

Sandra Regina Machado de Campos Pacca

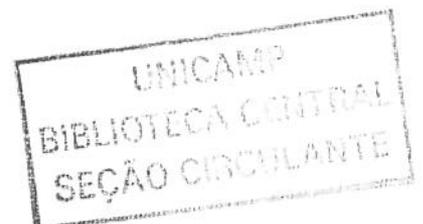
**EFEITOS DO ATENOLOL E PROPRANOLOL NA HIPERTENSÃO E
NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS MIOCÁRDICAS INDUZIDAS
PELA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga Sandra Regina Machado de Campos Pacca.

Campinas, 12 de dezembro de 2001.

*Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -*

Campinas, 2001



Sandra Regina Machado de Campos Pacca

**EFEITOS DO ATENOLOL E PROPRANOLOL NA HIPERTENSÃO E
NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS MIOCÁRDICAS INDUZIDAS
PELA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador : Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas, 2001

III
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BIB
Nº CHAMADA T/UNICAMP	P114e
V	EX
TOMBO BC/	48091
PROC.	16.837/02
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00165786-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

BIB ID 237869

P114e

Pacca, Sandra Regina Machado de Campos

Efeitos do atenolol e propranolol na hipertensão e nas alterações morfológicas induzidas pela inibição da síntese de óxido nítrico em ratos / Sandra Regina Machado de Campos Pacca. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Edson Antunes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Atenolol. 2. Propranolol . 3. Hipertensão. 4. Infarto do miocárdio. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dra. Lea Rodrigues Simione

Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará

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

Data: 12/12/01

54447000

Qualquer tempo é tempo.
A hora mesma da morte
é hora de nascer.

Nenhum tempo é tempo
bastante para a ciência
de ver, rever.

Tempo, contratempo
anulam-se, mas o sonho
resta, de viver.

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, meu orientador, pela oportunidade do contato com o fantástico mundo da pesquisa.

À Prof^a Dr^a. Iara Maria De Luca, eterna estudiosa, por sua orientação efetiva na morfometria e nas análises estereológicas.

A Gustavo, meu querido marido, obrigado pelo apoio, confiança e carinho irrestritos.

Às filhas amadas, Sabrina e Samantha, que nesse período de ausência física nunca reclamaram e, cada uma a seu modo, soube demonstrar todo o seu afeto e compreensão.

Aos meus pais Osvaldo e Theresinha, sempre presentes nas horas mais importantes de minha vida.

Ao Prof. José Eduardo Cavalcanti Teixeira, compadre e amigo, que me apresentou à UNICAMP.

À colega Luciana Piovesan Nathan, por estar sempre disposta a ajudar.

À ex-técnica do departamento de Histologia Thelma Marsariolli, pelo suporte técnico e por sua amizade.

Aos Secretários Vanderley (Farmacologia), Helena e Rita (Histologia), pela gentileza e eficiência.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
RESUMO.....	XX
1 INTRODUÇÃO.....	23
Óxido nítrico- Considerações gerais.....	23
Síntese do NO.....	24
Funções do NO.....	25
Inibidores da síntese de NO.....	26
Antihipertensivos.....	28
Propranolol.....	30
Atenolol.....	31
OBJETIVOS.....	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33

Animais.....	33
Protocolo experimental.....	33
Avaliação da pressão arterial caudal e do peso corpóreo.....	34
Avaliação dos pesos cardíacos.....	34
Métodos histológicos qualitativos e quantitativos.....	35
Procedimentos gerais para microscopia de luz.....	35
Avaliação histológica qualitativa (estereologia).....	36
Avaliação histológica quantitativa.....	37
- Densidade de volume dos cardiomiócitos.....	38
- Número de perfis (cardiomiócitos).....	39
- Área média dos cardiomiócitos.....	39
- Densidade de área dos cardiomiócitos.....	40
Avaliação histológica quantitativa da microcirculação.....	40
- Densidade de volume dos vasos da microcirculação.....	41
- Número de perfis (arteríolas, vênulas e capilares).....	41
- Densidade de área ocupada pelos vasos da microcirculação.....	42
- Densidade de comprimento dos vasos da microcirculação.....	43
Áreas de lesão.....	43
Análise estatística.....	45

