of pharmacological activity, were able to enhance vascular escape reactions. PAF exogenous otherwise did not change any parameter of renal function.

EP 10161, a lipooxygenase inhibitor, was able to promote a late, but significant reduction on escape reactions.

The PAF antagonists, ginkgolides B, C and J, with different PAF binding activities were used in order to confirm PAF participation on vascular escape and tachyphylaxis of renal artery bed. The ginkgolide B (BN 52021), promoted a partial blockade of tachyphylaxis and a significant reduction of escape reactions in the second period of

norepinephrine infusion, Ginkgolide J, (BN 52024), which has the weaker PAF antagonistic activity, was able to block completely the vascular escape and tachyphylaxis induced by norepinephrine.

From these studies we concluded that PAF participates in the mechanism of vascular escape reactions through the results obtained from its precursor, Lyso-PAF.

The effects of BN 52024 on the vascular escape and tachyphylaxis were characterized by complete blockade of the vasoactive phenomena. This result may also be attributed to a unique property of this class of compounds, which could exert a specific action on intracellular calcium deposits, making possible the blockade of tachyphylaxis.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AIKEN, J.W.: Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on angiotensin tachyphylaxis in the isolated coeliac and mesenteric arteries of the rabbit. Pol. J. Pharm. 26: 217-227, 1974.
- 2 - ALBERT, D.H., SNYDER, F.: Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. J. Biol. Chem. 258: 97-102, 1983.
- 3 - ANGUS, J.A., COCKS, M.: Role of endothelium in vascular response to norepinephrine, serotonin and acetylcholine. Biblioteca Cardiologica 38: 43-52, 1984.
- 4 - ANGUS, J.A., COCKS, T.M., SATOH, K.:  $\alpha_2$ -Adrenoreceptors and endothelium-dependent relaxing in canine large arteries. Br. J. Pharmac. 88: 767-777, 1986.
- 5 - ARCHER, C.B., PAGE, C.P., MORLEY, J., MACDONALD, D. M.: Inflammatory characteristics of platelet-activating factor in human skin. Br. J. Dermatol. 112: 285-290, 1985.
- 6 - AXELSON, K.L., WIKBERG, J.E.S., ANDERSON, R.G.G.: Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. Life Sci. 24: 1779-1786, 1979.

- 7 - BALLOU, L.R., CHEUNG, W.Y.: Marked increase of human platelet phospholipase  $A_2$  activity "in vitro" and demonstration of an endogenous inhibitor. Proc. Natl. Acad. USA 80: 5203-5207, 1983.
- 8 - BARSOUM, G.S., GADDUM, J.H.: The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. J. Physiol. 85: 1-14, 1935.
- 9 - BARANES, J., HELLEGOUARCH, A., LE HEGARAT, M., VIOSAT, I., AUGUET, M., CHABRIER, P.E., BRAQUET, P.: The effects of PAF-acether on the cardiovascular system and their inhibition by a new highly specific PAF-acether receptor antagonist BN 52021 Pharmacol. Res. Commun. 8: 717-737, 1986.
- 10 - BARBARO, J.F., ZVAILER, N.J.: Antigen-induced histamine release from platelet of rabbits producing homologous PCA antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 1245-1247, 1966.
- 11 - BENVENISTE, J., HENSON, P.M., COCHRANE, C.A.: Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet activating factor. J. Exp. Med. 136:1356-1377, 1972.
- 12 - BENVENISTE, J.: Platelet-Activating Factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. Nature. 249: 581.582, 1974.
- 13 - BENVENISTE, J., LE COUEDIC, J.P., POLONSKI, J. TENCÉ, M.: Structural analysis of purified platelet activating factor by lipases. Nature.269:170-171,1977.

- 14 - BENVENISTE, J., TENCÉ, M., VARENNE, P. BIDAULT, J., BOULLET, C., POLONSKI, J.: Semi-synthesis and proposed structure of platelet activating factor (PAF): PAF-acether an alkyl ether analog of lyso-phosphatidylcholine. C.R.C. Acad. Sci. 289D: 1037-1040, 1979.
- 15 - BENVENISTE, J., CHIGNARD, M., LE COUEDIC, J.P., VARGAFTIG, B.B.: Biosynthesis of Platelet-Activating Factor (PAF-acether) II. Involvement of phospholipase A<sub>2</sub> in the formation of PAF-acether and Lyso-PAF acether from rabbit platelet. Thromb. Res. 25: 375-385, 1982.
- 16 - BENVENISTE, J., BOULLET, C., BRINK, C., LABAT. C.: The actions of PAF (Platelet-Activating Factor) on guinea-pig isolated heart preparations. Br. J. Pharmac. 80: 81-83, 1983.
- 17 - BERKOWITZ, B., OHLSTEIN, E.H.: Progress on the characterization and identification of Endothelium-Derived Relaxing Factor(s). Drug. Res. 7: 291-297, 1986.
- 18 - BESSIN, P., BONNET, J., AFFER, D., SOULARD, C., DESGROUX, C., PELAS, I., BENVENISTE, J.: Acute circulatory collapse caused by Platelet Activating Factor (PAF-acether) in dogs. Eur. J. Pharmacol. 86: 403-13, 1983.
- 19 - BLANK, M.L., SNYDER, F., BYERS, L.W., BROOKS, B., MUIRHEAD, E.E.: Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1194-1200, 1979.

