

**Sonia Regina Riado**

**INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS:  
RESPOSTAS CRONOTRÓPICAS E INOTRÓPICAS EM ÁTRIOS  
ISOLADOS.**

**Dissertação de Mestrado** apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia  
da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de **Mestre** em Ciências  
na área de Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes**

**Co-orientadora: Profa. Dra Angelina ZanESCO**

Campinas, 1999

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA			
V.	Ex.		
TOMBO BC	39.216		
PRCC	2.29/99		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 4,00		
DATA	23/01/99		
N.º CPD			

CM-00136442-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

R35i

Riado, Sônia Regina

Inibição crônica da síntese de óxido nítrico em ratos: respostas cronotrópicas e inotrópicas em átrios isolados / Sônia Regina Riado. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientadores : Edson Antunes, Angelina Zanesco  
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Átrio. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Óxido nítrico. 4. Sistema nervoso autônomo. I. Edson Antunes. II. Angelina Zanesco. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Sonia Regina Riado**

**INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO EM  
RATOS: RESPOSTAS CRONOTRÓPICAS E INOTRÓPICAS  
EM ÁTRIOS ISOLADOS.**

**Orientador: Dr. Edson Antunes**

**Co-orientadora: Dra. Angelina Zanesco**

**Campinas  
1999.**



*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Sonia Regina Riado.*

*Campinas, 29 de setembro de 1999.*

*Prof. Dr. Edson Antunes  
- Orientador -*



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Edson Antunes", is written over a horizontal line.

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antunes

2. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

3. Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Kleber Franchini", is written over a horizontal line.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Lusiane Bendhack", is written over a horizontal line.

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 29/09/1999

---

***Aos meus pais Mauricio e Sonia e aos meus irmãos Junior e Alan, que me ajudaram a chegar onde estou.***

***À Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes Araujo  
que de forma tão especial e competente  
me apresentou a Farmacologia.***

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e Profa. Dra. Angelina Zanesco pela orientação.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci por toda colaboração para que este trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Louis Allen Barker pelo ter me fornecido algumas das drogas utilizadas e principalmente pelas discussões e sugestões que enriqueceram este trabalho.

A Profa. Maria de Lourdes D'Ávila Assumpção ( *in memoriam* ), por sempre ter acreditado no meu potencial. A ela também dedico este trabalho.

Ao Carlos Fermi Gandarez pela compreensão e carinho, sendo acima de tudo meu grande amigo e companheiro

A minha amiga Luzinete Fontes Hirata cujas palavras sempre me dão força e ânimo.

A Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes (Fer) por ensinar-me a técnica de isolamento de átrio esquerdo, pela amizade, acima de tudo...

A Profa. Dra. Maria José Costa Moura (Zezé), pela colaboração, por nossa amizade e por ser como ela é...

A Luciana Piovesan Nathan por ensinar-me as técnicas de tratamento de ratos com L-NAME e medida de pressão arterial de cauda de ratos e por todas as vezes que me auxiliou na execução destas tarefas.

Ao Cleber Evandro Teixeira por estar sempre pronto a me "socorrer" quando o assunto era o computador.

A Carla Fernanda Franco Penteado e Alessandra Linardi pela amizade, pelo que compartilhamos juntas desde a graduação.

Ao Adilson José Thomáz e Miguel da Silva pela dedicação com a qual cuidam dos animais utilizados no Departamento de Farmacologia da UNICAMP.

A Alessandra Lia Gasparetti por ter sido tão amiga, fazendo mais do que estivesse ao seu alcance para me ajudar .

A Alice Bricola pela amizade e pelas vezes que gentilmente me auxiliou no tratamento dos animais.

Ao Agnaldo Fernando pelo apoio técnico.



Ao Gildo Bernardo Leite pela gentileza com a qual sempre colaborou comigo na execução deste trabalho.

A Maria das Dores Ponciano (Dora) pela paciência...

Ao Wanderlei da Cunha Claro, Gislaine Elias Alipio e Maria Rita de Lima pela eficiência, por serem sempre prestativos.

A D. Vita Mercedes de Araujo Moraes que sempre foi prestativa cuidando da limpeza e lavagem dos materiais.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia.

Aos animais que doaram a própria vida por este trabalho, meu sincero agradecimento e respeito.

A Deus por sempre guiar meus passos.

*Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse o amor, eu não seria nada.*

*(1Cor 13,2)*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
Óxido nítrico: biossíntese e inibição .....	1
Alterações hemodinâmicas induzidas por inibidores da síntese de NO .....	3
Catecolaminas e adrenoceptores .....	5
Acetilcolina e seus receptores .....	7
Objetivos .....	11
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
Animais .....	12
Tratamento experimental .....	12
Medida de pressão arterial .....	12
Análise histológica do coração .....	13
Átrios isolados .....	14
Obtenção e análise das curvas concentração-efeito .....	15
Átrios direitos isolados .....	16
Átrios esquerdos isolados .....	16
Análise estatística .....	17
<b>3. RESULTADOS</b>	
Pressão arterial .....	18
Átrio direito isolado .....	19
Estudos realizados com adição "in vitro" de L-NAME .....	19
Efeito do L-NAME administrado cronicamente .....	21
Agonista $\beta$ adrenérgico não seletivo: isoproterenol .....	21
Agonista seletivo $\beta_1$ adrenérgico: Noradrenalina .....	25
Agonista $\beta_3$ adrenérgico: BRL 37344 .....	28
Agonista muscarínico: Carbacol .....	30
Agonista parcial muscarínico: Pilocarpina .....	33
Átrio esquerdo isolado	
Agonista $\beta$ adrenérgico: Isoproterenol .....	36
Agonista $\alpha$ adrenérgico: Fenilefrina .....	40
Avaliação do tecido conjuntivo em átriosl .....	42
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>ABSTRACT</b> .....	61

**Lista de Materiais**

<b>SUBSTÂNCIAS</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
Carbacol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Noradrenalina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Isoproterenol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Pilocarpina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Fenilefrina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
17- $\beta$ estradiol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Nitro-L-arginina metil éster	Sigma Chem. Co. (St. Louis, E.U.A.)
Halotano	Halocarbon (New jersey, E.U.A.)
Fenoxibenzamina	Smith Kline & French Labs. (Philadelphia, E.U.A.)
BRL 37344	Research Biochemical International (Massachussets, E.U.A.)

### Lista de tabelas

Tabela 1. Efeito da administração crônica de L-NAME nos valores de pressão arterial sistólica de ratos.....	18
Tabela 2. Efeito da adição de 100 $\mu$ M de L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao isoproterenol e à noradrenalina em átrios direitos de ratos.....	19
Tabela 3. Frequência basal (batimentos/min) de átrios direitos de ratos controles ou tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias .....	21
Tabela 4. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao isoproterenol em átrios direitos de ratos.....	23
Tabela 5. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica à noradrenalina em átrios direitos de ratos.....	26
Tabela 6. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica na sensibilidade ao BRL 37344 em átrios direitos de ratos.....	28
Tabela 7. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na resposta máxima (Emax) ao BRL 37344 em átrios direitos de ratos .....	30
Tabela 8. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao carbacol em átrios direitos de ratos.....	31
Tabela 9. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica à pilocarpina em átrios direitos de ratos.....	34

Tabela 10. Repostas máximas (batimento/min; $\Delta$ ) ao isoproterenol, noradrenalina, carbacol e pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos tratados cronicamente com L-NAME.....	36
Tabela 11. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta inotrópica ao isoproterenol em átrios esquerdos isolados de ratos.....	38
Tabela 12. Resposta máxima (gF/mg de tecido) à fenilefrina em átrios esquerdos isolados de ratos controles ou tratados cronicamente com L-NAME.....	40
Tabela 13. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na porcentagem de tecido conjuntivo em átrios de ratos.....	42

## Lista de figuras

- Figura 1. Curvas concentração-efeito ao isoproterenol (A) e à noradrenalina (B) na ausência (O) ou na presença de 100  $\mu$ M de L-NAME (●) em átrios direitos isolados. Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. para 6 experimentos.....20
- Figura 2. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade ao isoproterenol em átrios direitos isolados aos 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento (●) comparados com animais controles (O). Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 12 experimentos.....24
- Figura 3. Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico por L-NAME na sensibilidade à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (O).....27
- Figura 4. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao BRL 37344 em átrios direitos isolados 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (O).....29
- Figura 5. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao carbacol em átrios direitos isolados 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (O) .....32
- Figura 6. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade à pilocarpina em átrios direitos isolados 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (O) .....35

Figura 7- Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao isoproterenol em átrios esquerdos isolados aos 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○) .....39

Figura 8. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em átrios esquerdos isolados, estimulados eletricamente, de ratos controles (○) ou tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias (●).....41



## Resumo

A administração crônica do inibidor da síntese de óxido nítrico N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) em ratos induz à hipertensão arterial acompanhada por hipertrofia ventricular esquerda e lesões miocárdicas. O aumento do tônus simpático, a participação do sistema renina-angiotensina e o aumento do tônus vascular têm sido implicados na gênese e/ou manutenção do estado hipertensivo nesse modelo experimental de hipertensão. O objetivo deste estudo foi determinar a potência de agonistas  $\beta$  adrenérgicos e muscarínicos nas respostas cronotrópicas e a potência de agonistas  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos nas respostas inotrópicas de átrios de ratos tratados cronicamente com L-NAME. Estudos histológicos também foram empregados para avaliar possíveis lesões atriais induzidas pelo tratamento com L-NAME.

Nossos resultados mostraram que a potência do isoproterenol, noradrenalina, BRL 37344, carbacol e pilocarpina em átrios direitos de átrios isolados de ratos tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias não foram afetadas quando comparadas com os valores obtidos de animais do grupo controle. Átrios esquerdos isolados de animais tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias também não apresentaram alterações das respostas inotrópicas aos agonistas fenilefrina e isoproterenol. A adição de L-NAME "in vitro" não afetou a frequência basal ou as respostas cronotrópicas ao isoproterenol e noradrenalina em átrios direitos. As análises estereológicas em átrios direitos e esquerdos mostraram um aumento significativo na porcentagem de tecido conjuntivo nos animais tratados

com L-NAME por 15 e 30 dias nos átrios direitos quando comparados com o grupos controle. No entanto, o porcentual de tecido conjuntivo nos átrios esquerdos mostrou-se ser similar ao grupo controle.

Nossos resultados indicam que a inibição da síntese do óxido nítrico não interfere nas respostas cronotrópicas e inotrópicas mediadas pelos receptores adrenérgicos e muscarínicos e que as lesões apresentadas nos átrios direitos após o tratamento crônico com L-NAME não são suficientes para alterar as respostas dessa preparação.

## 1. INTRODUÇÃO

### ÓXIDO NÍTRICO: BIOSÍNTESE E INIBIÇÃO

O endotélio vascular desempenha um papel fundamental no controle e regulação do tônus vascular. Furchgott & Zawadzki (1980) foram os primeiros autores a demonstrar que a vasodilatação induzida pela acetilcolina era dependente da presença do endotélio vascular, e postularam que as células endoteliais liberavam um fator de relaxamento, denominado *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Verificou-se, posteriormente, que outros agonistas como histamina, bradicinina, ATP, trombina, noradrenalina, angiotensina II e serotonina eram também capazes de liberar EDRF do endotélio vascular (Bhardwaj & Moore 1988; Gryglewski et. al., 1988).

Estudos farmacológicos e bioquímicos demonstraram que o EDRF e o óxido nítrico (NO) apresentavam a mesma identidade química (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987) sendo sua ação vascular mediada pelo acúmulo intracelular de GMPc na musculatura lisa vascular (Rapoport et al., 1983).

Atualmente, já está plenamente estabelecido que o NO é sintetizado a partir de um dos átomos de nitrogênio do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina, através de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS) as quais apresentam grande homologia estrutural com a citocromo P-450 redutase (Palmer et al., 1988; Bredt et al., 1991). Existem três isoformas de NOS, divididas em duas categorias básicas: constitutiva (isoforma I e isoforma III) e a induzível (isoforma II). A isoforma I, denominada neuronal, é encontrada no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, glândulas adrenais e neurônios nitrérgicos. A isoforma III é aquela ligada à membrana

endotelial sendo o NO produzido por esta isoforma responsável pela regulação do tônus da musculatura lisa vascular, bem como pela inibição da adesão e agregação plaquetária. As NOS constitutivas encontram-se na forma inativa, e são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação dos íons cálcio. Estes, por sua vez, ativam a molécula de calmodulina levando à ativação dessas enzimas, e isto desencadeia a formação de pequenas quantidades de NO. A isoforma II, induzível, só é ativada a partir de determinados estímulos tais como citocinas e endotoxinas. A NOS induzível é ativada independentemente da formação do complexo cálcio-calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (Schulz & Triggle, 1994; Dominiczack & Bohr, 1995).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com moléculas específicas como, por exemplo, o ferro, na forma reduzida ( $Fe^{2+}$ ), contido em determinadas proteínas, como a guanilato ciclase solúvel. A ligação do NO ao grupamento heme da guanilato ciclase solúvel estimula a atividade catalítica desta enzima, levando à formação de GMP cíclico (GMPc). O acúmulo intracelular deste segundo mensageiro determina diminuição da disponibilidade intracelular de cálcio causando, por exemplo, relaxamento vascular e inibição da atividade plaquetária. Além disso, Bolotina et al. (1994) demonstraram que tanto o NO exógeno, como o EDRF/NO endógeno são capazes de ativar diretamente canais de potássio dependentes de cálcio, por mecanismos independentes de GMPc.