Procedência dos reagentes.....	45
3 RESULTADOS.....	46
Peso corpóreo.....	46
Pressão arterial da cauda.....	46
Pesos cardíacos.....	49
Resultados qualitativos.....	50
- Grupo controle.....	50
- Grupo L-NAME.....	51
- Grupos: L-NAME+propranolol e L-NAME+atenolol.....	51
- Grupos : Propranolol e atenolol.....	52
Estereologia e resultados quantitativos.....	63
- Densidade de volume ocupada pelos cardiomiócitos.....	63
- Áreas dos cardiomiócitos.....	63
- Densidade de volume dos vasos da microcirculação.....	64
- Densidade de comprimento dos vasos da microcirculação....	65
- Densidade de área dos vasos da microcirculação.....	66
- Áreas de lesão.....	66
- Mortalidade.....	67

4 DISCUSSÃO.....	68
5 CONCLUSÕES.....	74
6 SUMMARY.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Lista de Abreviaturas

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

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

L-NAA - N^G - amino-arginina

L-NIO - N-iminoetil-L-ornitina

SNC - Sistema nervoso central

N₂O - Óxido nitroso

ECA - Enzima conversora de angiotensina

PTC - Peso cardíaco total

PVE - Peso ventricular esquerdo

PCR - Peso cardíaco relativo

IPVE - Índice do peso ventricular esquerdo

IPC - Índice do peso cardíaco

A_{cel} - Área média da célula

V_v - Densidade de volume

S_v - Densidade de área

A_T - Área teste

Q_A - Número de perfis (imagens)

L_T - Comprimento total da linha-teste

L_V - Comprimento dos vasos da microcirculação

A - Área de lesão

ANOVA - Análise de variância

EPM - Erro padrão da média

PA - Pressão arterial

Lista de Figuras

Figura 1.	Hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com L-NAME.....	48
Figura 2.	Índice do peso cardíaco.....	49
Figura 3.	Índice do peso ventricular esquerdo.....	50
Figura 4.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo controle (1024x).....	52
Figura 5.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME (256x).....	53
Figura 6.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME (512x).....	54
Figura 7.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME. (128x).....	55
Figura 8.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME (256x).....	56

Figura 9.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME+propranolol (infarto recente- 256x).....	57
Figura 10.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME+propranolol (infarto recente- 512x).....	58
Figura 11.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME+atenolol.(áreas de lesão-256x).....	59
Figura 12.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo L-NAME+atenolol (fibrose cicatricial- 512x).....	60
Figura 13.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo propranolol (1024x).....	61
Figura 14.	Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de animal do grupo atenolol (1024x).....	62
Figura 15.	Área dos cardiomiócitos.....	64
Figura 16.	Áreas de lesão.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Evolução do peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais durante 8 semanas de tratamento.....	47
Tabela 2.	Densidade de volume ocupada pelos cardiomiócitos nos diversos grupos analisados.....	63
Tabela 3.	Densidade de volume ocupada pelos vasos da microcirculação.....	65
Tabela 4.	Densidade média do comprimento dos vasos da microcirculação.....	65
Tabela 5.	Densidade de área dos vasos da microcirculação.....	66

Resumo

O óxido nítrico é um importante modulador do tônus vascular. A inibição prolongada de sua síntese, por meio de compostos análogos à L-arginina, tais como o N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), constitui um modelo de hipertensão arterial acompanhado de isquemia miocárdica em ratos. Neste trabalho, investigou-se, em ratos, o efeito de dois antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, o atenolol (antagonista seletivo β_1) e o propranolol (antagonista não seletivo β), na hipertensão e nas lesões miocárdicas induzidas pela administração crônica (8 semanas) de L-NAME. Para tanto os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, (n =15 cada) : 1) Controle (animais que receberam ração e água de torneira); 2) L-NAME (animais que receberam apenas L-NAME na dose de 20 mg/rato/dia); 3) L-NAME + propranolol (animais que receberam L-NAME e propranolol, nas doses de 20 e 30 mg/rato/dia, respectivamente; 4) L-NAME + atenolol (animais que receberam L-NAME e atenolol, nas doses de 20 e 30 mg/rato/dia, respectivamente; 5) Propranolol (animais que receberam somente o propranolol na dose de 30 mg/rato/dia), e 6) Atenolol (animais que receberam apenas o atenolol na dose de 30 mg/rato/dia).