- 20 - BLANK, M.L., CRESS, E.A., WHITTLE, T. SNYDER, F.: "In vivo" metabolism of a new class of biologically active phospholipids: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline, a Platelet Activating Hypotensive Phospholipid. Life Sci. 29: 769-775, 1981.
- 21 - BOHME, E., GRAF, H., SCHULTZ, G.: Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic AMP formation in smooth muscle and platelet. Adv. Cyclic. Nucleotides. Res. 9: 131-143, 1978.
- 22 - BOURGAIN, R.H., MAES, L., BRAQUET, P., ANDRIES, R., TOUQUI, L.; BRAQUET, M.: The effects of 1-O-alkyl-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether) on the arterial wall. Prostaglandins 2: 185-197, 1985.
- 23 - BRAQUET, P.: The ginkgolides. From chinese pharmacopeia to a new class of pharmacological agents: the antagonists of platelet-activating factor. In Ginkgolides - Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives. Vol. I, pp XV-XXXIV, Ed. Pierre Braquet, J.R. Prous. Science Publishers, 1988.
- 24 - BRAQUET, P.: Treatment or prevention of PAF-acether disorders provoked by a new series of highly specific inhibitors. GB Belg BE 901, 915 [see CA103: 189808d, (1985)], 1984.
- 25 - BRAQUET, P., BRAQUET, M., BESSIN, P., VARGAFTIG, B.B.: Platelet Activating Factor: A Potential Mediator of Shock. Em Advances in Prostaglandins, Thromboxane and Leukotriene Research, vol. 17, ed. B. Sa-

- muelson, R. Paoletti, P.W. Ramwell. Raven Press, N. Y., 1987b. pp. 818-823.
- 26 - BRAQUET, P., GODFROID, J.J.: PAF-acether specific binding sites: 2. Design of specific antagonists. TIPS 7: 397-403, 1986.
- 27 - BRAQUET, P., SPINNEWYN, B., BRAQUET, M., BOURGAIN, R. H., TAYLOR, J.E., ETIENNE. A., DRIEW, K.: BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether receptor antagonist isolated from *Gingko biloba*. Blood Vessels 16: 558-572, 1985.
- 28 - BRAQUET, P. TOUQUI, L., SHEN, Y. VARGAFTIG, B.B.: Perspectives in platelet-activating factor research. Pharmacol. Rev. 39: 97-145, 1987a.
- 29 - CAILLARD, C.G., MONDOT, S., ZUNDEL, J.L., JULOU, L.: Hypotensive activity of PAF-acether in rats. Agents Actions 12: 725-730, 1982.
- 30 - CALDWELL, P.R.B., SEGAL, B.C., HSU, K.C., DAS, M., SOFFER, R.L.: Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. Science, 191: 1050-1051, 1976.
- 31 - CAMUSSI, G., AGLIETTA, M., MALAVASI, F., TETTA, C., PIACEBELLO, W., SANAVIO, F.: The release of platelet activating factor from human endothelial cells in culture. J. Immunol. 131: 297, 1983.
- 32 - CAMUSSI, G., MENCIA-HUERTA, J.M., BENVENISTE, J.: Release complexes, complement and neutrophils on

- human and rabbit mastocytes and basophils. Immunology 33: 523-534, 1977.
- 33 - CARRIER, G.O., WHITE, R.E.: Enhancement of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. J. Pharm. Exp. Ther. 232: 682-687, 1985.
- 34 - CASALS-STENZEL, J., MUACEVIC, G., WEBER, K.H.: WEB 2086 a new and specific antagonist of platelet activating factor (PAF). Arch. Pharmacol. 334: R44, 1986.
- 35 - CASALS-STENZEL, J., WEBER, K.H.: Triazolodiazepines : dissociation of their PAF (platelet-activating factor) antagonistic and CNS activity. Br. J. Pharmacol. 90: 139-146, 1987.
- 36 - CHAMPY, C., GLEY, E. Sur la toxicité des extraits de corps jaune. Immunization rapide consecutive a l'injection de repetides doses de ces extraits (Tachyphylaxis). C.R. Soc. Biol. 71: 159-62, 1911.
- 37 - CHERRY, P.D., FURCHGOTT, R.F., ZAWADSKI, J.V., JOTHIA NANDAN, D.: The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by Bradikinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 79: 2106-2110, 1982.
- 38 - CHILTON, F.H., O'FLAHERTY, J.T., WALSH, C.E., THOMAS, M.J., WYKLE, R.L., DECHATELET, L.R., WAITE, B.M. : Platelet Activating Factor. Stimulation of the Lipooxygenase Pathway in Polymorphonuclear Leukocytes by 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocho-

- line. J. Biol. Chem. 257: 5402-5407, 1982.
- 39 - CHIGNARD, M., LE COUEDIC, J.P., TENCÉ, M., VARGAFTIG, B.B., BENVENISTE, J.: The role of Platelet-Activating Factor in Platelet Aggregation. Nature. 279: 799-800, 1979.
- 40 - COCKS, T.M., ANGUS, J.A.: Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. Nature. 305: 627-630, 1983.
- 41 - COEFFIER, E., CERRINA, J., JOUVIN-MARCHE, E., BENVENISTE, J.: Inhibition of rabbit platelet aggregation by the  $Ca^{2+}$  - antagonists verapamil and diltiazem and by trifluoperazine. Thromb. Res. 31: 565-576, 1983.
- 42 - COREY, E.J., KANG, M.C., GHOSH, A.K., HOUPIS, I. N.: Total synthesis of ginkgolide B. J. Am. Chem. Soc. 110: 549-651, 1988.
- 43 - COSTA E FORTI, A., FONTELES, M.C.: An alphaadrenotropic study of the normal and diabetic rabbit kidney. Arch. Int. Physiol. Biochem. 87: 887-897, 1979.
- 44 - COSTA E FORTI, A., FONTELES, M.C.: Mecanismo do escape vascular no rim perfundido de coelho diabético (submetido), 1989b.
- 45 - COSTA E FORTI, A., FONTELES, M.C.: Insulin Blockade of Norepinephrine Tachyphylaxis in the Perfused Kidney. Horm. Metab. Res. 21: 395-399, 1989a.
- 46 - DE MEY, J.G., VANHOUTTE, P.M.: Role of the intima in

- cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. J. Physiol. 316: 347-355, 1981.
- 47 - DE MEY, J.G., VANHOUTTE, P.M.: Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. Circulation. Res. 51: 439-447, 1982.
- 48 - DE MEY, J.G., GRAY, S.D.: Endothelium-Dependent Reactivity in Resistance Vessels. Prog. Appl. Microcirc. 8: 181-187, 1985.
- 49 - DEMOPOULOS, C.A., PINCKARD, R.N., HANAHAN, D.J.: Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J. Biol. Chem. 254: 9355-9358, 1979.
- 50 - DIAMOND, J., CHU, E.B.: Possible role for cyclic GMP in endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by acetylcholine. Comparison with nitroglycerin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 41: 369-381, 1983.
- 51 - DRESEL, P., WALLENTIN, I. Effects of sympathetic vasoconstrictor fibers, noradrenaline and vasopressin on the intestinal vascular resistance during constant blood flow or blood pressure. Acta Physiol. Scand. 66: 427-436, 1966.
- 52 - EGLÈME, C., GODFRAIND, T., MILLER, R.C.: Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine af-

- ter removal of the endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 8: 16-18, 1984.
- 53 - ETIENNE, A., BAROGGI, N.: Effects of Ginkgolides on PAF-induced  $Ca^{2+}$  mobilization in platelets. In Ginkgolides - Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives. Vol. I. pp 115-125, ed. P. Braquet, J.R. Prous Science Publishers, 1988.
- 54 - FARA, W.J. & ROSS, G.: Escape from drug-induced constriction of isolated arterial segments from various vascular beds. Angiologica, 9: 27-33, 1972.
- 55 - FEIGL, E., JOHANSSON, B. & LOFVING, B.: Renal vasoconstriction and the "Defense Reaction". Acta. Physiol. Scand. 62: 429-435, 1964.
- 56 - FEUERSTEIN, G.; LUX, W.E., EZRA, D., HAYES, E.C., SNYDER, F. & FADEN, A.I.: Thyrotropin-releasing hormone blocks the hypotensive effects of platelet-activating factor in the anesthetized guinea-pig. J. Cardiovasc. Pharmacol. 7: 335-340, 1985.
- 57 - FINK, G.D. & BRODY, M.J.: Continuous measurement of renal blood flow changes to renal nerve stimulation and intra-arterial drug administration in the rat. Am. J. Physiol. 234(2): H219-H222, 1978.
- 58 - FITZGERALD, M.F., MONCADA, S. & PARENTE, L.: The anaphylatic release of Platelet-Activating Factor from perfused guinea-pig lungs. Br. J. Pharmacol. 88: 149-153, 1986.

- 59 - FOLKOW, B., LEWIS, D., LUNDGREN, O., MELLANDER, S., WALLENTIN, I.: The effect of graded vasoconstriction fiber stimulation on the intestinal resistance capacitance vessel. Acta. Physiol. Scand. 61: 445-457, 1964a.
- 60 - FOLKOW, B., LEWIS, D., LUNDGREN, O., MELLANDER, S., WALLENTIN, I.: The effect of the sympathetic vasoconstrictor fibers on the distribution of capillary blood flow in the intestine. Acta. Physiol. Scand. 61: 458-466, 1964b.
- 61 - FONTELES, M.C., JESKE, A.H. & KAROW, A.M., Jr.: Functional preservation of the mammalian kidney. I. Normothermia, low flow perfusion. J. Sur. Res. 14: 7-15, 1973a.
- 62 - FONTELES, M.C., JESKE, A.H. & KAROW, Jr. A.M.: Blockade of vasoconstriction by isoxsuprine (vasodilan) in the isolated rabbit kidney. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 5: 333, 1973b.
- 63 - FONTELES, M.C., JESKE, A.H., KAROW, Jr., A.M.: Vascular escape in the isolated perfused rabbit kidney. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 7: 153-164, 1974.
- 64 - FONTELES, M.C., JESKE, A.H.: Vasoactivity and vascular escape in isolated perfused kidneys from normotensive versus spontaneous hypertensive rats. Gen. Pharmac. Vol. II: 293-296, 1980.
- 65 - FONTELES, M.C. & AHLQUIST, R.P. A  $\beta$ -adrenotropic study of the isolated rabbit kidney at normo and hypothermia. Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol. 13: 145-

151, 1980.

- 66 - FONTELES, M.C. & MOREIRA LIMA, A.A.: Study of tachyphylaxis and vascular escape in the isolated rabbit kidney: effects of PGE. Rev. Med. Univ. Fed. Ceará, 24(2), 39-44, 1984.
- 67 - FONTELES, M.C. & LIMA E FORTI, C.A.: The effects of nonsteroidal antiinflammatory agents and reserpine on renal vascular escape. Brazilian J. Med. Biol. Res. 17 (5-6): 5128, 1984.
- 68 - FORMANECK, K. & KOVAC, W.: DMSO bei experimentellen Rattenpfotenodemen. "DMSO Symposium, Viena, 1966". pp 18-24, ed. G. LAUDAHAN & K. GERTECH, 1966.
- 69 - FORSTERMANN, U., NEUFGANG, B.: The endothelium-dependent vasodilator effect of Ach: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of AA metabolism. Eur. J. Pharmacol. 103: 65-70, 1984.
- 70 - FORSTERMANN, U. NEUFANG, B.: Endothelium-dependent vasodilation by mellitin: are lipooxygenase products involved? Am. J. Physiol. 249: H14-H19, 1985.
- 71 - FORSTERMANN, U.: Properties and Mechanisms of Production and Action of Endothelium-Derived Relaxing Factor. J. Cardiovasc Pharmacol. 8: S45-S51, 1986.
- 72 - FRIDOVICH, I., HAGEN, P. & MURRAY, J.J.: Endothelium-Derived Relaxing Factor: In Search of the Endogenous Nitroglycerin. NIPS 2: 61-64, 1987.