Compostos estruturalmente análogos à L-arginina inibem competitivamente a NOS. Inicialmente, observou-se que a N<sup>o</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO, e que este efeito era dose-dependente e estereoseletivo para a forma levógira (Palmer et al., 1988; Rees et al., 1989). Posteriormente, outros compostos foram sintetizados; este incluem a N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA), N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Moore et al., 1990; Mulsch & Busse, 1990). Mais recentemente, têm sido descritos inibidores seletivos para a iNOS e bNOS, tais como o AMT (Nakane et al., 1995) e TRIM (Handy et al., 1995), respectivamente.

#### ***Alterações hemodinâmicas induzidas por inibidores da síntese de NO***

Diversos investigadores demonstraram a importância do NO na regulação da pressão arterial (Aisaka et al., 1989; Lahera et al., 1991). A administração aguda de L-NAME em diversas espécies animais resulta em hipertensão arterial acompanhada por aumento da resistência vascular sistêmica, bradicardia e redução do débito cardíaco (Gardiner et al., 1990; Richard et al., 1991; Klabunde et al., 1991; Van Gelderen et al., 1993; Bower & Law, 1993; Zappellini et al., 1997). Paralelamente, tais compostos causam vasoconstrição coronariana associada à diminuição da função inotrópica do miocárdio (Humpries et al., 1991; Klabunde et al., 1991; Huckstorf et al., 1994); isto mostra que o NO é fundamental para uma perfusão miocárdica adequada. Embora tenha sido postulado que a queda de débito cardíaco seja devida a uma perfusão coronariana inadequada (Klabunde et al., 1991), os

resultados ainda são controversos (Stamler et al., 1994; Clarkson et al., 1995).

A administração diária de L-NAME em ratos leva à inibição crônica da síntese de NO e elevação persistente da pressão arterial; tal metodologia tem-se constituído em um novo modelo de hipertensão arterial (Ribeiro et al., 1992; Baylis et al., 1992; Baylis & Zatz, 1998). Nesse caso, a hipertensão é acompanhada por alterações funcionais e estruturais do rim (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992) e coração (Moreno-Jr. et al., 1995, 1996).

Contrariamente à inibição aguda (Nafrialdi & Mimram, 1993; Sigmon & Beierwaltes, 1993; Zappellini et al., 1996), a hipertensão induzida pelo bloqueio crônico da síntese de NO é marcadamente reduzida por inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II (Ribeiro et al., 1992; Pollock et al., 1993; Moreno-Jr et al., 1995, 1996). Isto mostra que o sistema renina-angiotensina-aldosterona exerce papel fundamental no desenvolvimento da hipertensão causada pelo tratamento crônico de ratos com L-NAME. Este tipo de hipertensão é também acompanhado por lesões isquêmicas cardíacas as quais não parecem estar relacionadas à hipertrofia ventricular esquerda (Moreno-Jr et al., 1996).

O sistema nervoso autônomo simpático parece também estar envolvido nas alterações cardiovasculares produzidos pelo bloqueio crônico de NO. As concentrações de noradrenalina e adrenalina circulantes estão elevadas após cinco semanas de tratamento crônico com L-NAME, sugerindo que as mesmas estão envolvidas na manutenção dos níveis elevados da pressão arterial (Navarro et al., 1994). No entanto, K-Laflamme et al. (1998) mostraram que o tratamento crônico com L-NAME determina um aumento da

atividade da medula adrenal sem alterar os níveis plasmáticos de noradrenalina.

A participação do componente autonômico neural na manutenção da hipertensão tem sido demonstrada pela atenuação da resposta hipertensiva induzida pelo L-NAME após simpatectomia e bloqueio ganglionar (Cunha et al., 1993; Sander et al., 1995). Além disso, o NO parece ter um importante papel na regulação central do tônus simpático (Sakuma et al., 1992) onde sugere-se que a inibição da atividade da NOS no tecido cerebral de ratos tratados com L-NAME possa contribuir para a patogenia da hipertensão (Zanchi et al., 1995).

Os mecanismos pelos quais o estado hipertensivo é atingido e mantido no modelo de hipertensão induzido pela inibição da síntese de NO não são ainda completamente compreendidos. O aumento do tônus vascular, a ativação dos sistema renina-angiotensina e sistema simpático têm sido usados para explicar as diferentes alterações fisiopatológicas presentes neste modelo.

### **CATECOLAMINAS E ADRENOCEPTORES**

As catecolaminas, representadas pela adrenalina (produzida na medula supra-renal), noradrenalina (liberada pelas terminações nervosas simpáticas) e dopamina (presente em concentrações baixas no plasma) iniciam suas ações no organismo ao interagirem com receptores de membrana, denominados adrenoceptores. A ligação das catecolaminas com os adrenoceptores é rápida, reversível, saturável e estereoseletiva. A ocupação dos adrenoceptores leva à formação de segundos mensageiros

intracelulares que desencadeiam a resposta fisiológica. Em relação à pressão arterial, por exemplo, as catecolaminas exercem efeito modulatório através de cinco mecanismos distintos: *i.* ações no sistema nervoso central; *ii.* controle direto no tônus vascular; *iii.* atuação direta no nódulo sino-atrial; *iv.* modulação do fluxo de sódio no túbulo proximal renal; *v.* alteração da liberação de renina e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Berne & Levy, 1990).

Os adrenoceptores foram inicialmente divididos em duas grandes categorias,  $\alpha$  e  $\beta$  (Ahlquist, 1948; Lands et al., 1967). Posteriormente, tais receptores foram classificados em subtipos com base em suas propriedades farmacológicas de serem estimulados ou bloqueados por drogas seletivas, e também pelo sequenciamento dos aminoácidos que participam de sua estrutura proteica. No tecido cardíaco, a população de receptores é composta por adrenoceptores do tipo  $\alpha$  (Minneman, 1988; Lefkowitz & Caron, 1988; Docherty, 1998) e  $\beta$  (Emorine et al, 1989; 1994; Kaumann, 1997; Cohen et al., 1999).

Os adrenoceptores pertencem a uma super família de receptores de membrana acoplados às proteínas G e estritamente relacionados. Os adrenoceptores  $\alpha$  podem ser divididos em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Os receptores  $\alpha_1$  possuem 3 subtipos,  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ , sendo que todos induzem resposta contrátil envolvendo ativação de proteínas Gq/11 e formação de inositol trifosfato ( $IP_3$ ). Os adrenoceptores  $\alpha_2$  podem ser subdivididos em  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ . Os subtipos  $\alpha_2$  parecem mediar a resposta fisiológica através da inibição da adenilato ciclase (Docherty, 1998).



Os adrenoreceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  medeiam a resposta através da estimulação da adenilato ciclase (Emorine et al., 1989, 1994; Cohen et al., 1999). A estimulação destes receptores ativa uma proteína G, denominada Gs. As proteínas G são heterotrímeros que consistem de uma subunidade hidrofílica  $\alpha$  e duas subunidades hidrofóbicas,  $\beta$  e  $\gamma$ . Na ausência de agonista, quando a proteína G está na forma inativa, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) encontra-se ligada à subunidade  $\alpha$  e formam um complexo associado às subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G, e induz a troca de GDP por GTP na subunidade  $\alpha$ . Após ligar-se ao GTP, a subunidade  $\alpha$  dissocia-se das subunidades  $\beta\gamma$  e torna-se ativada. A subunidade  $\alpha$  permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e novamente a formação de GDP, levando à sua reassociação com as subunidades  $\beta\gamma$  (Birnbaumer, 1990, 1992). A subunidade  $\alpha$  da proteína Gs, quando ativada, leva à estimulação da adenilato ciclase (Rodbell, 1980.). Experimentos feitos em coração isolado sugerem que Gs pode ter uma segunda função através da ativação direta de canais de cálcio do tipo L (Yatani et al., 1987).

As catecolaminas podem aumentar a frequência cardíaca através dos adrenoreceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Minneman & Molinoff, 1980, Bryan et al., 1981; Emorine et al., 1989; Cohen et al., 1999), enquanto que os adrenoreceptores  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  exercem inotropismo positivo (Williams & Lefkowitz, 1978; Chess-Williams et al., 1994; Brown, 1992; Surman et al., 1992).

### **ACETILCOLINA E SEUS RECEPTORES**

Os receptores colinérgicos são classificados em dois tipos principais: nicotínicos (resposta à nicotina) e muscarínicos (resposta excitatória à

muscarina). Os receptores nicotínicos são divididos em dois subtipos: Nn (neuronal) e Nm (muscular e ganglionar). Tais receptores ocorrem tanto periféricamente (junção neuromuscular e na sinapse ganglionar), quanto ao nível central. A estrutura molecular dos dois subtipos de receptores parece ser similar, diferindo apenas em suas propriedades farmacológicas. Em geral, os agonistas mostram pequena seletividade entre os receptores ganglionares e neuromusculares. Os colinoceptores nicotínicos são constituídos por quatro (ou cinco) subunidades acopladas à membrana formando um canal iônico central que, presume-se, seja o sítio de ligação da acetilcolina, situado no domínio extracelular (Eglen et al., 1996).

Os receptores muscarínicos são atualmente classificados em cinco subtipos distintos denominados M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> (Bonner et al., 1987; Goyal, 1988; Dorje et al., 1991; Caulfield, 1993). Todos os subtipos de receptores muscarínicos interagem com membros do grupo nucleotídeo guanina ligados às proteínas G que regulam a atividade das proteínas efetoras nas células. As regiões nas quais os receptores e as proteínas G estão acoplados têm sido definidas primariamente por mutagênese e estudos de quimera dos subtipos dos receptores. Em particular, uma região da porção terminal carboxil da terceira alça intracelular do receptor tem sido reconhecida como importante para o acoplamento às proteínas G mostrando grande homologia entre os receptores M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub>, e entre os receptores M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> (Caulfield, 1993; Wess, 1993). A estimulação dos receptores M<sub>1</sub> ou M<sub>3</sub> causa hidrólise de polifosfoinosítídeos e mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular, como consequência da interação com a proteína G (Gq) que ativa a fosfolipase C. Por outro lado, os receptores M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> inibem a adenilato

ciclase e regulam a abertura dos canais iônicos (por exemplo, aumento da condutância ao  $K^+$  no tecido atrial cardíaco) (Eglen et al., 1996).

Os receptores muscarínicos medeiam uma série de processos fisiológicos tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (Freedman et al., 1988). No coração de mamíferos, a população predominante de receptores muscarínicos é do subtipo  $M_2$  (Hammer & Giachetti, 1982). Estes receptores acoplam às proteínas  $G_i$  ou  $G_o$ , levando à inibição da atividade da adenilato ciclase que está associada aos efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos (Peterson et al., 1988; Maeda et al., 1988, Eglen et al., 1996).

A acetilcolina possui quatro efeitos primários no sistema cardiovascular, a) vasodilatação, b) diminuição da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo), c) diminuição na frequência de condução em tecidos especializados dos nodos sinoatrial (SA) e atrioventricular (AV) (efeito dromotrópico negativo), e d) diminuição da força de contração (efeito inotrópico negativo). O último efeito é de menor significância tanto no músculo ventricular quanto no músculo atrial (Brown & Taylor, 1996).

Os receptores muscarínicos  $M_3$ , responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa, estão localizados nas células endoteliais do tecido vascular. Quando estes receptores são estimulados, as células endoteliais liberam o NO que se difunde para as células adjacentes do músculo liso causando relaxamento. A vasodilatação também pode advir secundariamente da inibição da liberação de noradrenalina pela acetilcolina através de receptores pré-sinápticos localizados nos terminais nervosos adrenérgicos (Furchgott, 1984).

As fibras parassimpáticas colinérgicas são distribuídas extensamente nos nodos sinoatrial e atrioventricular e no músculo atrial. O impulso vagal tem ação crucial na maioria dos tipos de células cardíacas especializadas. A inervação colinérgica do miocárdio ventricular é esparsa, enquanto que nos tecidos especializados em condução, como as fibras de Purkinje, essas fibras são predominantes (Kent et al., 1974; Levy & Schwartz, 1994). No nodo sinoatrial, cada impulso cardíaco normal é iniciado por uma despolarização espontânea das células do marca-passo. O potencial de ação é conduzido sobre o curso das fibras do músculo atrial do nodo atrioventricular e daí para o sistema de Purkinje no músculo ventricular. A acetilcolina diminui a frequência cardíaca por diminuir a frequência da despolarização diastólica espontânea (a corrente do marca-passo) e pelo aumento da corrente de repolarização no nodo sinoatrial; esta ação retarda o limiar do potencial e os sucessivos efeitos do ciclo cardíaco (Di Francesco, 1993).

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivos gerais***

Este trabalho foi realizado para avaliar possíveis alterações nas respostas cronotrópicas e inotrópicas de átrios de ratos tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias. Buscou-se também avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pelo tratamento crônico com L-NAME nas fibras cardíacas atriais.

### ***Objetivos específicos***

- 1- Avaliar a potência de agonistas  $\beta$  adrenérgicos não seletivo (isoproterenol) e seletivo  $\beta_1$  (noradrenalina) e agonistas muscarínicos (carbacol e pilocarpina) na resposta cronotrópica de átrios direitos de ratos tratados com L-NAME.
- 2- Avaliar a sensibilidade da resposta cronotrópica mediada pelos adrenocetores  $\beta_3$  em átrios direitos de ratos tratados com L-NAME.
- 3- Avaliar a potência de agonistas  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos (fenilefrina e isoproterenol, respectivamente) na resposta inotrópica de átrios esquerdos isolados de ratos tratados com L-NAME.
- 4- Avaliar possíveis alterações morfológicas dos átrios direitos e esquerdos pelo tratamento crônico com L-NAME.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### **ANIMAIS**

Ratos Wistar, pesando entre 300 a 400 g, obtidos do biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu (SP), foram usados em todos os experimentos. Os ratos foram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, em gaiolas coletivas, sob condições controladas de luminosidade (12/12 horas) e temperatura (22° C). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

### **TRATAMENTO EXPERIMENTAL**

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: animais controles (sem qualquer manipulação) e animais tratados com N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), na dose de 20 mg/rato/dia, durante 7, 15, 30 e 60 dias. O L-NAME foi dissolvido em água de torneira na concentração de 0.4 mg/ml, e acrescentado à água ingerida pelos animais.