A pressão arterial caudal foi medida semanalmente e observou-se que nos animais tratados com L-NAME, houve uma elevação da pressão arterial tempo-dependente. Os pesos corpóreos foram também avaliados semanalmente e os animais do grupo tratado com L-NAME, tiveram um ganho de peso menor em relação aos outros grupos experimentais.

Ao final do estudo, os animais foram sacrificados e os corações removidos para avaliação dos pesos cardíacos e posterior análise histológica qualitativa do miocárdio. No coração dos animais tratados com L-NAME, a área média dos cardiomiócitos aumentou e também foram observadas áreas de lesões com magnitudes diferentes entre os animais.

A administração do atenolol ou do propranolol reduziu significativamente a hipertensão arterial, a hipertrofia do cardiomiócito e as lesões isquêmicas induzidas pelo tratamento crônico com L-NAME.

No grupo L-NAME, 33% de mortalidade (N=15) foi observada, enquanto que nos demais grupos, todos os animais sobreviveram.

Esses fatos nos sugerem que os bloqueadores β -adrenérgicos podem ser potencialmente benéficos no tratamento das desordens vasculares e cardíacas causadas pela deficiência crônica de NO.

Palavras-chave: propranolol, atenolol, infarto do miocárdio, hipertensão.

1. Introdução

Óxido nítrico - Considerações gerais

Até o início da década de 80, acreditava-se que o endotélio era responsável por funções meramente físicas, como a de constituir uma barreira seletivamente permeável entre os meios intra e extra-vascular e a de manter o padrão de fluxo sanguíneo laminar nos vasos. Atualmente, as células endoteliais deixaram de ser consideradas como simples revestimento dos vasos sanguíneos, podendo ser encaradas como um órgão parácrino e altamente ativo, revelando-se como verdadeiro sensor de alterações físico-químicas do meio circulante e modulador da reatividade vascular.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki, trabalhando com anéis e tiras de aorta isolados, relataram que a presença do endotélio era fundamental para o relaxamento da musculatura lisa arterial, ao demonstrarem que a acetilcolina não acarretava relaxamento em preparações vasculares nas quais o endotélio não se encontrava íntegro. A recuperação da resposta vasodilatadora à acetilcolina era possível quando tais preparações eram colocadas em contato com a camada íntima de uma artéria cujo endotélio encontrava-se preservado.

Finalmente, observou-se que o relaxamento induzido pela acetilcolina era bloqueado pela atropina, antagonista dos receptores muscarínicos.

A partir dessas observações, os autores propuseram que a acetilcolina, interagindo com receptores muscarínicos, localizados no endotélio, liberava um fator que foi denominado EDRF "endothelium-derived relaxing factor", o qual se difundia para o músculo liso vascular subjacente, promovendo relaxamento deste tecido. Mais tarde, este composto foi identificado química e farmacologicamente como sendo o óxido nítrico (NO) (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

As pesquisas direcionaram-se, então, no sentido de se determinar como o endotélio produzia este fator, e culminaram com a proposição de Palmer et al. (1988), que postularam que a L-arginina era o substrato, para a síntese de NO, em uma reação catalizada entre a NO sintase e o oxigênio molecular. A estas descobertas, seguiram-se outras, atribuindo-se ao endotélio a responsabilidade pela síntese de substâncias vasoativas, de substâncias moduladoras da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea, de fatores reguladores da trombogênese, da mitogênese e do metabolismo de lipoproteínas (Batlouni & Ramires, 1994).

Síntese de NO

O NO é sintetizado a partir de um átomo de nitrogênio do terminal guanidina da L-arginina, a qual é convertida em L-citrulina por ação da NO sintase (NOS) (Palmer et al., 1988), em reação dependente da presença

de diversos cofatores (NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopterina, calmodulina e heme) (Bredt & Snyder, 1990; Klatt et al., 1992).