- 73 - FRIEDLANDER, G., PIROTSKY, E., AMIEL, C. & BENVENISTE, J.: Effects of Platelet Activating Factor in the rat. Agents and Actions. 22: 165-170, 1987.
- 74 - FURUKAWA, S.: Constituents of Ginkgo biloba L. Leaves. Sci. Papers. Inst. Phys. Chem. Res. 19: 27-38, 1932.
- 75 - FURCHGOTT, R.F. & BHADRAKON, S.: Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrate and other drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 108: 129-143, 1953.
- 76 - FURCHGOTT, R.F. & ZAWADSKI, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288: 373-376, 1980.
- 77 - FURCHGOTT, R.F.: The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. Trends. Pharmacol. Sci. 2: 173-178, 1981.
- 78 - FURCHGOTT, R.F., ZAWADSKI, J.V., JOTHADIANANDAN, D., CHERRY, P.D.: Nordihydroguaiaretic acid (NGDA) and  $\alpha$ -p-dibromoacetophenone (BPB) inhibit endothelium-dependent relaxation of arteries by acetylcholine, bradykinin and A 23187. Fed. Proc. 41: 1233, 1982 (Abstract).
- 79 - FURCHGOTT, R.F., ZAWADSKI, J.V., JOTHIANANDAN, D. & CHERRY, P.D.: Nordihydroguaiaretic acid (NGDA) and  $\alpha$ -p-dibromoacetophenone (BPB) inhibit endothelium-dependent relaxation of arteries by acetylcholine

- and A23187 (Abst.) Fed. Proc. 41: 1233, 1982.
- 80 - FURCHGOTT, R.F.: Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. Circ. Res. 53: 557-573, 1983.
- 81 - FURCHGOTT, R.F. & JOTHIANANDAN, D.: Relation of cyclic GMP levels to endothelium-dependent relaxation by acetylcholine in rabbit aorta. Fed. Proc. 42: 619, 1983 (Abstract).
- 82 - FURCHGOTT, R.F.: The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. Am.Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 175-97, 1984.
- 83 - FURCHGOTT, R.F., JOTHIANANDAN, D., CHERRY, P.D.: Endothelium-Dependent Responses: The last three years. Bibliotheca Cardiologica. 38: 1-15, 1984b.
- 84 - FURCHGOTT, R.F., CHERRY, P.D., ZAWADSKI, J.V., JOTHIANANDAN, D.: Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. J. Cardiovasc. Pharmacol. 6: S336-S343, 1984a.
- 85 - FURLONG, B., HENDERSON, A.H., LEWIS, M.J. & SMITH, J. A.: Endothelium-derived relaxing factor inhibits "in vitro" platelet aggregation. Br. J. Pharmac. 90: 687-692, 1987.
- 86 - GODFROID, J.J., HEYMANS, F., MICHEL, E., REDEUILH, C., STEINER, E. & BENVENISTE, J.: Platelet-Activating factor (PAF-acether): Total synthesis of 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline. FEBS

LETT. 116: 161-164, 1980.

- 87 - GOMEZ, H. & YARD, C.A.: Cardiac and Vascular Changes in Acute Tolerance to Norepinephrine Infusion. J. Pharmacol. Exp. Ther. 164: 270-279, 1968.
- 88 - GOSSELIN, R.E. & GOSSELIN, R.S.: Tachyphylaxis of Guinea-pig ileum to histamine and furtrethonium. J. Pharmac. Exp. Ther. 181: 494-505, 1973.
- 89 - GREENWAY, C.V., LAWSON, A.E. & MELLANDER, S.: The effects of stimulation of the hepatic nerves, infusions of noradrenaline and occlusion of the carotid arteries on liver blood flow in the anesthetized cats. J. Physiol. 192: 21-41, 1967.
- 90 - GREENWAY, C.V. & OSHIRO, G.: Comparison of the effects of hepatic nerve stimulation on arterial flow, distribution of arterial and portal flow and blood content in the livers of anesthetized cats and dogs. J. Physiol. 227: 487-501, 1972.
- 91 - GREENWAY, C.V., SCOTT, G.D., ZINK, J.: Sites of autoregulatory escape of blood flow in the mesenteric vascular bed. J. Physiol. 259: 1-12, 1976.
- 92 - GREENWAY, C.V.: Neural Control and Autoregulatory Escape In Physiology of the Intestinal Circulation. Ed. A.P. Shephert & D.N. Grayer, Raven Press, New York, 1984.
- 93 - GRIFFITH, T.M., EDWARDS, D.H., LEWIS, M.J., NEWBY, A.C. & HENDERSON, A.H.: The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. Nature. 308: 645-

647, 1984.

- 94 - GRUETTER, C.A., GRUETTER, D.Y., LYON, L.J., KADOWITZ, P.J. & IGNARRO, L.J.: Relationship between cyclic guanosine 3'5'monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide. Effects of methylene blue and methemoglobin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 219: 181-186, 1981a.
- 95 - GRUETTER, C.A., KADOWITZ, P.J., IGNARRO, C.J.: Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrate and amyl nitrate. Can. J. Physiol. Pharmacol. 59: 150-156, 1981b.
- 96 - GRYGLEWSKI, R.J., MONCADA, S. & PALMER, R.M.J.: Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmac. 87: 685-694, 1986.
- 97 - HANAHAN, D.J., DEMOPOULOS, C.A., LIEHR, J. & PINCKARD, R.N.: Identification of Platelet Activating Factor isolated from rabbit basophils as acetyl-glyceryl ether phosphorycholine. J. Biol. Chem. 255: 5514-5516, 1980.
- 98 - HANAHAN, D.J.: Platelet-Activating Factor: a biologically active phosphoglyceride. Ann. Rev. Biochem. 55: 483-509, 1986.
- 99 - HANSON, K.M.: Escape of liver vasculature from adrenergic vasoconstriction. Proc. Soc. Exp. Biol. And. Med. 141: 385-390, 1972.