### **MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL**

Os ratos foram colocados em uma gaiola plástica pré-aquecida a uma temperatura média de 37-39°C onde permaneceram por aproximadamente 20 minutos. Esse pré-aquecimento é necessário para que haja dilatação das arteriais caudais facilitando, assim, a captação das pulsações. Passado este tempo, cada animal foi colocado num contensor (Modelo 1262, NARCO Bio Systems, Inc. Houston, Texas, USA). Um manguito adaptado foi colocado na

cauda do animal, previamente untada com graxa (para evitar interferências na captação do som). A cauda foi então introduzida em um tudo de borracha acoplado a um microfone, capaz de captar sinais com amplitude máxima de 0.5 mV. O registro produzido por este microfone era visualizado em um osciloscópio (Modelo CS 4025, Kenwood Corporation, Japão). O manguito era insuflado até 20-30 mmHg acima do valor de registro, onde as pulsações não eram mais visualizadas no osciloscópio. Em seguida, o manguito era desinsuflado, e quando as pulsações recomeçavam continuamente, a primeira pulsação era considerada como o valor da pressão. Assim, esse valor de pressão era determinado tanto visualmente (leitura direta das pulsações no osciloscópio) quanto lidas em um manômetro externo. Para minimizar os efeitos do estresse sofrido pelos animais, as leituras foram consideradas válidas quando três determinações consecutivas com variações não maiores que 2 mmHg eram registradas (Zatz, 1990).

### ***ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO***

O estudo das alterações histopatológicas dos átrios, acarretadas pelo uso do L-NAME, foram feitos após 15 e 30 dias de tratamento com L-NAME. Após a obtenção dos pesos cardíacos, os corações foram colocados em solução de formol 10%. Os átrios foram cortados em cinco níveis equidistantes (anéis) ao longo de seu maior eixo. Os anéis foram embebidos em parafina, em cortes de 5  $\mu$ m, e corados com tricromo de Masson. A seguir, o grau de fibrose dos átrios foi avaliado quantitativamente pelo método de volumetria de pontos. A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), e o volume relativo ocupado por tecido

conjuntivo nos átrios foi medido com uma ocular especial contendo um retículo de integração de 25 pontos (5 linhas paralelas com 5 pontos cada).

Em uma lâmina, os elementos do coração de cada um dos animais foram contados. O número de vezes em que os pontos caíram sobre tecido conjuntivo em 25 campos microscópicos foram avaliados. A fim de se obter a fração de volume ocupada, por tecido conjuntivo ( $P_{pi}$ ), o seguinte cálculo foi usado:

$$P_{pi} = p/P$$

Onde,  $p$  é a soma do número de pontos que caem sobre áreas preenchidas com tecido conjuntivo,  $P$  é o número total de pontos que caem no campo total da lâmina (Aherne, 1970).

### **ÁTRIOS ISOLADOS**

Os animais foram anestesiados com halotana e sacrificados por secção dos vasos cervicais. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em Krebs-Ringer previamente oxigenado. Os átrios foram isolados e montados em câmaras de incubação de tecido (20 ml volume) contendo Krebs-Ringer, pH 7.4, 36.5°C e aerado com 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. A composição da solução de Krebs-Ringer foi (mM): NaCl, 124; KCl, 4,75; MgSO<sub>4</sub>, 1,30; CaCl<sub>2</sub>, 2,25; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6; glicose, 10,0; ascorbato, 0,3; e EDTA, 0,03. Ascorbato e EDTA foram adicionados para evitar a oxidação das catecolaminas. Nos estudos realizados com a noradrenalina, 10 μM de imipramina e 5 μM de 17-β-estradiol foram adicionados ao tampão de Krebs-Ringer para bloquear os sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal das catecolaminas (Salt, 1972; Hughes & Smith, 1978). O efeito dos



agonistas nos batimentos espontâneos dos átrios direitos foi medido pelo aumento dos batimentos por minuto.

Os átrios esquerdos foram estimulados eletricamente, com uma frequência de 1 Hz, 1mV e impulsos com duração de 5 ms. As curvas de força-tensão nos átrios esquerdos foram construídas a partir da tensão de repouso associada com a força máxima desenvolvida na presença dos agonistas usados.

### ***Obtenção e análise das curvas concentração-efeito***

Curvas concentração-efeito para os diferentes agonistas foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (Van Rossum, 1963). Todos os dados das curvas concentração-efeito em átrios isolados foram avaliados segundo a equação:

$$E = E_{max}/((1+(10^c/10^x)^n) + \Phi)$$

onde  $E$  representa o aumento da frequência de batimentos atriais ou a constricção arteriolar em resposta ao agonista (efeito);  $E_{max}$  representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; e  $c$  representa o logaritmo da  $EC_{50}$  (definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima);  $x$  representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial,  $n$ , representa o coeficiente angular ou inclinação que define o tipo de curva concentração-efeito obtida, e  $\Phi$  é a resposta observada na ausência do agonista.

Análise de regressão não linear para determinar os parâmetros:  $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$  e  $n$  foi empregada usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) com o valor basal dos batimentos atriais valendo zero,  $\Phi = \text{zero}$ .

### **PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

**Átrios direitos isolados.** Após 7, 15, 30 e 60 dias de tratamento crônico com o L-NAME, foram realizadas curvas concentração-efeito aos agonistas isoproterenol, noradrenalina, carbacol e pilocarpina, sendo que as curvas concentração-efeito ao BRL 37344 foram obtidas após 30 e 60 dias de tratamento com L-NAME.

**Átrios direitos isolados: uso in vitro de L-NAME.** Curvas concentração-efeito foram realizadas para o isoproterenol e noradrenalina na ausência ou presença de 100  $\mu\text{M}$  de L-NAME. Inicialmente, realizou-se as curvas concentração-efeito na ausência de L-NAME; em seguida, adicionou-se o composto à cuba, e o mesmo permaneceu no banho por 1 h antes da realização da segunda curva, que foi mantido no banho durante a construção das curvas concentração-efeito.

**Átrios esquerdos isolados.** Curvas concentração-efeito à fenilefrina e ao isoproterenol foram construídas em átrios de animais tratados cronicamente com o L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias para avaliarmos o efeito dos agonistas  $\alpha$  e  $\beta$  nas respostas inotrópicas. As curvas concentração-efeito

obtidas com fenilefrina foram feitas em presença de propranolol ( $1 \mu\text{M}$ ), adicionado 30 min antes do início da obtenção das curvas.

### ***ANÁLISE ESTATÍSTICA***

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (S.E.M.). O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises estatísticas usando o teste *t* de Student pareado e não pareado, e análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste (Bonferroni). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3. RESULTADOS

#### **PRESSÃO ARTERIAL**

O tratamento crônico dos animais com o L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias produziu um aumento significativo ( $P < 0.05$ ) e tempo-dependente na pressão arterial dos mesmos, quando comparados com seus respectivos grupos controles (Tabela 1).

**TABELA 1**

**Efeito da administração crônica de L-NAME nos valores de pressão arterial sistólica de ratos.**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Grupos</b>	<b>P.A.S (mmHg)</b>	<b>N</b>
<b>7</b>	Controle	119 ± 1.0	24
	L-NAME	132 ± 1.0*	27
<b>15</b>	Controle	121 ± 1.0	30
	L-NAME	144 ± 2.0**	36
<b>30</b>	Controle	120 ± 3.0	35
	L-NAME	146 ± 3.0**	31
<b>60</b>	Controle	121 ± 1.0	30
	L-NAME	159 ± 1.0**	24

Os dados estão apresentados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

\* $P < 0,05$ , em relação aos respectivos grupos controle (teste *t* de Student pareado). \*\* $P < 0,05$ , estatisticamente diferente entre os grupos L-NAME (ANOVA seguida de pós-teste, Bonferroni). P.A.S, pressão arterial sistólica.

## ÁTRIO DIREITO ISOLADO

### Estudos realizados com adição de L-NAME *"in vitro"*

A adição de 100  $\mu$ M de L-NAME no banho de incubação não provocou qualquer mudança na sensibilidade aos agonistas isoproterenol ou noradrenalina (Tabela 2 e Figuras 1A e 1B). Os valores dos batimentos espontâneos dos átrios também não foram alterados pela adição do L-NAME ( $255 \pm 4,3$  e  $263 \pm 2,1$ ; na ausência e na presença de L-NAME, respectivamente).

**TABELA 2**

**Efeito da adição de 100 $\mu$ M de L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao isoproterenol e à noradrenalina em átrios direitos de ratos.**

DROGA	GRUPO	pEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
ISOPROTERENOL	Controle	8,79 $\pm$ 0,04		6
	L-NAME	8,66 $\pm$ 0,07	1,34	6
NORADRENALINA	Controle	7,84 $\pm$ 0,03		6
	L-NAME	7,92 $\pm$ 0,07	1,2	6

Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. para N experimentos.

<sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.

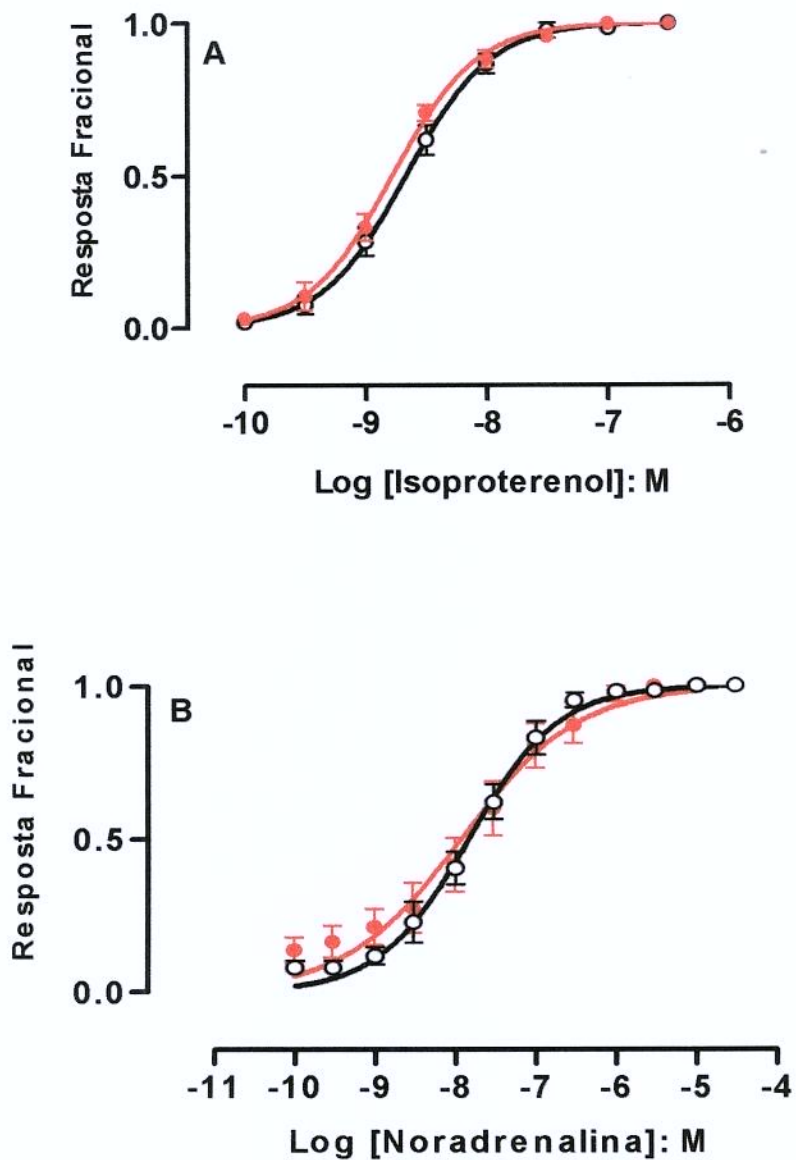


Figura 1. Curvas concentração-efeito ao isoproterenol (A) e à noradrenalina (B) na ausência (O) ou na presença de 100  $\mu$ M de L-NAME (●) em átrios direitos isolados. Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. para 6 experimentos.

### **EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM L-NAME**

O tratamento dos animais com L-NAME não modificou significativamente a frequência cardíaca basal dos animais (Tabela 3).

**TABELA 3**

**Frequência basal (bat/min) de átrios direitos de ratos controles ou tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias.**

<b>Grupos</b>	<b>7 dias</b>	<b>15 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Controle</b>	269 ± 5,3	269 ± 6,2	306 ± 8,9	268 ± 9,0
<b>L-NAME</b>	259 ± 9,0	249 ± 8,9	294 ± 8,6	262 ± 3,6

Os dados são média ± E.P.M. para 8 a 16 experimentos.

### **Agonista $\beta$ adrenérgico não seletivo: ISOPROTERENOL (ISO)**

Os efeitos do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao ISO em átrios direitos isolados foram avaliados aos 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento. A análise das curvas concentração-efeito nos períodos de 15, 30 e 60 dias após tratamento crônico com L-NAME mostra um desvio à direita, de cerca de duas vezes, que não diferiu estatisticamente entre os grupos, quando ANOVA foi empregada. Entretanto,

quando empregamos o teste *t* de Student não-pareado e comparamos cada grupo L-NAME com seu respectivo grupo controle, notamos que houve desvio significativo nos períodos de 15, 30 e 60 dias após o tratamento (Figura 2 e Tabela 4).