O NO produzido age estimulando a guanilato ciclase solúvel nas células musculares lisas dos vasos, causando um aumento da concentração intracelular de 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), acarretando a redução do influxo de cálcio, por meio do sarcolema e da liberação do íon de seus depósitos intracelulares (Batlouni & Ramires, 1994).

Trabalhos mais recentes mostram que o NO pode ativar canais de potássio acionados por cálcio (Kca), por mecanismos dependentes ou independentes de GMP (Bolotina et al., 1994; Carrier et al, 1997). A conversão de L-arginina em NO pela NOS é específica visto que a D-arginina, enantiômero da L-arginina, não é substrato para esta reação.

Atualmente, três isoformas da NOS são conhecidas: tipo I (neuronal), tipo II (induzível) e tipo III (endotelial). Se por um lado isoformas I e III são constitutivas, ou seja, estão normalmente presentes e dependem do complexo cálcio/calmodulina para sua ativação, por outro lado, a isoforma II é induzível por ação de certas citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral e interferon- γ), bem como de lipopolissacarídeo bacteriano. Ao contrário das demais isoformas, a ativação desta isoformas independe da concentração de cálcio.

Funções do NO

No sistema cardiovascular, o NO é liberado do endotélio e atua so-

bre o músculo liso vascular, como um fator de relaxamento. É um vasodilatador fisiológico que influencia a resistência vascular periférica, controla o fluxo sanguíneo cerebral, pulmonar e coronariano e a pressão arterial.

Em plaquetas e leucócitos, o NO inibe a aderência e agregação das plaquetas, leucócitos, neutrófilos e monócitos. A elevada concentração de hemoglobina no sangue impede, provavelmente, que o NO derivado do endotélio afete a função plaquetária em condições normais (Palmer et al., 1987).

O NO atua também na defesa do hospedeiro e citotoxicidade. O NO reage com o O_2^- , produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) que pode destruir organismos invasores. Acredita-se que o $ONOO^-$ lesa o hospedeiro quando produzido em excesso (*in vitro*).

No sistema nervoso central, o NO atua como um neurotransmissor, e tem papel importante na plasticidade sináptica, assim como a memória, a visão e o apetite. Em produção excessiva, pode provocar distúrbios como acidente vascular cerebral isquêmico (Garthwaite, 1991).

Inibidores da síntese de NO

Substâncias análogas à L-arginina, como N^G -nitro-arginina (L-NAA) (Gross et al., 1990), N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Moore et al., 1989) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Mülsch & Busse, 1990), inibem especificamente a síntese de NO. Comparados aos demais inibidores, apenas o L-NMMA e o L-NAME são ativos por via oral (Gardiner et al., 1990).

A administração aguda destes inibidores promove aumento da resistência vascular sistêmica e conseqüente hipertensão arterial em ratos e cães (Gardiner et al., 1990; Zappellini et al., 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 antagonista de receptores AT₁ de angiotensina II (Ribeiro et al., 1992; Pollock et al., 1993; Moreno-Jr et al., 1995, 1996).

O sistema nervoso autônomo simpático parece estar envolvido nas alterações cardiovasculares produzidas pelo bloqueio crônico de NO. As concentrações de adrenalina e noradrenalina circulantes estão elevadas após cinco semanas de tratamento crônico com L-NAME, sugerindo que as mesmas estejam 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 do tônus simpático (Sakuma et al., 1992) em que se sugere 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 do sistema renina-angiotensina e sistema simpático tem sido usados para explicar as diferentes alterações fisiopatológicas presentes neste modelo.

Recentes estudos demonstraram que a administração oral de L-NAME, por 4-8 semanas, em ratos constitui um modelo de hipertensão arterial, acompanhada de lesões renais (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992). No coração, observa-se que a inibição crônica da síntese de NO, na dose de 20 mg/rato/dia, acarreta fibrose intersticial, necrose subendocárdica e discreta hipertrofia ventricular esquerda (Moreno et al., 1996).