- 100 - HASLAM, R.J. & VANDERWEL, M.: Inhibition of Platelet adenylate cyclase by 1-0-Alkyl-2-0-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine (Platelet Activating Factor). J. Biol. Chem. 257: 6879-6885, 1982.
- 101 - HÉBERT, R.L., SIROIS, P., BRAQUET, P. & PLANTE, G.E.: Hemodynamic effects of PAF-acether on the dog kidney. Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine 26: 189-202, Longman Group, UK, 1987.
- 102 - HENRICH, H. & LUTZ, J.: Das vasculare Escape-Phänomen am Intestinal Kreislauf und seine Auslösung durch unterschiedliche vasoconstrictorische Substanzen. Pflügers Arch. 320: 82-94, 1971.
- 103 - HENRICH, H.: Adjustment behavior of adrenergic induced vasoconstrictions in the intestinal circulation of the cat. Angiologica. 10: 233-247, 1973.
- 104 - HENRICH, H., SINGBARTL, G., BIESTER, J.: Adrenergic induced vascular adjustments, initial and escape reactions. Pflügers Arch. 346: 1-2, 1974.
- 105 - HOLZMANN, S.: Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial studies. J.Cyclic Nucleotides Res. 8: 409-419, 1982.
- 106 - IGNARRO, L.J., LIPTON, H., EDWARDS, J.C., BARICOS, W. H., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J. & GRUETTER, C.A. : Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence of involvement of S-nitroso

- thiols as active intermediates. J. Pharmacol. Exp. 218: 739-749, 1981.
- 107 - IGNARRO, L.J. & KADOWITZ, P.J.: Pharmacological and Physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. Ann. Rev. Pharmacol. 25: 171-191, 1985.
- 108 - IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, E.R., CHAUDHURI, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and release from artery and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9265-9269, 1987a.
- 109 - IGNARRO, L.J., BYRNS, R.E., BUGA, G.M., WOOD, K.S. & CHAUDHURI, G.: Pharmacological Evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogalol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular muscle relaxation. J. Pharmac. Exp. Ther. 244: 181-189, 1987b.
- 110 - IGNARRO, L.J., BUGA, G.M. & CHAUDHURI, G.: EDRF generation and release from perfused bovine pulmonary artery and vein. Eur. J. Pharmacol. 149: 79-88, 1988.
- 111 - IGNARRO, L.J.: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. FASEB J. 3: 31-36, 1989.
- 112 - JACOB, S.W. & HERSCHLER, R.: Pharmacology of DMSO. Criobiologia 23: 14-27, 1986.

- 113 - JAFFE, E.A., NACHMAN, R.L. & BECKER, C.G.: Culture of human endothelial cells derived from umbelical veins. Identification by morphologic and immunological criteria. J. Clin. Investig. 52: 2745-2756, 1973.
- 114 - JESKE, A.H., FONTELES, M.C. & KAROW, Jr. M.: Functional preservation of the mammalian kidney.III. Ultrastructure with low flow perfusion at normothermia. J. Surg. Res. 15: 4-12, 1973.
- 116 - JOHANSON, B., SPARKS, H. & BIBER, B.: The escape of the renal blood flow response during sympathetic nerve stimulation. Angiologica. 7: 333-343, 1970.
- 117 - KATSUKI, S. & MURAD, F.: Regulation of adenosine cyclic 3'5' monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. Mol. Pharmacol. 13: 330-341, 1977.
- 118 - KARAKI, H. & NAGASE, H.: Low temperature augments the endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta. Eur. J. Pharmacol. 142: 129-132, 1987.
- 119 - KAWASAKI, A. & NEEDLEMAN, P.: Contribution of thromboxane to renal resistance changes in the isolated perfused hydronephrotic rabbit kidney. Cir. Res. 50: 486-490, 1982.
- 120 - KERR, J.C., REYNOLDS, D.G., SWAN, K.G.: Adrenergic stimulation and blockade in mesenteric circulation of the baboon. Am. J. Physiol. 234: E457-E462, 1978.
- 121 - KHAIRALLAH, P.A., PAGE, I.H., BUMPUS, F.M. & TURKER.

- R.K.: Angiotensin tachyphylaxis and its reversal. Cir. Res. 19: 274-254, 1966.
- 122 - KHAN, S.N., LANE, P.A. & SMITH, A.D.: Disaggregation of PAF-acether-aggregated platelet by verapamil and TM-8 with reversal of phosphorylation of 40K and 20K proteins. Eur. J. Pharmacol. 107: 189-198, 1985.
- 123 - KOO, A. & CHENG, K.K.: Vascular escape in the cerebral microcirculation in the rat. Microvasc. Res. 11: 25-32, 1976.
- 124 - KORNECKI, E., EHRLICH, Y.H. & LENOX, R.: Platelet-activating Factor-induced aggregation of platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines. Science. 226. 1454-1456, 1984.
- 125 - KREBS, H.A. & HENSELEIT, K.: Untersuchugen uber die Harnstoffbildung im Tierkorper. Z. Physiol. Chem. 210: 33-66, 1932.
- 126 - LAMANT, V., MAUCO, G., BRAQUET, P., CHAP, H. & DOUSTE-BLAZY, L.: Inhibition of platelet activating factor (PAF-acether) metabolism by three specific antagonists from Ginkgo biloba. Biochem. Pharmacol. 132: 61-67, 1987.
- 127 - LAUTT, W.W.: Effect of stimulation of hepatic nerves on hepatic O<sub>2</sub> uptake and blood flow. Am. J. Physiol. 232, H652-H656, 1977.
- 128 - LAUTT, W.W.: Autoregulation of superior mesenteric ar