Não houve diferenças significantes nas respostas máximas ao ISO em todos os grupos estudados (Tabela 10).



TABELA 4

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na  
sensibilidade da resposta cronotrópica ao isoproterenol  
em átrios direitos de ratos**

GRUPO	pEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
Controle 7 dias	8,74 ± 0,05		6
L-NAME 7 dias	8,92 ± 0,06	1,5	7
Controle 15 dias	8,99 ± 0,08		6
L-NAME 15 dias	8,65 ± 0,07	2,2	6
Controle 30 dias	8,81 ± 0,09		8
L-NAME 30 dias	8,49 ± 0,08	2,1	11
Controle 60 dias	9,02 ± 0,16		5
L-NAME 60 dias	8,66 ± 0,06	2,3	12

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.

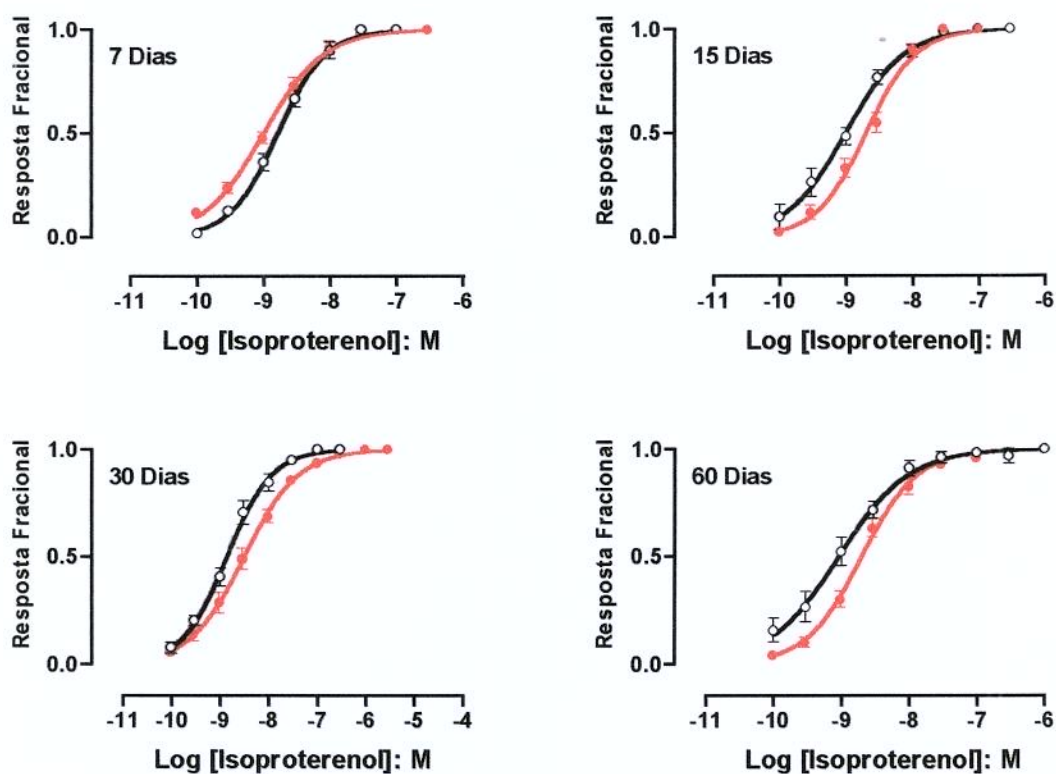


Figura 2. Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade ao isoproterenol em átrios direitos isolados aos 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 12 experimentos.

***Agonista seletivo  $\beta_1$  adrenérgico: NORADRENALINA***

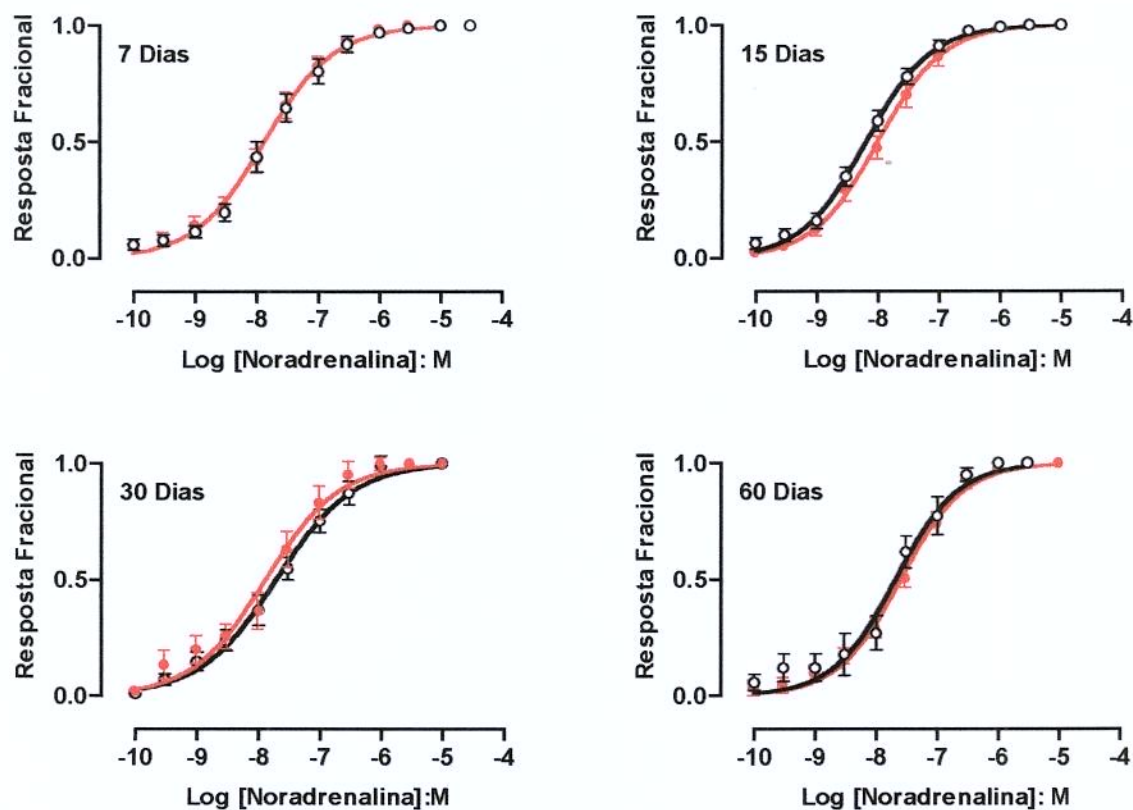
O efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica à noradrenalina em átrios direitos isolados foi avaliado aos 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento. Foram obtidas curvas concentração-efeito para a noradrenalina em presença de inibidores da recaptação neuronal e extraneuronal. À semelhança dos resultados obtidos com o ISO, o tratamento crônico com o L-NAME não modificou a potência da noradrenalina nos diferentes períodos estudados. Os valores de  $pEC_{50}$  do agonista estão sumarizados na tabela 5, e as curvas concentração-efeito estão ilustradas na figura 3.

A resposta máxima à noradrenalina foi alterada pelo tratamento experimental (Tabela 10).

**TABELA 5**  
**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na**  
**sensibilidade da resposta cronotrópica à noradrenalina**  
**em átrios direitos de ratos**

GRUPO	PEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
Controle 7 dias	7,72 ± 0,14		10
L-NAME 7 dias	7,82 ± 0,13	1,3	11
Controle 15 dias	8,12 ± 0,11		8
L-NAME 15 dias	7,92 ± 0,13	1,6	8
Controle 30 dias	7,50 ± 0,15		6
L-NAME 30 dias	7,63 ± 0,25	1,3	4
Controle 60 dias	7,54 ± 0,13		4
L-NAME 60 dias	7,36 ± 0,13	1,5	6

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.



**Figura 3.** Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico por L-NAME na sensibilidade à noradrenalina em átrios direitos isolados 7 , 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados são médias  $\pm$  E.P.M. para 4 a 11 experimentos.

**Agonista  $\beta_3$  adrenérgico: BRL 37344**

O efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao BRL 37344, agonista  $\beta_3$ , em átrios direitos isolados, foi avaliado somente aos 30 e 60 dias após tratamento. À semelhança dos resultados obtidos com o ISO e noradrenalina, o tratamento com L-NAME não afetou a potência do BRL 37344 nos períodos de 30 e 60 dias. Os valores de  $pEC_{50}$  do agonista estão sumarizados na tabela 6 e as curvas concentração-efeito estão ilustradas na figura 4.

A resposta máxima ao BRL 37344 foi diminuída em cerca de 59% após 30 dias de tratamento com o L-NAME, comparada com o grupo controle (Tabela 7).

**TABELA 6**

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica ao BRL 37344 em átrios direitos de ratos.**

<b>GRUPO</b>	<b><math>pEC_{50}</math></b>	<b>DESVIO<sup>a</sup></b>	<b>N</b>
Controle	5,27 $\pm$ 0,10		10
L-NAME 30 dias	4,93 $\pm$ 0,32	2,2	6
L-NAME 60 dias	5,28 $\pm$ 0,09	1,0	10

Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da  $pEC_{50}$  do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.

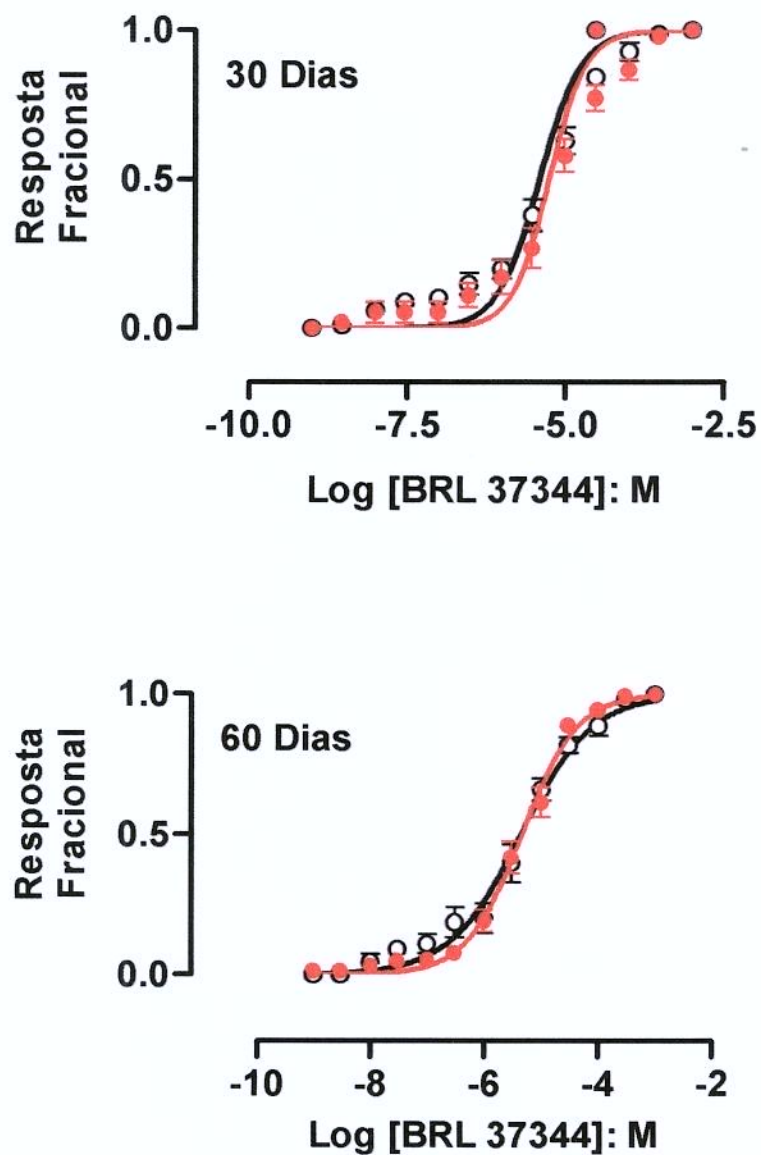


Figura 4. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao BRL 37344 em átrios direitos isolados 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados são médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 experimentos.

TABELA 7

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na resposta máxima ( $E_{max}$ ) ao BRL 37344 em átrios direitos de ratos**

GRUPO	$E_{max}$ (bat/min)	N
Controle	120 ± 5	8
L-NAME 30 dias	72 ± 9*	6
L-NAME 60 dias	153 ± 14	10

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. \*,  $P < 0,05$ , estatisticamente diferente entre os grupos (ANOVA seguida de pós teste Bonferroni).

#### ***Agonista muscarínico: CARBACOL***

Os efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica negativa ao carbacol em átrios direitos isolados foram avaliados aos 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. A inibição da síntese de NO não produziu alteração nas curvas concentração-efeito ao carbacol. Os valores de  $pEC_{50}$  do agonista nos diferentes períodos estudados estão sumarizados na tabela 8. As curvas concentração-efeito estão ilustradas na figura 5.

A resposta máxima ao carbacol e a frequência basal dos batimentos cardíacos não foram alterados pelo tratamento experimental (Tabela 10).



**TABELA 8**  
**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na**  
**sensibilidade da resposta cronotrópica ao carbacol em**  
**átrios direitos de ratos**

GRUPO	PEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
Controle 7 dias	6,74 ± 0,10		6
L-NAME 7 dias	6,90 ± 0,11	1,4	7
Controle 15 dias	6,51 ± 0,09		12
L-NAME 15 dias	6,55 ± 0,08	1,1	15
Controle 30 dias	6,89 ± 0,04		8
L-NAME 30 dias	7,09 ± 0,06	1,6	7
Controle 60 dias	6,34 ± 0,24		7
L-NAME 60 dias	6,50 ± 0,08	1,5	6

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.