Anti-hipertensivos

A normalização da elevação da pressão arterial pode ser alcançada com o uso de antihipertensivos, como bloqueadores de canais de cálcio, drogas simpatolíticas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de receptores AT₁ de angiotensina II e os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, comumente chamados de β -bloqueadores.

Os β -bloqueadores são uma importante categoria de drogas, capazes de bloquear a ação dos receptores β -adrenérgicos. Foram sintetizados em 1958, dez anos após Ahlquist ter postulado a existência dos receptores β -adrenérgicos, descoberta esta que é considerada a maior contribuição da atualidade para a terapêutica anti-hipertensiva.

Esse grupo compreende uma série de drogas, entre as quais o propranolol, pronetalol, timolol, pindolol, atenolol e outras. São prescritos aos pacientes com hipertensão arterial essencial, isquemias cardíacas, arritmias cardíacas e outras doenças cardiovasculares (Vaughan, 1989).

A administração de β -bloqueadores em pessoas idosas, durante e após o infarto do miocárdio, reduz o índice de mortalidade, de re-infartos (Aronow, 2000) e aumenta a sobrevida em pelo menos dois anos (Pritchard et al, 2000). Embora tais agentes sejam extensamente usados no tratamento de hipertensão, o mecanismo de ação dos anti-hipertensivos a longo prazo, ainda não está completamente compreendido.

Inicialmente, acreditou-se que a inibição da liberação de renina fosse um mecanismo importante para seu efeito hipotensor. Ao lado do seu efeito sobre a liberação de renina, os β -bloqueadores produzem uma redução na frequência e no débito cardíaco, uma outra explicação para o efeito anti-hipertensivo (Vallotton, 1987). No entanto, verificou-se posteriormente que nem todos os compostos do grupo são dotados da mesma capacidade de diminuir o débito cardíaco e a liberação de renina. Ainda

assim, a capacidade de redução da tensão arterial é similar, além disso, estudos clínicos mostraram que os beta-bloqueadores podem reduzir a pressão arterial, independentemente dos níveis de renina e débito cardíaco.

Propranolol

Em 1960, James Black sintetizou o propranolol e o introduziu na terapêutica da *angina pectoris* e arritmias cardíacas. Foi considerado na época como uma droga milagrosa no tratamento de doenças cardiovasculares. As pesquisas indicam ser o propranolol uma droga eficiente, segura (Conolly et al., 1976) e bem tolerada (Maia et al., 2001), que reduz a atividade simpática, minimizando o risco de arritmias ventriculares pós-infarto e fibrilação. Dessa forma, o propranolol diminui drasticamente a incidência de reinfarto e conseqüente morte súbita (Kendall MJ, 2000).

O propranolol provoca aumento significativo no potencial de ação cardíaca e diminui a velocidade no nódulo átrio-ventricular. Quando o tônus adrenérgico é mínimo, esses efeitos não se fazem presentes. Contudo, o efeito refratário do nódulo átrio-ventricular aumenta significativamente com o uso do propranolol, também bloqueia a rede de Purkinje (Zanini, 1994).

O propranolol reduz a taquicardia paroxística atrial, taquicardia sinusal persistente, extra-sístoles atriais persistentes e as manifestações de ansiedade como tremor. Também é muito bem aceito nos casos de car -

diopatias obstrutivas, síndrome do prolapso da válvula mitral e aneurismas.

O propranolol é absorvido por via oral e metabolizado rapidamente, (Wood et al., 1998), principalmente quando ingerido logo após uma refeição, pois atinge uma concentração plasmática mais elevada, provavelmente porque o alimento aumenta o fluxo sanguíneo esplâncnico.

Atenolol

O atenolol é um importante agente anti-hipertensivo que atua preferencialmente sobre os receptores cardíacos β_1 , embora também tenha afinidade pelos receptores vasculares periféricos ou bronquiais β_2 . Como sua cardioseletividade simpaticomimética não é absoluta, as doses elevadas de atenolol podem bloquear os receptores β_2 .

Depois de muitos anos de uso clínico, o atenolol está bem definido, sendo uma opção de tratamento para várias enfermidades cardiovasculares e tem sido associado com a redução da mortalidade em pacientes com hipertensão arterial, arritmias cardíacas e infarto do miocárdio.