- tery is blocked by adenosine antagonism. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64: 1291-1295, 1986.
- 129 - LAUTT, W.W. & GRAHAM, S.: Effect of nerve stimulation on precapillary sfincters, oxygen extraction and hemodynamics in the intestine of cats. Circ. Res. 41: 32.36, 1977.
- 130 - LAUTT, W.W. & LEGARE, D.J.: Adenosine modulation of hepatic arterial but not portal venous constriction induced by sympathetic nerves, norepinephrine, angiotensin and vasopressin in the cat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64: 449-454, 1986.
- 131 - LAUTT, W.W., LEGARE, D.J. & LOCKHART, L.K.: Vascular escape from vasoconstriction and post-stimulatory hyperemia in the superior mesenteric artery of the cat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 66: 1174-1180, 1987.
- 132 - LAUTT, W.W., LOCKHART, L.K. & LEGARE, D.J.: Adenosine modulation of vasoconstrictor responses to stimulation of sympathetic nerves and norepinephrine infusion in the superior mesenteric artery of the cat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 66: 937-941, 1987.
- 133 - LEE, T.C. & SNYDER, F.: Function, metabolism and regulation of platelet activating factor and related ether lipids. Phospholipids and Cellular Regulation. CRC Press: 1-39, 1985.
- 134 - LEFORT, J., ROTILLO, D. & VARGAFTIG, B.B.: The platelet-independent release of thromboxane A<sub>2</sub> by PAF-

acether from guinea-pig lungs involves mechanisms distinct from those for Leukotriene  $C_4$  and Bradikinin. Br. J. Pharmacol. 82: 525-575, 1984.

- 135 - LEVY, J.V.: Calmodulin antagonist W-7 inhibits aggregation of human platelet induced by Platelet Activating Factor. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 172: 393 - 395, 1983.
- 136 - LUSCHER, T.F., COOKE, J.P., HOUSTON, D.S. & VANHOUTTE, P.M.: Endothelium-Dependent relaxations in human arteries. Mayo Clinics Procedures, 62: 601 - 607, 1987.
- 137 - LUTZ, J. & HENRICH, H.: Vergleich des vasculären Escape-Phänomens an der intestinalen und renalen Strombahn bei nervalen sowie humoralen Auslösung. Pflügers Arch. 339: 37-48, 1973.
- 138 - MARTIN, W., VILLANI, G.M., JOTHIANANDAN, D., FURCHGOTT, R.F.: Blockade of Endothelium-Dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. J. Pharmacol. Exp. Ther. 233: 679-685, 1985a.
- 139 - MARTIN, W., VILLANI, G.M., JOTHIANANDAN, D. & FURCHGOTT, R.F.: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 708 - 716,

1985b.

- 140 - MARUYAMA, M., TERAHARA, A., NAKDAIRA, Y. WOODS, M.C. & NAKANISHI, K.: The Ginkgolides. III. The structure of the ginkgolides. Tetrahedron Lett. 4: 309-393, 1967.
- 141 - MELLION, B.T., IGNARRO, L.J., OHLESTEIN, E.H., PONTECORVO, E.G., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J., Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'5' monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. Blood 57: 946-955, 1981.
- 142 - MELLION, B.T., IGNARRO, L.J., MYERS, C.B. OHLSTEIN, E.H., BALLOT, B.A., HYNAN, A.L., KADOWITZ, P.J.: Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiois. Heme-dependent activation of soluble guanilate ciclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. Mol. Pharmacol. 23: 653-664, 1983.
- 143 - McINTYRE, T.M., REINHOLD, S.L., PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.: Protein kinase C activity appears to be required for the synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B<sub>4</sub> human neutrophils. J. Biol. Chem. 263: I5370-I5376, 1987.
- 144 - McMANUS, L.M., HANAHAN, D.J., DEMOPOULOS, C.A. & Pinkard, R.N. Pathobiology of the intravenous infusion of acetylglyceryl ether phosphorylcholine a synthetic platelet-activating factor (PAF) in the rabbit. J. Immunol 124: 2919, 1980.

- 145 - MONCADA, S., HERMAN, A.G., HIGGS, E.A., VANE, Jr. :  
Differential formation of the arterial wall. An ex  
planation for the anti-thrombogenic properties of  
vascular endothelium. Thromb. Res. 11: 323 - 344,  
1977.
- 146 - MONCADA, S., RADOMSKI, M.W. & PALMER, R.M.J.: Endothe-  
lium-derived relaxing factor. Biochem. Pharmacol.  
37: 2495-2501, 1988.
- 147 - MOORE, A. & KHAIRALLAH, P.A.: Further studies on an-  
giotensin tachyphylaxis. J. Pharmacol. Exp. Ther.  
197: 575-581, 1976.
- 148 - MUIRHEAD, E.E., JONES, F. & STIRMAN, J.A.: Antihyper-  
tensive property in renoprival hypertension of ex-  
tract from renal medulla. J. Lab. Clin. Med. 56:  
167-180, 1960.
- 149 - MURAD, F., ARNOLD, W.P., MITTAL, C.K., BRAYGHLER, J.  
M.: Properties and regulation of guanylate cyclase  
and proposed functions for  $GMP_c$ . Adv. Cyclic Nu-  
cleotide Res. 11: 175-204, 1979.
- 150 - NISHIZUKA, Y.: Turnover of inositol phospholipids and  
signal transduction. Science 225: 1365-1370, 1984.
- 151 - NUNEZ, D., CHIGNARD, M., KORTH, R., LE COUEDIC, J.P.,  
BENVENISTE, J.: Specific inhibition of PAF-acether-  
induced platelet activation by BN 52021 and compa-  
rasion with the PAF-acether inhibitors Kadsurenone  
and CV-3988. Eur. J. Pharmacol.: 123: 197 - 205,  
1986.