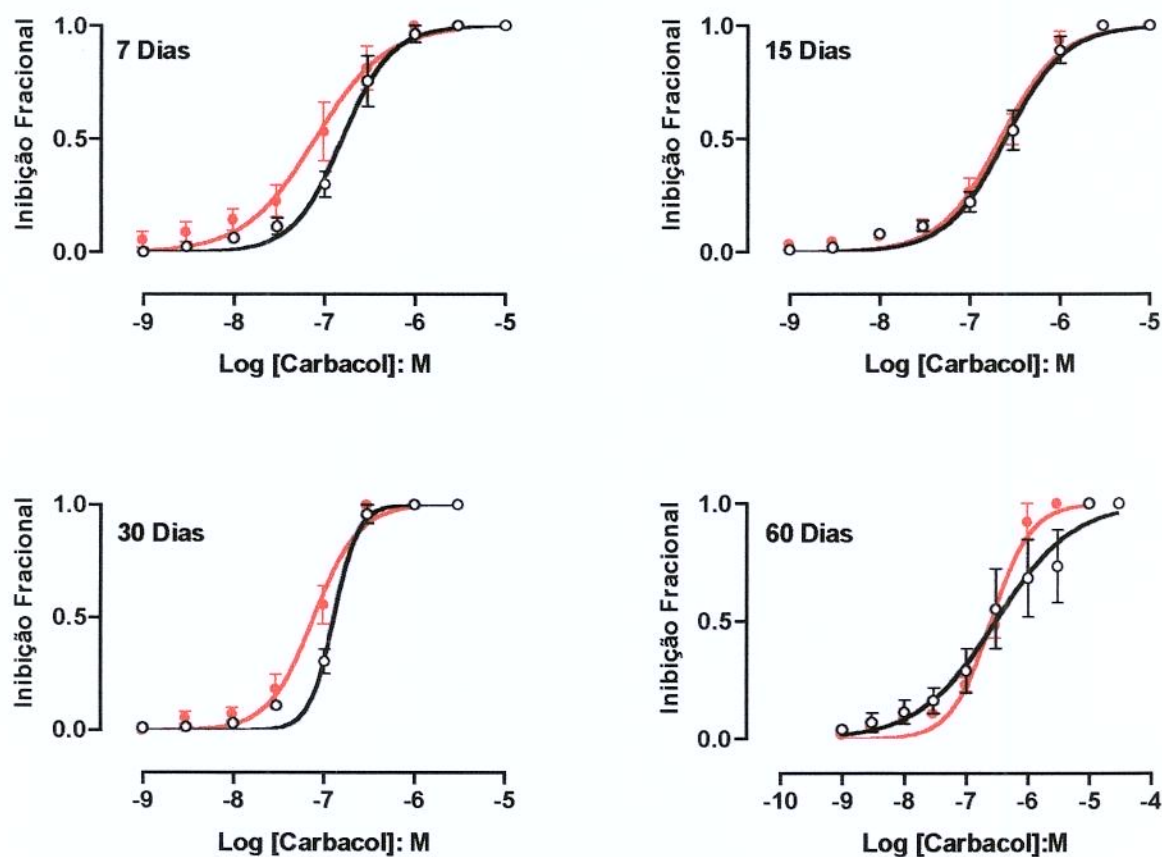


Figura 5. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao carbacol em átrios direitos isolados aos 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. para 6 a 15 experimentos.

***Agonista parcial muscarínico: Pilocarpina***

Os efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta cronotrópica negativa à pilocarpina em átrios direitos isolados foram avaliados aos 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. A inibição da síntese de NO não produziu diferenças entre os valores de  $pEC_{50}$  nos átrios direitos, quando comparados com os animais controles (Tabela 9, Figura 6).

A resposta máxima ao agonista parcial pilocarpina não foi alterada pelo tratamento experimental (Tabela 10).

TABELA 9

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na  
sensibilidade da resposta cronotrópica à pilocarpina em  
átrios direitos de ratos**

GRUPO	PEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
Controle 7 dias	4,20 ± 0,13		6
L-NAME 7 dias	4,64 ± 0,25	2,8	6
Controle 15 dias	4,28 ± 0,10		7
L-NAME 15 dias	4,41 ± 0,23	1,4	5
Controle 30 dias	4,88 ± 0,30		7
L-NAME 30 dias	4,84 ± 0,14	1,1	7
Controle 60 dias	4,71 ± 0,23		8
L-NAME 60 dias	4,41 ± 0,12	2,0	6

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.

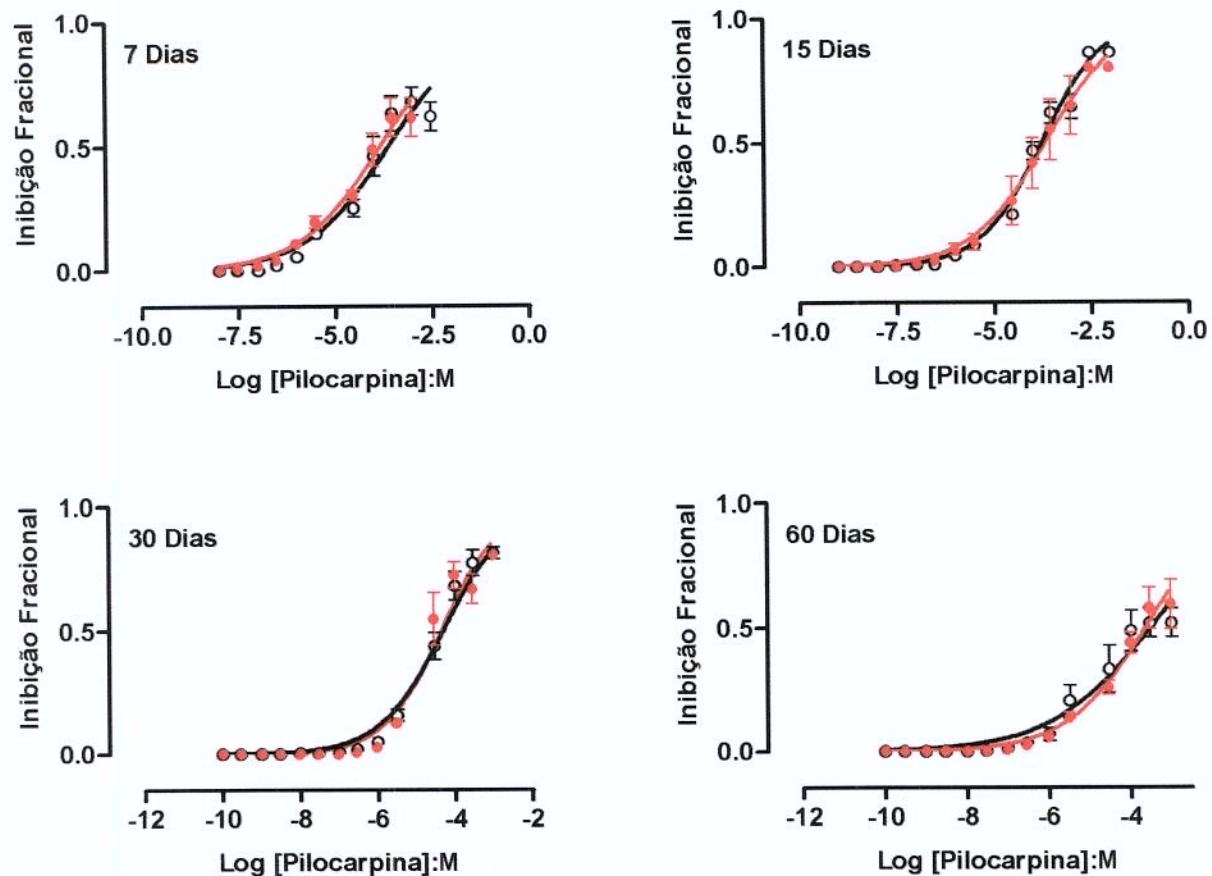


Figura 6. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade à pilocarpina em átrios direitos isolados 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados são médias  $\pm$  E.P.M. de 5 a 8 experimentos.

Tabela 10

Respostas máximas (batimento/min;  $\Delta$ ) ao isoproterenol, noradrenalina, carbacol e pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos tratados cronicamente com L-NAME.

Grupos	ISO	NA	Carbacol	Pilocarpina
Contr 7 dias	157 $\pm$ 10	136 $\pm$ 9	166 $\pm$ 30	155 $\pm$ 12
L-NAME 7 dias	134 $\pm$ 9	140 $\pm$ 8	160 $\pm$ 12	153 $\pm$ 9
Contr 15 dias	129 $\pm$ 7	137 $\pm$ 15	190 $\pm$ 19	137 $\pm$ 8
L-NAME 15 dias	128 $\pm$ 12	127 $\pm$ 12	172 $\pm$ 15	138 $\pm$ 13
Contr 30 dias	124 $\pm$ 16	122 $\pm$ 11	225 $\pm$ 13	160 $\pm$ 13
L-NAME 30 dias	164 $\pm$ 11	127 $\pm$ 14	208 $\pm$ 17	153 $\pm$ 12
Contr 60 dias	134 $\pm$ 10	100 $\pm$ 11	175 $\pm$ 29	153 $\pm$ 10
L-NAME 60 dias	153 $\pm$ 8	108 $\pm$ 15	180 $\pm$ 17	127 $\pm$ 8

ISO, isoproterenol; NA, noradrenalina; Contr., controle. Dados representam médias  $\pm$  E.P.M. de 4 a 12 experimentos.

### ÁTRIO ESQUERDO ISOLADO

#### *Agonista $\beta$ adrenérgico: ISOPROTERENOL.*

Os efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta inotrópica ao isoproterenol em átrios esquerdos isolados foram avaliados 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. Os valores de pEC<sub>50</sub> ao isoproterenol nos diferentes períodos estudados estão sumarizados na tabela 11, e as curvas concentração-efeito estão ilustradas na figura 7. Não

observamos diferença estatisticamente significativa entre os valores de pEC<sub>50</sub> ao agonista  $\beta$  adrenérgico nos átrios esquerdos de ratos tratados com L-NAME em todos os períodos de tratamento.

TABELA 11

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na  
sensibilidade da resposta inotrópica ao isoproterenol  
em átrios esquerdos isolados de ratos**

GRUPO	pEC <sub>50</sub>	DESVIO <sup>a</sup>	N
Controle 7 dias	8,56 ± 0,2		6
L-NAME 7 dias	8,63 ± 0,3	1,2	7
Controle 15 dias	8,10 ± 0,10		4
L-NAME 15 dias	8,17 ± 0,11	1,2	4
Controle 30 dias	8,88 ± 0,15		7
L-NAME 30 dias	8,98 ± 0,16	1,3	7
Controle 60 dias	8,58 ± 0,21		12
L-NAME 60 dias	8,55 ± 0,11	1,1	6

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos. <sup>a</sup>Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC<sub>50</sub> do grupo tratado com L-NAME e seu respectivo grupo controle.



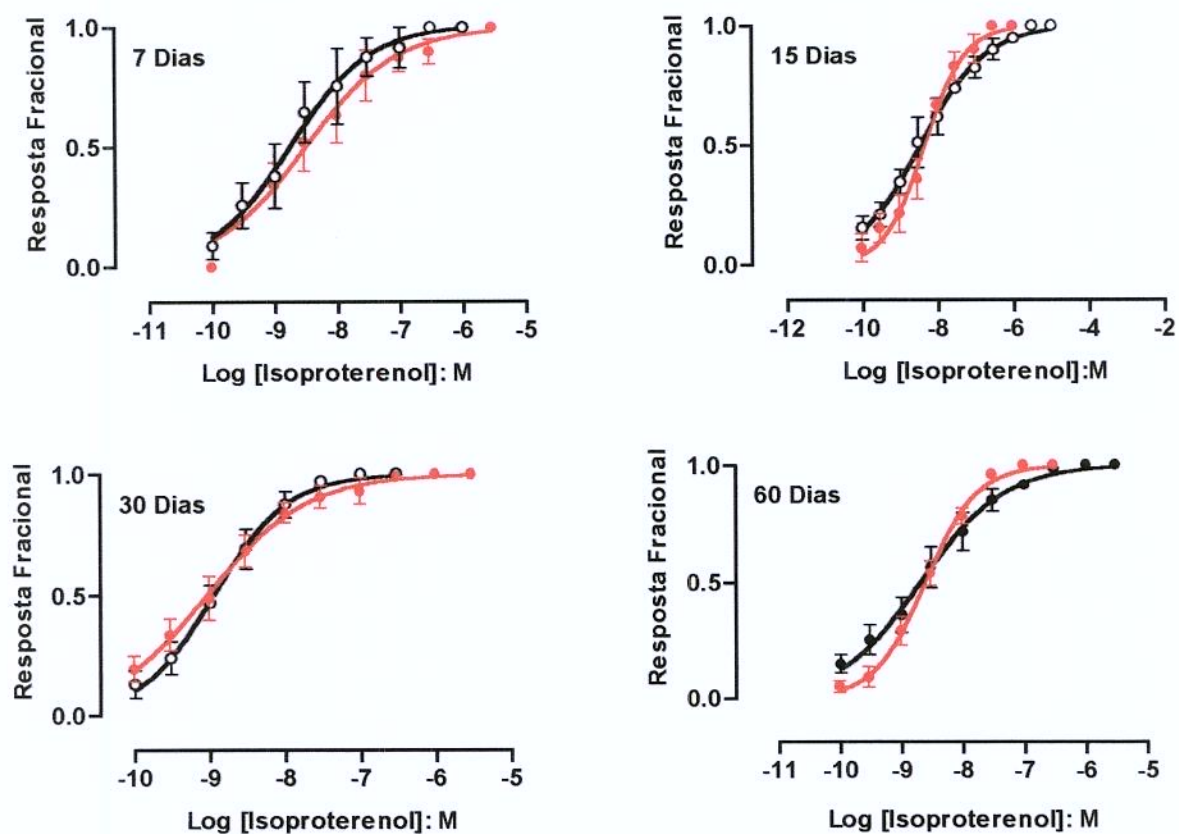


Figura 7. Efeito da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade ao isoproterenol em átrios esquerdos isolados aos 7, 15, 30 e 60 dias após tratamento (●) comparados com animais controles (○). Os dados estão representados como médias  $\pm$  E.P.M. de 4 a 12 experimentos.