As pesquisas indicam que o atenolol é eficiente na redução da hipertrofia ventricular esquerda, ocorridas e pacientes hipertensos (Dunn et al., 1987) e também nas isquemias miocárdicas (Wallace et al., 1998).

Absorvido por via oral, metaboliza-se minimamente (5%) no fígado, somente 50% da droga é biodisponível (Mason et al., 1979; Macainsh et al., 1979). Devido a sua hidrossolubilidade, o atenolol é eliminado na uri-

na, de forma inalterada.

Estudos comparativos tem demonstrado que o atenolol, quando administrado oralmente, reduz a pressão sangüínea com a mesma eficiência que outros antagonistas de receptores β -adrenérgico já citados (Wadworth et al., 1991), entre eles, o propranolol.

Objetivos

Considerando-se que a inibição crônica da síntese de NO em ratos é um modelo experimental de hipertensão arterial acompanhada de isquemia miocárdica, nosso objetivo foi avaliar a ação do propranolol e do atenolol sobre a hipertensão arterial, as estruturas morfológicas do miocárdio (ventrículo esquerdo) e sobre as lesões isquêmicas em ratos, submetidos ao tratamento crônico com L-NAME, por oito semanas.

2. Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar fornecidos pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Estadual de Campinas, com peso inicial de 150g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) e alimentados com ração padrão.

Protocolo Experimental

Para esse estudo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n =15 cada):

- 1- Controle - animais não tratados;
- 2- L-NAME - animais que receberam L-NAME na dose de 20 mg/ rato/dia;
- 3- L-NAME+propranolol - animais que receberam L-NAME e propranolol (30 mg/ rato/ dia);
- 4- L-NAME+atenolol - animais que receberam L-NAME e atenolol (30 mg/rato/dia);
- 5- Propranolol - animais que receberam apenas propranolol;
- 6- Atenolol - animais que receberam apenas atenolol.

Todas as drogas foram dissolvidas em água e ministradas diariamente aos animais, nas doses acima citadas.

Avaliação da pressão arterial caudal e do peso corpóreo

A pressão arterial da cauda foi avaliada de acordo com o método descrito por Zatz (1990). Para tanto, os animais foram acondicionados, por 15 minutos, em uma gaiola tendo o fundo em vidro fosco e iluminado por uma lâmpada de cinco watts, para que fossem pré-aquecidos a fim de se promover dilatação da artéria caudal. Em seguida, os animais foram colocados em uma caixa de contenção e um manguito foi posicionado em torno da cauda do animal. Esse manguito foi conectado a um microfone (sensor) que, por sua vez, foi acoplado ao osciloscópio (CS-405, Kenwood, Japão). A medida da pressão arterial foi realizada no mínimo em duplicata para cada animal.

Paralelamente, avaliou-se o peso corpóreo dos animais. Essas avaliações (pressão arterial e peso corpóreo) foram realizadas antes do início dos experimentos e no decorrer do tratamento, semanalmente, durante oito semanas.

Avaliação dos pesos cardíacos

Ao final de oito semanas, os animais foram anestesiados profunda-

mente com pentobarbital sódico (Sagatal[®], 30 mg/kg, i.p). Após a morte dos animais, os corações foram retirado e lavados com solução salina (cloreto de sódio dissolvido em água na concentração de 0,9%, p/v) para remoção de coágulos e imersos em formalina a 10% por 24 horas. Em seguida, os corações foram dissecados, os átrios removidos e os ventrículos pesados, obtendo-se dessa forma o peso cardíaco total (PTC, mg).

Após a retirada do ventrículo direito, o tecido remanescente foi pesado e obteve-se o peso ventricular esquerdo (PVE, mg). Esses valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido na última semana e, dessa forma, foram finalmente expressos como: peso cardíaco relativo ($PCR = PCT/\text{peso corpóreo}$, mg/g) e índice do peso ventricular esquerdo ($IPVE = PVE/\text{peso corpóreo}$, mg/g).