- 152 - O'MALLEY, M.K., HAGEN, P.D., MIKAT, E.M., COLE, W.C., RADIC, Z.S., McCANN, R.L.: Increased vascular contraction and sensitivity to norepinephrine after endothelial denudation is inhibited by prazosin. Surgery 99: 36-43, 1986.
- 153 - PAIVA, T.B., MENDES, G.B., PAIVA, A.C.M.: Specific desensitization (tachyphylaxis) of the guinea-pig ileum to angiotensin II. Am. J. Physiol. 232:H223-H230, 1977a.
- 154 - PAIVA, T.B., MIYAMOTO, M.F., JULIANO, L., PAIVA, A.C.M.: Requirements for angiotensin tachyphylaxis in smooth muscles. J. Pharmacol. Exp. Ther. 202: 294-300, 1977b.
- 155 - PAIVA, A.C.M., PAIVA, T.B., MIYAMOTO, M.E., NAKAIE, C.R.: The role of calcium in the response of rabbit aorta to angiotensin. Mayo Clinic. Proc. 52: 427-429, 1977c.
- 156 - PALAIC, D. & LEMORVAN, P.: Angiotensin tachyphylaxis in guinea-pig aortic strips. J. Pharmacol. Exp. Ther. 179: 522-531, 1971.
- 157 - PALMER, R.M.J., ASHTON, D.S., MONCADA, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 333: 664-666, 1988.
- 158 - PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature.

327: 524-526, 1987.

- 159 - PIROTSKY, E. & BENVENISTE, J.: Platelet Activating Factor (PAF) is released from isolated perfused rat kidney. Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 66: 176-177, 1981.
- 160 - PIROTSKY, E. & BENVENISTE, J.: Nouveaux mediateurs lipidiques de l'allergie et de l'inflammation. Immun. Med. 5: 14-18, 1984.
- 161 - PIROTSKY, E. & BIDAULT, T.J.: Formation of PAF-acether by rat kidney. Platelet-Activating Factor. INSERM Symposium N<sup>o</sup> 23. Ed. J. Benveniste & B. Arnoux. pp 117-122. Elsevier Science Publishers, 1983.
- 162 - PIROTSKY, E., BIDAULT, J., BURTIN, C., GUBLER, M.C., BENVENISTE, J.: Release of Platelet-Activating Factor, slow-reacting substance, vasoactive amines from isolated rat kidneys. Kidney Int. 25: 404-410, 1984.
- 163 - PRAÇA, C.F.G., FONTELES, M.C.: Renal vascular escape to norepinephrine (NOR) and angiotensin II (AII) in WKY and SHR rats. II Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Rio de Janeiro, (Abstract) pp 214, 1987.
- 164 - PREWITT, R.L., LEACH, B.E., BYERS, L.W., BLOOKS, S., LANDS, W.E.M. & MUIRHEAD, E.E.: Antihypertensive polar renomedullary lipid, a semisynthetic vasodilator. Hypertension 1: 199-308, 1979.

- 165 - RADOMSKI, M.V., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelet. Br. J. Pharmacol. 92: 181-187, 1987a.
- 166 - RADOMSKI, M.V., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 1482-1489, 1987b.
- 167 - RAPOPORT, R.M., DRAZIN, M.B., MURAD, F.: Sodium nitroprusside-induced protein phosphorylation in intact rat aorta is mimicked by 8-bromo-cyclic GMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6470-6474, 1982.
- 168 - RAPOPORT, R.M., DRAZIN, M.B., MURAD, F.: Endothelium-dependent vascular relaxation may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. Cir. Res. 31: 526A, (Abstract), 1983.
- 169 - RAPOPORT, R.M. & MURAD, F.: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through  $GMP_c$ . Cir. Res. 52: 352-357, 1983.
- 170 - RICHARDSON, D.R. & JOHNSON, P.C.: Comparison of autoregulatory escape and autoregulation in the intestinal vascular bed. Am. J. Physiol. 217: 586-590, 1969.
- 171 - ROSS, G.: Effects of epinephrine and norepinephrine on the mesenteric circulation of the cat. Am. J. Physiol. 212: 1037-1042, 1967.

- 172 - ROSS, G.: Escape of mesenteric vessels from adrenergic and noradrenergic vasoconstriction. Am. J. Physiol. 221(5): 1217-1222, 1971.
- 173 - ROTH, C.A.: Effects of dimethylsulfoxide on pedicle flap flow and survival. J. Amer. Med. Women's Assoc. 23: 895-898, 1968.
- 174 - RUBANYI, G.M., LORENZ, R.R. & VANHOUTTE, P.M.: Bioassay of endothelium-derived relaxing factor (s): inactivation by catecholamines. Am. J. Physiol. 249: H95-H101, 1985.
- 175 - SANCHEZ-CRESPO, M., INARREA, P., ALVAREZ, V., ALONSO, F., EGIDO, J. & HERNANDON, L.: Presence in normal human urine of a hypotensive and platelet-activating phospholipid. Am. J. Physiol. 244: F607-F711,
- 176 - SATOUCHI, K., PINCKARD, R.N., HANAHAN, D.J.: Influence of alkyl ether chain length of acetyl glyceryl ether phosphocholine and its ethanolamine analog on biological activity toward rabbit platelets. Arch. Biochem. Biophys. 211: 683-688, 1981.
- 177 - SÈDIVY, P., CAILLARD, C.G., FLOCH, A., FOLLIARD, F., MONDOT, S., ROBAUT, C. & TERLAIN, B.: 48740 RP: a specific PAF acether antagonist. Prostaglandins 30: 688, 1965.

- 178 - SIBLEY, R.D. & LEFKOWOTZ, R.J.: Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. Nature. 317: 124-129, 1985.
- 179 - SEIDEL, C.L. & LA ROCHELLE, J.: Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. Circ. Res. 60: 626-630, 1987.
- 180 - SINGER, H.A. & PEACH, M.J.: Calcium and endothelial mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. Hypertension. 4: 1119-1125, 1982.
- 181 - SINGER, H.A. & PEACH, M.J.: Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta II. Relaxation stimulated by methacholine and A 23187 with antagonists of arachidonic acid metabolism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 227: 796-801, 1983.
- 182 - SINGER, H.A., SAYE, J.A. & PEACH, M.J.: Effects of cytochrome P450 inhibitors on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. Blood. Vessels. 21: 230, 1984.
- 183 - SIMON, M.F., CHAP, H., BRAQUET, P. & DOUSTE-BLAZY, L.: Effect of BN 52021, a specific antagonist of Platelet Activating Factor on calcium movements and phosphatidic acid production induced by PAF acether in human platelets. Thromb. Res. 45: 299-309, 1987.