**Agonista  $\alpha$  adrenérgico: FENILEFRINA**

Os efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME na sensibilidade da resposta à fenilefrina em átrios esquerdos isolados foram avaliados 7, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. As respostas inotrópicas ao agonista de adrenoceptores  $\alpha_1$ , fenilefrina, em átrios esquerdos isolados apresentaram grande variabilidade em todas as concentrações usadas para a construção das curvas concentração-efeito, tanto nos animais controles quanto nos animais tratados. Assim, as curvas não seguiram o modelo matemático de curvas sigmoidais inviabilizando, assim, os cálculos da  $EC_{50}$ . A resposta máxima à fenilefrina após tratamento com L-NAME não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais (Tabela 12, Figura 8).

**TABELA 12**

**Resposta máxima (gF/mg de tecido) à fenilefrina em átrios esquerdos isolados de ratos controles ou tratados cronicamente com L-NAME**

	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias
Controle	0.48 ± 0.12	0.74 ± 0.11	0.51 ± 0.08	0.64 ± 0.14
L-NAME	0.43 ± 0.07	0.31 ± 0.03	0.56 ± 0.17	0.56 ± 0.17

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. de 5 a 6 experimentos

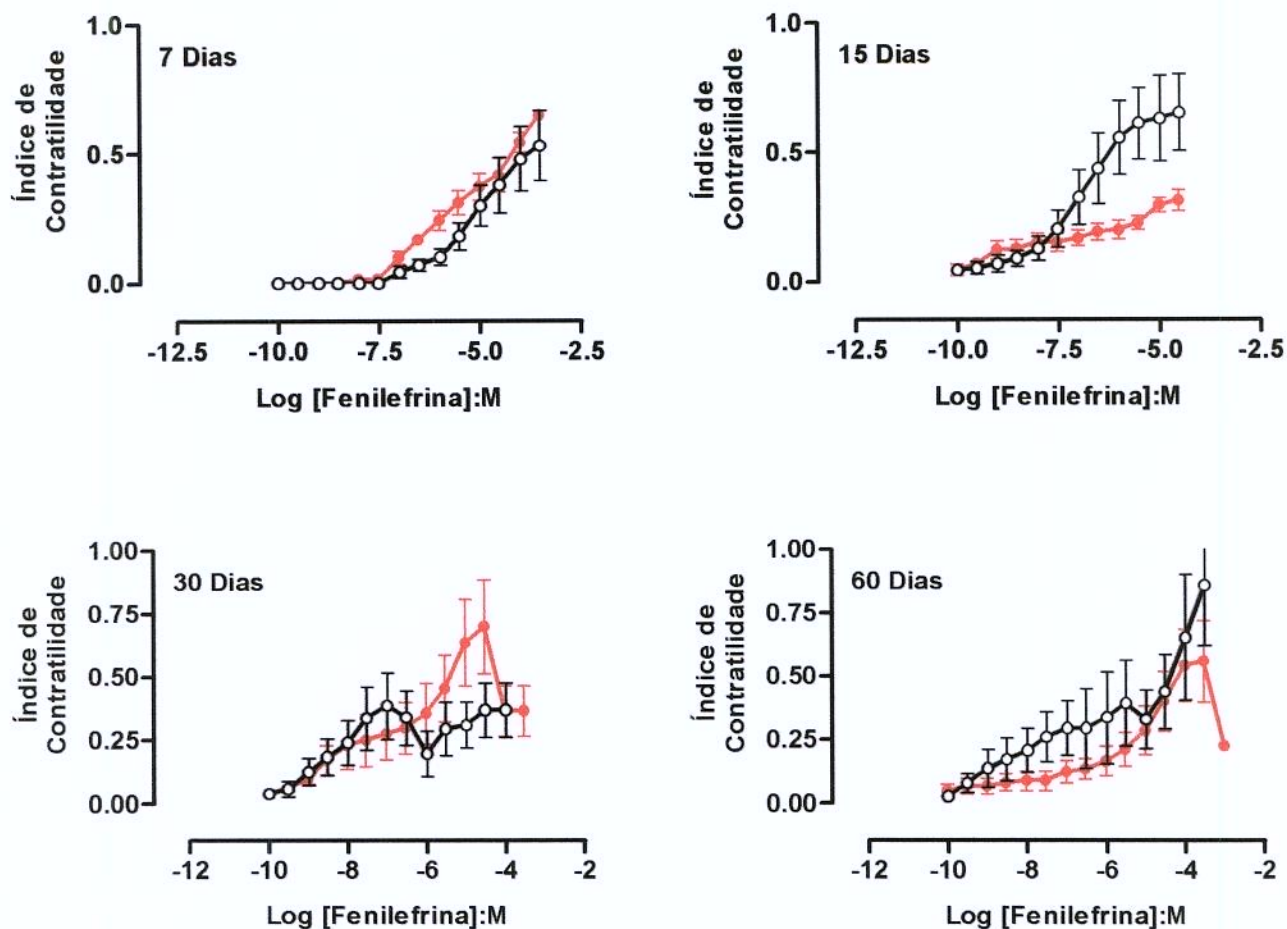


Figura 8. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em átrios esquerdos isolados, estimulados eletricamente, de ratos controles (○) ou tratados com L-NAME por 7, 15, 30 e 60 dias (●).

### **AVALIAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO EM ÁTRIOS**

Os átrios direitos dos animais tratados com L-NAME por 15 e 30 dias apresentaram uma porcentagem significativa de lesão atrial quando comparados com os átrios de animais controles. Os átrios esquerdos não apresentaram diferenças entre os valores percentuais de lesões após administração de L-NAME por 15 e 30 dias (Tabela 13).

**TABELA 13**

**Efeito do tratamento crônico com L-NAME na porcentagem de tecido conjuntivo em átrios de ratos**

GRUPOS	ÁTRIOS		N
	Direito	Esquerdo	
Controle	22 ± 1,1	25,6 ± 2,0	10
L-NAME 15 dias	27 ± 2,3*	31,6 ± 2,1	6
L-NAME 30 dias	29 ± 1,3*	26,2 ± 2,5	6

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

#### 4. DISCUSSÃO

Nosso estudo mostra que o tratamento crônico com L-NAME em ratos não alterou as respostas cronotrópicas mediadas pelos adrenoceptores  $\beta_1$  e receptores muscarínicos. As respostas inotrópicas aos agonistas adrenérgicos também não foram modificadas pelo tratamento com L-NAME. A ausência de efeito do L-NAME, quando adicionado *in vitro* à preparação, reforça os achados obtidos nos tratamentos crônicos, onde tanto a frequência basal quanto a potência dos agonistas isoproterenol e noradrenalina não foram afetadas pela exposição a este composto. Isto indica que o NO não modula as respostas cronotrópicas dos átrios mediadas pelos adrenoceptores  $\beta_1$ . No entanto, as curvas concentração-efeito ao isoproterenol e a diminuição da resposta máxima para o agonista  $\beta_3$  BRL 37344 mostraram que alterações funcionais, possivelmente envolvendo outros subtipos de adrenoceptores  $\beta$ , possam estar ocorrendo nesse modelo de hipertensão.

A elevação de pressão arterial induzida pelo bloqueio crônico da síntese de NO pelo L-NAME, já detectada após uma semana de tratamento, foi tempo-dependente, confirmando a eficiência desse modelo experimental para o estudo da hipertensão arterial (Ribeiro et al., 1992).

Vários autores têm descrito a influência da hipertensão arterial nas respostas dos adrenoceptores, modificando ou não a densidade desses receptores e/ou seus mecanismos de acoplamento celular, em diversas espécies animais (Feldman, 1987; Strasser et al., 1988; Brodde et al., 1989; Feldman & Bristow, 1990; Butterfield & Chess-Williams, 1991; Kenakin, 1993; Chess-Williams et al., 1994; Zanesco et al., 1997). Em nossos experimentos,

observamos que a hipertensão induzida pelo tratamento com L-NAME não induziu qualquer alteração na resposta cronotrópica mediada pelos adrenoreceptores  $\beta_1$  mostrando claramente que as respostas à noradrenalina não estão alteradas. No entanto, quando empregamos o agonista não seletivo  $\beta$ , isoproterenol, houve uma tendência de subsensibilidade da resposta cronotrópica após duas semanas de tratamento que se manteve constante até 60 dias após o tratamento com L-NAME. Estudos realizados em diferentes modelos de hipertensão arterial experimental têm mostrado diminuição da resposta  $\beta$  adrenérgica em tecidos cardíacos sendo tal efeito correlacionado à elevação dos níveis plasmáticos de catecolaminas e aumento da atividade simpática, o que muitas vezes parece ser a causa primária da hipertensão (Brodde et al., 1989; Feldman, 1987; Bohm et al., 1988; Zanesco et al., 1997). O NO parece desempenhar importante papel regulatório na atividade simpática central, através da modulação dos neurônios no núcleo do trato solitário e dos núcleos ventro-laterais do tronco cerebral (Shapoval et al., 1991; Tagawa et al., 1994). Além disso, Kvetnanski et al (1997) e K-Laflamme et al. (1998) observaram que o tratamento crônico com L-NAME induz elevação significativa dos níveis plasmáticos de adrenalina, que não é acompanhada por similar elevação de noradrenalina (K-Laflamme et al., 1998). Esses autores enfatizam que a ação principal desse modelo de hipertensão seria então a ativação do sistema adreno-medular levando à suposição que a ativação simpática não está alterada. Está bem estabelecido que a constante estimulação de receptores desencadeia o processo de dessensibilização, levando a alterações no número de receptores e/ou reduzindo a eficácia de agonistas, afetando assim

os mecanismos de transdução celular (Brodde, 1987; Lefkowitz & Caron 1988; Kenakin, 1990). Assim, o alto nível plasmático de adrenalina encontrado em ratos tornados hipertensos pela administração prolongada de L-NAME poderia induzir dessensibilização dos adrenoceptores  $\beta_2$ , uma vez que a adrenalina possui cerca de 50 vezes mais afinidade para estes receptores do que a noradrenalina. No entanto, os desvios das curvas concentração-efeito ao isoproterenol não atingiram significância estatística para podermos afirmar a existência de um processo de dessensibilização de um subtipo de receptor que em condições normais (fisiológicas) não participa das respostas celulares em ratos. Assim, é possível que esse pequeno desvio possa ser relevante no estudo das funções do marca-passo; além disso, este resultado pode apontar novos estudos na caracterização da população de adrenoceptores presentes no tecido cardíaco de ratos. Recentemente, um quarto adrenoceptor  $\beta$  foi caracterizado em coração de ratos, cobaias, gatos e em humanos (Kaumann & Molenaar, 1996; Malinowska & Schlicker, 1996; 1997). Pouco se sabe sobre a ativação desse adrenoceptor  $\beta$  atípico, uma vez que ainda não foi clonado e sua possível ativação pelas catecolaminas ainda não está esclarecido. No entanto, evidências farmacológicas mostram que esses receptores são diferentes dos adrenoceptores  $\beta_3$ , e possuem ações cronotrópicas positivas no coração (Cohen et al., 1999). O emprego do agonista seletivo  $\beta_3$ , BRL 37344 mostrou que a hipertensão induzida pela inibição do NO não afeta a potência desse agonista, porém a resposta máxima apresenta-se diminuída após 30 dias de tratamento, sugerindo uma possível alteração do sistema de transdução celular da resposta cronotrópica positiva após o tratamento. Esta alteração

pode estar relacionada a diferenças encontradas na cadeia de aminoácidos do receptor  $\beta_3$ , quando comparado aos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (Gros et al., 1998). Strosberg (1993), estudando clones de receptores  $\beta$  mutantes, demonstraram que as diferenças encontradas entre os receptores  $\beta_3$  em roedores e humanos podem estar ligadas à uma mudança conformacional que, conseqüentemente, levaria à diferenças farmacológicas. Kaumann & Molenaar (1996), estudando a população do terceiro receptor em átrios de ratos e humanos, concluíram que o terceiro adrenoceptor cardíaco do tipo  $\beta$  é diferente do adrenoceptor  $\beta_3$ , não sendo, portanto, espécies homólogas do mesmo receptor; isto sugeriu aos autores a existência de duas populações distintas de receptores.

Em relação aos resultados da adição do L-NAME *in vitro*, nossos dados confirmam estudos anteriores (Kennedy et al., 1994) mostrando que o L-NAME *per se* não modifica a frequência basal dos batimentos atriais, potência e eficácia do isoproterenol e noradrenalina. Em conjunto, esses resultados indicam apenas que as curvas concentração-efeito à noradrenalina e ao isoproterenol após 15 dias de tratamento com L-NAME são funcionalmente diferentes; no entanto, não avaliamos metodologicamente o que determinaria tais diferenças. Para isso, ferramentas farmacológicas mais seletivas necessitariam ser empregadas.