Métodos histológicos qualitativos e quantitativos

Procedimentos gerais para microscopia de luz

Após a morte do animal, o coração foi dissecado, lavado em solução salina 0,9% p/v e colocado em formalina a 10% v/v por 24 horas. Depois da fixação e da remoção dos átrios e do ventrículo direito, o ventrículo esquerdo e o septo interventricular foram cortados perpendicularmente no sentido do maior eixo do órgão, em cinco fragmentos. A seguir, os fragmentos sofreram processamento histológico de rotina (Junqueira & Carneiro, 1999), senão vejamos: a) desidratação com álcool etílico de con-

centrações crescentes, começando com o álcool 70% e terminando com álcool absoluto; b) diafanização em xilol; c) Impregnação pela parafina fundida; d) inclusão da peça em um molde retangular contendo a parafina fundida. Os cortes histológicos de cinco μm de espessura foram submetidos à coloração pelo hemalume-eosina e pelo tricrômico de Masson (Michalany, 1980).

A montagem dos cortes em cada lâmina foi feita da seguinte maneira: escolheu-se o primeiro corte da fita de parafina, os cinco cortes subsequentes foram desprezados e o sétimo foi montado — assim sucessivamente, até serem obtidos cinco cortes por bloco. O objetivo dessa montagem foi conseguir imagens microscópicas diferentes entre si para as avaliações morfométricas (Delesse, 1848; Aherne, 1970).

Análise histológica qualitativa (estereologia)

A análise histológica qualitativa do miocárdio (ventrículo esquerdo e septo interventricular) dos animais dos diferentes grupos visa a detectar alterações decorrentes dos diferentes procedimentos experimentais. Essas alterações estão relacionadas ao aparecimento de fibrose intersticial, fibrose perivascular e áreas de fibrose reparativa representadas por cicatrizes microscópicas que se seguem à morte dos cardiomiócitos.

Avaliação histológica quantitativa (estereológica) dos cardiomiócitos

Na determinação dos parâmetros quantitativos relacionados aos cardiomiócitos, tais como área média da célula (A_{cel}), esse parâmetro mede a ocupação da área-teste pela área das imagens da estrutura que estamos avaliando, densidade de volume (V_v), tem interpretação semelhante à área média da célula e densidade de área (S_v) que avalia a relação entre a área e o volume de estruturas morfológicas, utilizou-se um sistema-teste, no caso, uma ocular da Zeiss Kpl 8x, com retículo de 100 pontos (exibindo 10 linhas paralelas, em uma área quadrangular) e uma objetiva de 100x.

Numa alíquota do órgão (20 campos microscópicos, tomados ao acaso), foi contado o número de pontos que caía sobre os cardiomiócitos, bem como o número de intersecções que os cardiomiócitos faziam com as linhas desse sistema-teste. Além disso, contou-se, ainda, o número de perfis dos cardiomiócitos contidos numa determinada área (A_T), no caso, a área dada pelo sistema-teste que é igual $17.424 \mu\text{m}^2$ referentes a um campo microscópico.

Área teste (A_T)

Na determinação da área teste (A_T), mediu-se o comprimento (l) de

um dos lados do quadrado, utilizando-se uma ocular com uma escala graduada.

Após essa medição, procedeu-se a calibração da escala da ocular com uma lâmina especial da Zeiss, provida de divisões de 0,01 mm (10 μm), visando a transformar as unidades da escala da ocular em micrômetros (μm).

Foi possível realizar o cálculo do parâmetro discriminado, a partir da aplicação da fórmula:

$$A_T = (l)^2 \Rightarrow A_T = (132)^2 \Rightarrow A_T = 17.424 \mu\text{m}^2$$

A_T = área teste

l = 132 μm

Densidade de volume (V_v)

Para a determinação do V_v (fração de volume ou volume relativo), utilizou-se o mesmo sistema-teste descrito anteriormente, contando-se os pontos que caíam sobre os cardiomiócitos.

A fórmula usada para se determinar o V_v , foi a seguinte (Aherne, 1970):

$$V_v = \frac{p}{P_T}$$

sendo, que:

p = pontos que caem sobre os cardiomiócitos

P_T = número total de pontos do sistema teste que caem sobre o coração nos 20 campos microscópicos.