- 184 - SIMON, M.F., LAMANT, V., LACHACHI, H., PLANTAVID, M., MAUCO, G., CHAP, H. & DOUSTE-BLAZY, L.: PAF acether metabolism and signalling process inhibition by ginkgolides. In: Ginkgolides - Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives. Vol. I. Ed. P. Braquet. J. R. Prous Science Publishers, pp 127-135, 1988.
- 185 - SIRAGANIAN, R.P. & OSLER, A.G.: Antigenic release of histamine from rabbit leukocytes. J. Immunol. 104: 1340-1347, 1970.
- 186 - STEWART, J.M.: Tachyphylaxis to angiotensin. In: Angiotensin, Ed. I. Page e F. Bumpus. Springer, pp 170-184, 1974.
- 187 - SCHERF, H., NIES, A.S., SCHWERTSCHLAG, U., HUGHES, M. & GERBER, J.G.: Hemodynamic effects of Platelet Activating Factor in the dog kidney in vivo. Hypertension. 8: 737-741, 1986.
- 188 - SCHILD, H.D.: An effect of calcium on histamine desensitization of guinea-pig ileum. Br. J. Pharmacol. 49: 718-726, 1973.
- 189 - SCHLONDORFF, D., SATRIANO, J.A., HAGEGE, J., PEREZ, J. & BAUD, L.: Effect of Platelet Activating Factor and serum treated zymosan on prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis, arachidonic acid release and contraction of cultured rat mesangial cells. J. Clin. Invest. 73: 1227-1231, 1984.
- 190 - SCHLONDORFF, D., GOLDWASSER, P., NEUWIRTH, R., SATRIANO, J.A. & CLAY, K.L.: Production of Platelet Acti-

- vating Factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. Am. J. Physiol. 250: F1123-F1127, 1986.
- 191 - SCHWERTSCHLAG, U., SCHERF, F., GERBER, J.G., MATHIAS, M. & NIES, A.S.: L-Platelet Activating Factor (L-PAF) induced changes on renal vascular resistance (RVR), vascular reactivity and renin release (RR) in the isolated perfused rat kidney. Kidney Int. 29: 388, 1986.
- 192 - SNYDER, F.: Biochemistry of Platelet-Activating Factor: A unique class of biologically active phospholipide. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 190: 125-135, 1989.
- 193 - SYBERTZ, E.J., WATKINS, R.W., VEMULAPALLI, S., BAUM, T., CHIU, P.J.S. & BARNETT, A.: AGEPC, a vasodilator phospholipid with profound circulating actions. In Recent Advances in Arterial Diseases: Atherosclerosis, Hypertension and Vasospasm, pp. 133-156, Alan R. Liss. Inc. 1986.
- 194 - THIEVANT, P., BARANES, J., CHABRIER, P.W. & BRAQUET, P.: Impairment of the Natriuretic and Diuretic Effects of Atrial Natriuretic Factor in anesthetized dog by Platelet-Activating Factor. In: Diuretics II: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications. Ed. J. Pushett & A. GREENBERG, Elsevier. Science Publishers Co., Inc., pp 289-293, 1987.
- 195 - TOUQUI, L., SHAW, A.M., DUMAREY, C., JACQUEMIN, C. &

- VARGAFTIG, B.B.: The role of calcium in regulating the catabolism of PAF-acether (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) by rabbit platelet. Biochem. J. 241: 555-560, 1987.
- 196 - VAN DE VOORDE, J., LEUSEN, I.: Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. Eur. J. Pharmacol. 87: 113-120, 1983.
- 197 - VARGAFTIG, B.B., LEFORT, J., CHIGNARD, M. BENVENISTE, J.: Platelet Activating Factor induces a platelet-dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. Eur. J. Pharmac. 65: 185-192, 1980.
- 198 - VARGAFTIG, B.B., BRAQUET, P.: PAF-acether today - relevance for acute experimental anaphylaxis. Br. Med. Bull. 43: 312-335, 1987.
- 199 - VEMULAPALLI, S., CHIU, P.I.S., BARNETT, A.: Cardiovascular and renal action of platelet-activating factor in anesthetized dogs. Hypertension 6: 489-493, 1984.
- 200 - VERRECHIA, C., SERCOMBE, R. & SEYLAZ, J.: Influence of endothelium on noradrenaline-induced vasoconstriction in rabbit central ear artery. Clin. Exp. Pharmac. Physiol. 12: 169-179, 1985.
- 201 - WARDLAW, A.J. & KAY, A.B.: PAF-acether is a potent chemotactic factor for human eosinophils. J. Allergy. Clin. Immunol. 77: 236, 1986.

- 202 - WEINGES, K., HEPP, M., JAGGI, H.: Isolierung und strukturaufklärung eines neuen Ginkgolides. Liebig Ann. 1987, 521-526,
- 203 - WEISMAN, S.M., FELSEN, D., VAUGHAN, R.J. E.D.: Platelet-Activating Factor is a potent stimulus for renal prostaglandins synthesis: possible significance in unilateral ureteral obstruction. J. Pharmacol. Exp. Ther. 235: 10-15, 1985.
- 204 - WEKSLER, B., LEY, C.W., JAFFE, C.A.: Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin and ionophore A23187. J. Clin. Invest. 62: 923-930, 1978.
- 205 - ZAWADSKI, J.V., CHERRY, P.F., FURCHGOTT, R.F.: Comparison of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by A23187 and by acetylcholine. Pharmacologist 22: 271. 1980.