A influência do NO sobre o sistema nervoso parassimpático no coração tem sido bastante estudada e mostra resultados controversos. Buxton et al. (1993) mostraram que o L-NAME *in vitro* atua como antagonista muscarínico ao bloquear receptores  $M_2$  e  $M_3$  em diferentes tecidos. Outro estudo usando camundongos com *knock-out* da enzima NO sintase endotelial



mostrou que células miocárdicas não são ativadas pelo carbacol, em função da ausência de produção de NO nessas células. Isto sugeriu aos autores a existência de uma estreita correlação entre a ativação dos receptores muscarínicos e a liberação do NO na resposta celular dos miócitos (Han et al., 1998). Nossos resultados mostraram que a resposta cronotrópica negativa ao agonista pleno, carbacol, e ao agonista parcial, pilocarpina, não é alterada nos animais tratados cronicamente com L-NAME. Esses achados contrapõem os relatos acima descritos, e mostram que a inibição crônica da síntese de NO não interfere com as respostas muscarínicas do nodo sinoatrial. Por outro lado, nossos achados são apoiados pela demonstração recente que camundongos deficientes de NO sintase endotelial por manipulação genética não exibem alterações da resposta cronotrópica mediada pelos receptores muscarínicos, no sistema de condução átrio-ventricular e na força de contração (Vandecasteele et al., 1999). Isto parece descartar a idéia que o NO seja fundamental para a atividade do sistema nervoso parassimpático, e sugere que o NO não modula as respostas mediadas pelos receptores muscarínicos. Além disso, em nossa preparação, não comprovamos a ação anti-muscarínica direta do L-NAME uma vez que a sensibilidade dos tecidos não foi modificada.

As respostas inotrópicas dos átrios esquerdos aos agonistas adrenérgicos fenilefrina e isoproterenol mostram que o tratamento crônico com L-NAME também não interfere com a força de contração do tecido cardíaco. As respostas inotrópicas positivas dos agonistas  $\alpha_1$ , obtidas em nossos experimentos, mostram a complexidade da resposta mediada por pelos adrenoceptores  $\alpha_1$  no tecido cardíaco, e indicam a necessidade de

maiores investigações sobre o papel desses receptores na função cardíaca. Peters et al. (1997) e Li et al. (1997), estudando a participação dos adrenoceptores  $\alpha_1$  em átrios esquerdos de ratos, verificaram que a ativação dos mesmos pode produzir efeitos inotrópicos positivos ou negativos, cujos segundos mensageiros ainda não estão bem estabelecidos. Vários trabalhos relatam que a resposta inotrópica de átrios esquerdos de ratos não depende inteiramente de mecanismos mediados por receptores, mas pode sofrer interferências do pH intracelular e processos metabólicos (Endoh, 1982; Terzic & Vogel, 1991; Williamson et al., 1996; Peters et al., 1997). Portanto, maiores investigações nas respostas inotrópicas mediadas pelos adrenoceptores  $\alpha$  precisam ser realizadas.

As respostas inotrópicas mediadas por receptores adrenérgicos do tipo  $\beta$  promovidas pelo isoproterenol não foram alteradas nos animais tornados hipertensos pelo tratamento com L-NAME. Este resultado contrasta com outros estudos em que, usando a mesma preparação e diferentes modelos de hipertensão arterial tais como ratos espontaneamente hipertensos (Fujiwara et al., 1972; Pfeffer et al., 1974; Saragoca & Tarazi, 1981a) e dois rins-um clip (2K-1C) (Saragoca & Tarazi, 1981b), os autores observaram atenuação da resposta inotrópica ao isoproterenol. Portanto, nossos dados indicam que, diferente de outros modelos experimentais de hipertensão, o tratamento com L-NAME não produz qualquer modificação nas respostas inotrópicas mediadas pelos adrenoceptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos.

As análises histológicas dos átrios mostraram que o tratamento com L-NAME acarretou um aumento significativo da porcentagem de tecido conjuntivo em átrios direitos de animais tratados por 15 e 30 dias. Trabalhos

em nosso laboratório têm, de fato, mostrado a ocorrência de fibrose intersticial e necrose miocárdicas em ventrículos de animais tratados cronicamente com L-NAME (Moreno-Jr et al., 1995, 1996, 1997; Oliveira et al., 1999). No entanto, é curioso que essas lesões não tenham aparecido em átrios esquerdos. Além disso, o aumento de tecido conjuntivo dos átrios direitos não foram suficientes para determinar qualquer alteração nas respostas celulares mediadas pelos adrenoceptores  $\beta_1$  e receptores muscarínicos.

Finalmente, o bloqueio crônico da síntese de NO parece não afetar as respostas cronotrópicas mediadas pelos adrenoceptores  $\beta$  em átrios de ratos. No entanto, estudos para melhor caracterização, tanto da família de receptores  $\beta$  adrenérgicos presentes nos átrios e coração, como das possíveis alterações destes receptores produzidas pelo estado hipertensivo pela ausência de NO, precisam ser realizados.

## 5. CONCLUSÕES

- O tratamento com L-NAME não induziu alterações na potência do agonista seletivo  $\beta_1$ , noradrenalina, do agonista não seletivo  $\beta$ , isoproterenol, e do agonista seletivo  $\beta_3$ , BRL 37344, em átrios direitos isolados, em todos os períodos estudados;
- A resposta máxima ao BRL 37344 em átrios direitos isolados foi significativamente atenuada após 30 dias de tratamento com L-NAME. As respostas máximas aos agonistas noradrenalina e isoproterenol não foram alteradas em todos os períodos estudados;
- O tratamento com L-NAME não induziu alterações na potência dos agonistas muscarínicos (carbacol e pilocarpina) em átrios direitos isolados, em todos os períodos estudados;
- A adição *in vitro* de L-NAME não provocou mudanças significativas na frequência basal dos batimentos atriais e nem na potência dos agonistas  $\beta$  adrenérgicos (isoproterenol e noradrenalina) em átrios direitos isolados.
- As respostas inotrópicas mediadas pelos adrenoceptores  $\alpha$  e  $\beta$  não foram alteradas pela inibição crônica da síntese de NO em átrios esquerdos isolados.
- As análises histológicas mostraram que o tratamento crônico com L-NAME produz aumento significativo de tecido conjuntivo em átrios direitos isolados de ratos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERNE W. Quantitative methods in histology. **J. Med. Lab. Technol.**, **27**:160-170, 1970.
- AISAKA, K., GROSS, S., GRIFFITH, O.W., LEVI, R. N<sup>9</sup>-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **160**: 881- 886, 1989.
- AHLQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.**, **153**:586-600, 1948.
- BAYLIS, C., MITRUKA, B., DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest.** , **90**: 278- 281, 1992.
- BERNE, L.A., LEVY, M.N. The peripheral circulation and its control. In: **Physiology**, 2a. edition, pp. 407-410, Guanabara Ed., Rio de Janeiro, 1990.
- BHARDWAJ, R.; MOORE, P.K. Endothelium-derived relaxing factor and the effects of acetylcholine and histamine on resistance blood vessels. **Br. J. Pharmacol.** , **95**: 835- 843, 1988.
- BIRNBAUMER, L. G proteins in signal transduction. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **30**: 675-705, 1990.
- BIRNBAUMER, L. G proteins and the modulation of potassium channels. In: **Potassium Channel Modulators**. Ed. by A. H. Weston e J. C. Hamilton. pp 44-71, BLACKELL Scientific Publications, New york, 1992.
- BOHM, M., BEUCKELMANN, D., FEILER, G., DIET, F., ERDMANN, E. Properties of cardiac alpha- and beta-adrenoceptors in spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **338**:383-391, 1988.
- BOLOTINA, V.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A. Nitric oxide activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, **368**: 850-853, 1994.
- BONNER, T.I. BUCKLEY, N.J., YOUNG, A.C. , BRANN, M.R. Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, **237**: 527-531, 1987.
- BOWER, E.A., LAW, A.C.K. The effects of N<sup>9</sup>-nitro L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside and noradrenaline on venous return in the anesthetized cat. **Br. J. Pharmacol.**, **108**: 933-940, 1993.

- BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E. LOWENSTEIN, C. REED, R.R.SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, **351**: 714-718, 1991.
- BRODDE, O-E. Cardiac *beta*-adrenergic receptors. **ISI ATLAS of Science Pharmacol.** **1**: 107-112, 1987.
- BRODDE, O-E., ZERKOWSKI, H.R. , BORST, H.G., MAIER, W., MICHEL, M.C. Drug- and disease-induced changes of human cardiac  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors. **Eur. Heart J.**, **10**: 38-44, 1989.
- BROWN, J.H., TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Ninth edition, Ed. by A. Goodman Gilman; pp 141-160, McGrawHill, New York, 1996.
- BRYAN, L.J., COLE, J.J., O'DONNELL, S.R., WANSTALL, J.C. A study designed to explore the hypothesis that *beta*<sub>1</sub> adrenoceptors are "innervated" receptors and *beta*<sub>2</sub> adrenoceptors are "hormonal" receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **216**: 395-400, 1981.
- BUTTERFIELD, M.C., CHESS-WILLIAMS, R. Enhanced ventricular alpha-adreceptor responses following chronic beta-adrenoceptor stimulation in the rat. In: **The Pharmacology of Adrenoceptor** , Ed. by E. Szabadi e C. M. Bradshaw, pp 345-346, Berkhauser Verlag, Basel, 1991.
- BUXTON, I.L.O, CHEEK, D.J., ECKMAN, D., WESTFALL, D.P., SANDERS, K.M., KEEF, K.D. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. **Circ. Res.**, **72**:387-395, 1993.
- CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. **Pharmacol. Ther.**, **58**: 319-379, 1993.
- CHESS-WILLIAMS, R., DOUBLEDAY, B., REYNOLDS, G.P. Differential regulation of cardiac  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors by the sympathetic nervous system. **J. Aut. Pharmacol.**, **14**: 29-36, 1994.
- CLARKSON, P.B.M., LIM, P.O, MACDONALD, T.M. Influence of basal nitric oxide secretion on cardiac function in man. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **40**: 299-305, 1995.
- COHEN, M.L., BLOOMQUIST, W., KRIAUCIUNAS, A., SHUKER, A., CALLIGARO D. Aryl propanolamines: comparison of activity at human  $\beta_3$  receptors, rat  $\beta_3$  receptors and rat atrial receptors mediating tachycardia. **Br. J. Pharmacol.** **126**: 1018-1024, 1999.
- CUNHA, R.S., CABRAL, A.M., VASQUEZ, E.C. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **Am. J. Hypertension**, **6**: 806-809, 1993.

- DIFRANCESCO, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. **Annu. Rev. Physiol.**, **55**: 455-472, 1993.
- DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, **13**:1-15, 1998.
- DOMINICZACK, A.F., BOHR, D.F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. **Hypertension**, **25**: 1202- 1211, 1995.
- DORJE, F., WESS, J., LAMBRECHT, G., TACKE, R., MUTSCHLER, E., BRANN, M.R. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **256**: 727-733, 1991.
- EGLIN, R.M., HEGDE, S.S., WATSON, N. Muscarinic receptor and smooth muscle function. **Pharmacol. Rev.**, **48**, 532-556, 1996.
- EMORINE, L., MARULLO, S., BRIEND-SUTREN, M. M., PATEY, G., TATE, K., DELAVIER-KLUTCHKO, C., STROSBERG, A. D. Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. **Science**, **245**: 1118-1121, 1989.
- EMORINE, L., BLIN, N., STROSBERG, A.D. The human  $\beta_3$ -adrenoceptor: the search for a physiological function. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 3-7, 1994.
- ENDO, M. Adrenoceptors and the myocardial inotropic response: Do alpha and beta receptor sites functionally coexist? In: Kalsner S (ed) **Trends in autonomic pharmacology**. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, pp 303-322. 1982
- FELDMAN, A.M., BRISTOW, M.R. The  $\beta$ -adrenergic pathway in the human heart: implications for inotropic therapy. **Cardiology**, **77**: 11-132, 1990.
- FELDMAN, R.D.  $\beta$ -adrenergic receptor alteration in hypertension-physiological and molecular correlates. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **65**: 1666-1672, 1987.
- FREEDMAN, S.B., BEER, M.S., HARLEY, E.A. Muscarinic  $M_1$ ,  $M_2$  receptor binding. Relationship with functional efficacy. **Eur. J. Pharmacol.**, **156**:133-142, 1988.
- FUJIWARA, M., KUCHII, M., SHIBATA, S. Differences of cardiac reactivity between spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **19**: 1-11, 1972.
- FURCHGOTT, R.J., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373- 376, 1980.
- FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **24**: 175-197, 1984.

- GARDINER, S.M. COMPTON, A.M., KEMP, P.A., BENNETT, T. Regional and haemodynamic effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. **Br. J. Pharmacol.**, **101**:625-631, 1990.
- GOYAL, R.K. Identification, localization and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. **Life Sci.**, **43**: 2209-2220, 1988.
- GROS, J., MANNING, B.S., PIETRI-ROUXEL, F., GUILLAUME, J., DRUMARE, M., STROBERG, D. Site-directed mutagenesis of the human  $\beta_3$ -adrenoceptor. **Eur. J. Biochem.** **251**: 590-596, 1998.
- GRYGLEWSKI, R.J., BOTTING, R.M., VANE, J.R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, **12**: 530-548, 1988.
- HAMMER, R., GIACHETTI, A. Muscarinic receptor subtypes: M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. Biochemical and functional characterization. **Life Sci.**, **31**: 2991-2998, 1982.
- HAN, X., KUBOTA, I., FERON, O., OPEL, D.J., ARSTALL, M.A., ZHAO, Y.Y., HUANG, P., FISHAMN, M.C., MICHEL, T., KELLY, R.A. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocytes ICa-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **1998**;26: 6510-6515.
- HANDY, R.L.C., WALLACE, P. GAFFEN, Z.A., WHITEHEAD, K.J. & MOORE, P.K. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent of neuronal nitric oxide synthase *in vitro*, in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **116**: 2349-2350, 1995.
- HUCKSTORF, C.; ZANZINGER, J., FINK, B.; BASSENGE, E. Reduced nitric oxide formation causes coronary vasoconstriction and impaired dilator responses to endogenous agonists and hypoxia in dogs. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **349**: 367-373, 1994.
- HUGHES, I.E., SMITH, J.A. The stability of noradrenaline in physiological salt solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, **30**: 124-126, 1978.
- HUMPHRIES, R.G., CARR, R.D., NICOL, A.K., TOMLINSON, W., O'CONNOR, S.E. Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N<sup>G</sup>-nitro-arginine. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 565-566, 1991.
- IGNARRO, L.J., BYRNS, R.E., BUGA, G.M., WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, **61**: 866- 879, 1987.
- KAUMANN, A.J. Four  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **Trends Pharmacol. Sci.**, **18**, 70-76, 1997.



- KAUMANN, A.J., MOLENAAR, P. Differences between the third cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta<sub>3</sub>-adrenoceptor in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, **118**: 2085-98, 1996.
- KENAKIN T. **Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction**. Second edition, Raven Press, New York, 1993.
- KENAKIN T. Drugs and receptors. An overview of the current state of knowledge. **Drugs**; **40**:666-687, 1990.
- KENNEDY, R.H., HICKS, K.K., BRIAN, J.E.-Jr., SEIFEN, E. Nitric oxide has no chronotropic effect in right atria isolated from rat heart. **Eur. J. Pharmacol.**, **255**:149-156, 1994.
- KENT, K.M., EPSTEIN, S.E., COOPER, T., JACOBWITZ, D.M. Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlation. **Circulation**, **50**: 948-955, 1974.
- KLABUNDE, R.E., RITGER, R.C., HELGREN, M.C. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factors (nitric oxide) formation release in anesthetized dogs. **Eur. J. Pharmacol.**, **199**: 51-59, 1991.
- K-LAFLAMME, A., FOUCART, S., MOREAU, P., LAMBERT, C., CARDINAL, R., CHAMPLAIN, J. Sympathetic functions in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. **J. Hypertension** **16**: 63-76, 1998.
- LAHERA, V., SALOM, M.G., MIRANDA-GUARDIOLA, F., MONCADA, S., ROMERO, J.C. Effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. **Am. J. Physiol.**, **261**: F1033-F1037, 1991.
- LANDS, A. M., ARNOLD, A., McAULIFF, J. P., LUDUENA, F. R., BROWN, T. B. Differentiation of receptors systems activated by sympatomimetic amines. **Nature (London)**, **214**: 597-598, 1967.
- LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.G. Adrenergic receptors:models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **J. Biol. Chem.**, **263**: 4993-4996, 1988.
- LEVY, M.N., SCHWARTZ, P.J. eds. **Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical Implications**. Futura Publishing Co., Armonk, NY, 1994.
- LI, Y.J., XIAO, Z.S., PENG, C.F., DENG, H.W. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **Eur. J. Pharmacol.** **311**: 163-167, 1997.
- MAEDA, A., KUBO, T., MISHINAM., NUMA, S. Tissue distribution of m RNAs encoding muscarinic acetylcholine receptors subtypes. **FEBS Lett**, **239**: 339-342, 1988.

- MALINOWSKA, B., SCHLICKER, E. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP 12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical beta-adrenoceptors, different from beta<sub>3</sub>-adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.**, **117**:943-949, 1996.
- MALINOWSKA, B., SCHLICKER, E. Further evidence for differences between cardiac atypical beta-adrenoceptors and brown adipose tissue beta<sub>3</sub>-adrenoceptors in the pithed rat. **Br. J. Pharmacol.** **122**:1307-14, 1997.
- MINNEMAN, K.P.  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca<sup>2+</sup>. **Pharmacol. Rev.**, **40**: 87-119., 1988.
- MINNEMAN, K.P., MOLINOFF, P.B. Classification and quantification of *beta* adrenergic receptor subtypes. **Biochem. Pharmacol.**, **29**: 1317-1323, 1980.
- MOORE, P.K., AL-SWAYEH, O.A., CHONG, N.W.S., EVANS, R.A., GIBSON, A. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation "in vitro". **Br. J. Pharmacol.**, **99**: 408- 412, 1990.
- MORENO-Jr., H., NATHAN, L.P., COSTA, S.K.P., METZE, K., ANTUNES, E., ZATZ, R., DE NUCCI, G. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur. J. Pharmacol.**, **287**: 93-96, 1995.
- MORENO-Jr., H., METZE, K., BENTO, A.C., ANTUNES, E., ZATZ, R., DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Bas. Res. Cardiovasc.**, **91**: 248-255, 1996.
- MORENO-Jr., H., NATHAN, L.P., METZE, K., COSTA, S.K.P., ANTUNES, E., HYSLOP, S., ZATZ, R., DE NUCCI, G. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **24**, 349-352, 1997.
- MULSCH, A., BUSSE, R. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (N<sup>5</sup>-imino(nitroamino)methyl-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.**, **341**: 143-147, 1990.
- NAFRIALDI, B.J., MIMRAM, A. Renin-angiotensin system in the pressor effect of acute N<sup>ω</sup>-nitro arginine methyl ester. **J. Hypertension**, **11**: S324-S325, 1993.
- NAKANE, M., KLINGHOFER, V., KUK, J.E., DONNELLY, J.L., BUDZIK, G.P., POLLOCK, J.S., BASHA, F., CARTER, G.W. Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Mol. Pharmacol.**, **47**, 831-834, 1995.

- NAVARRO, J., SANCHEZ, A., SAIZ, J., RUILOPE, L.M., GARCIA-ESTAN, J., ROMERO, J.C., MONCADA, S., LAHERA, V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol.*, **267**: R1516-21, 1994.
- OLIVEIRA, C.F., NATHAN, L.P., METZE, K., MORENO JR, H., DE LUCA, I.M.S., SUCUPIRA, M., ZATZ, R., ZAPPELLINI, A., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **373**: 195-200, 1999.
- 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.
- PALMER, R.M.J., REES, D.D. ASHTON, D.S., MONCADA, S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **153**: 1251-1256, 1988.
- PETERS, S.L., PFAFFENDORF, M., VAN ZWIETEN, P.A. The influence of oxidative stress on various inotropic responses in isolated rat left atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **355**: 390-397, 1997.
- PETERSON, G.L., HERRON, G.S., YAMAKI, M., FULLERTON, D.S., SCHIMERLIK, M.I. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 4993-4997, 1988.
- PFEFFER, M.A., PFEFFER, J.M., FROHLICH, E.D. Hemodynamics of the spontaneously hypertensive rat: Effects of isoproterenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**:1025-1030, 1974.
- POLLOCK, D.M., POLAKOWSKI, J.S., DIVISH, B.J., OPGENORTH, T.J. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension*, **21**: 660-666, 1993.
- RAPOPORT, R.M., DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium-dependent vasodilatador- and nitrovasodilatador-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **96**, 19-30,1983.
- REES, D.D., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 3375-78, 1989.
- RIBEIRO, M.O., ANTUNES, E., DE NUCCI, G., LOVISOLO, S.M., ZATZ, R. chronic inhibition of nitric oxide synthesis - A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, **20**: 298- 303, 1992.

- RICHARD, V., BERDEAUX, A., LA ROCHELLE, C.D., GIUDICELLI, J.F. Regional coronary haemodynamic effects of two inhibitors of nitric oxide synthesis in anesthetized, open-chest dogs. **Br. J. Pharmacol.**, **104**: 59-64, 1991.
- RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, **284**: 17-22, 1980.
- SAKUMA, I., TOGASHI, H., YOSHIOKA, M., SAITO, H., YANAGIDA, M., TAMURA, M., KOBAYASHI, T., YASUDA, H., GROSS, S., LEVI, R.N<sup>G</sup>-Methyl-L-Arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity *in vivo*. **Circ. Res.**, **70**: 607-611, 1992.
- SALT, P.J. Inhibition of noradrenaline uptake<sub>2</sub> in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylate phenethylamines. **Eur. J. Pharmacol.**, **20**: 329-340, 1972.
- SANDER, M., HANSEN, P.G., VICTOR, R.G. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. **Hypertension**, **26**: 691-695, 1995.
- SARAGOCA, M., TARAZI, R.C. Impaired cardiac contractile response to isoproterenol in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, **3**: 380-385, 1981<sub>a</sub>.
- SARAGOCA, M.A., TARAZI, R.C. Left ventricular hypertrophy in rats with renovascular hypertension. Alterations in cardiac function and adrenergic responses. **Hypertension**, **3**: 171-6, 1981<sub>b</sub>.
- SCHULZ, E., TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 255-259, 1994.
- SHAPOVAL, L.N., SAGACH, V.F., POBEGAILO, L.S. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neurosci. Lett.**, **132**: 47-50, 1991.
- SIGMON, D.H., BEIERWALTES, W.H. Angiotensin II: nitric oxide interaction and the distribution of blood flow. **Am. J. Physiol.**, **265**: R1276-1283, 1993.
- STAMLER, J.S., LOH, E., RODDY, M.A., CURRIE, K.E., CREAGER, M.A. Oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. **Circulation**, **89**: 2035-2040, 1994.
- STRASSER, R.H., KRIMMER, J., MARQUETANT, R. Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors: impaired desensitization in myocardial ischaemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **129**: S15-S24, 1988.
- STROSBERG, A.D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. **Protein Sci.**, **2**: 1198-209, 1993.

- SURMAN, A., DOGGRELL, S.A. Characterization of the antagonism with metoprolol, ICI 147, 798, pindolol, mepindolol and bopindolol on the responses of the rat left atria to isoprenaline. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** **346**: 657-664, 1992.
- TAGAWA, T., IMAIZUMI, T., HARADA, S., ENDO, T., SHIRAMOTO, M., HIROOKA, Y., TAKESHITA, A. Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. **Circ. Res.**, **75**: 70-76, 1994.
- TERZIC, A., VOGEL, S.M. On the mechanism of the positive inotropic action of the alpha adrenoceptor agonist, phenylephrine in isolated rat left atria. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **257**: 520-529, 1991.
- VAN GELDEREN, E.M., BOER, M.O.D., SAXENA, P.R. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester: systemic and pulmonary haemodynamics, tissue blood flow and arteriovenous shunting in the pig. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **348**: 417-423, 1993.
- VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. **Arch. Inter. Pharmacodyn. Ther.**, **143**: 229-330, 1963.
- VANDECASTEELE, G., ESCHENHAGEN, T., SCHOLZ, H., STEIN, B., VERDE, I., FISHMEISTER, R. Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved on mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Nat. Med.** **5**: 331-334, 1999.
- WESS, J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. **Trends Pharmacol. Sci.**, **14**: 308-313, 1993.
- WILLIAMS, R.S., LEFKOWITZ, R.J. Alpha adrenergic receptors in rat myocardium. Identification by binding of [3H] dihydroergocryptine. **Circ. Res.** **43**: 721-727, 1978.
- WILLIAMSON A.P., SEIFEN, E., LINDEMANN, J.P., KENNEDY, R.H. The positive inotropic effect of alpha 1A-adrenoceptor stimulation is inhibited by 4-aminopyridine. **Eur. J. Pharmacol.**, **304**: 73-80, 1996.
- YATANI, A., CODINA, J., IMOTO, Y., REEVES, J.P., BIRNBAUMER, L., BROWN, A.M. A G-protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. **Science**, **238**: 1288-1292, 1987.
- ZANCHI, A., SCHAAD, N.C., OSTERHEL, M.C., GROUZMANN E., HUSSBERGER, J. BRUNNER, H.R. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats in renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. **Am. J. Physiol.**, **268**: H2267-H2273, 1995.

- ZANESCO, A., SPADARI-BRATFISCH, R.C. BARKER, L.A. Sino-aortic deafferentation causes right atrial  $\beta$ -adrenoceptor down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**: 677-685, 1997.
- ZAPPELLINI, A., TEIXEIRA, S.A., MUSCARA, M.N., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. The renin-angiotensin system does not modulate the haemodynamic changes induced by acute inhibition of the nitric oxide synthesis in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, **317**: 285-291, 1996.
- ZAPPELLINI, A., MORENO-Jr, H., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetised dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **29**: 45-48, 1997.
- ZATZ, R., BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, **32**: 958-964, 1998.
- ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Laboratory Animal Sci.* **40**:198-201, 1990.

### Abstract

Chronic administration of nitric oxide synthesis inhibitors induces arterial hypertension accompanied by left ventricular hypertrophy and myocardial ischaemic lesions. Since the enhancement of sympathetic drive has been implicated in these phenomena, the current study was carried out to determine the potency of adrenergic- and muscarinic-agonists on chronotropic and inotropic responses of isolated atria from rats treated chronically with the NO inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Atrial lesions induced by the chronic treatment with L-NAME were also evaluated. Our results showed that the potency of isoproterenol, norepinephrine, carbachol, pilocarpine and BRL 37344 in isolated right atria from rats treated chronically with L-NAME was not affected as compared to control animals. Addition of L-NAME *in vitro* (100  $\mu\text{mol/L}$ ) affected neither basal rate nor chronotropic response for isoproterenol and norepinephrine in rat heart. Additionally, the inotropic responses of isoproterenol and phenylephrine were not affected by L-NAME treatment. Stereological analysis of the right atria at 15 and 30 days revealed a significant increase on amount of fibrous tissues in L-NAME-treated groups ( $27 \pm 2.3\%$  and  $28 \pm 1.3\%$ , for 15 and 30 days, respectively;  $P < .05$ ) as compared to the control group ( $22 \pm 1.1\%$ ). In left atria there were no changes on the amount of fibrous tissue. Our results indicate that nitric oxide does not to interfere with  $\beta$ -adrenoceptors and muscarinic receptors mediated-chronotropic and inotropic responses.