Número de perfis de cardiomiócitos (Q_A)

O número de perfis de cardiomiócitos (Q_A) foi avaliado, contando-se o número de imagens dos cardiomiócitos que figuraram em uma determinada área teste (no caso, a área teste de 20 campos microscópicos).

Área média do cardiomiócito (A_{cel})

Na determinação da área média do cardiomiócito (A_{cel}), é necessário conhecer-se previamente os valores de A_T , V_v e Q_A .

Após a obtenção dos parâmetros acima mencionados, pode-se conhecer o valor da área média do cardiomiócito, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$A_{cel} = \frac{V_v}{\frac{Q_A}{A_T}} \Rightarrow \frac{\frac{p}{P_T}}{\frac{Q_A}{A_T}}$$

em que:

V_v = densidade de volume dos cardiomiócitos

Q_A = número de perfis de cardiomiócitos na área teste

A_T = área teste

O valor da A_{cel} é expresso em μm^2 .

Densidade de área dos cardiomiócitos (S_v)

Na avaliação do S_v (densidade de área dos cardiomiócitos), utilizou-se o mesmo sistema-teste, contando-se, agora, o número de intersecções (I) que os cardiomiócitos fazem com as linhas desse sistema .

No cálculo desse parâmetro, usou-se a fórmula abaixo:

$$S_v = \frac{2I}{L_T}$$

sendo:

I = intersecções dos cardiomiócitos com a linha-teste

L_T = comprimento total das linha-teste (no caso, 10 x 132, pois o sistema contém 10 linhas que medem 132 μm de comprimento)

$L_T = 10 \times 132 \Rightarrow L_T = 1320 \mu m$

Avaliação histológica quantitativa (estereológica) dos vasos da microcirculação

Na avaliação dos parâmetros relativos à microcirculação, que com-

preende as arteríolas, vênulas e capilares sangüíneos, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para os cardiomiócitos. Assim, nos mesmos campos microscópicos, contou-se não somente o número de perfis (Q_A) dos vasos da microcirculação, que representa a quantidade de imagens que estamos analisando, como também o número de pontos que caíam sobre esses vasos e o número de intersecções desses vasos com as linhas do sistema-teste.

Densidade de volume dos vasos da microcirculação (V_v)

Para a determinação da densidade de volume dos vasos da microcirculação (V_v), contaram-se os pontos que caíam sobre os vasos (arteríolas, vênulas e capilares), e usou-se a fórmula abaixo:

$$V_v = \frac{p}{P_T}$$

em que:

p = pontos que caíram sobre as arteríolas, vênulas e capilares

P_T = número total de pontos do sistema teste nos campos contado

Número de perfis (Q_A)

Para cada um dos 20 campos microscópicos, foram contados o nú-

mero de perfis (imagens) dos vasos da microcirculação que se encontravam numa determinada área-teste.

Q_A = número de imagens de arteríolas, vênulas e capilares

Densidade de área ocupada pelos vasos da microcirculação (S_v)

Para a quantificação da densidade de área ocupada pelos vasos da microcirculação (S_v), esse parâmetro é muito importante pois avalia a relação entre a área e o volume de estruturas morfológicas, utilizou-se o mesmo sistema-teste de 100 pontos e contaram-se as intersecções dos vasos com as linhas-teste (I).

Como o valor do comprimento total da linha-teste (L_T) já era conhecido, (multiplicação do número de pontos de um dos lados do quadrado, pelo comprimento da linha teste), $L_T = 10 \times 132 \Rightarrow L_T = 1320$, aplicou-se a fórmula para a determinação de S_v :

$$S_v = \frac{2I}{L_T}$$

em que:

I = intersecções dos vasos com a linha-teste

L_T = comprimento total da linha-teste

Densidade do comprimento dos vasos da microcirculação (L_v)

Para a determinação do comprimento dos vasos da microcirculação (L_v), utilizaram-se dados já conhecidos, aplicando-os na seguinte fórmula :

$$L_v = \frac{2 \times Q_A}{A_T}$$

em que,

Q_A = número de perfis dos vasos da microcirculação (arteríolas, vênulas e capilares) na área teste

A_T = área teste

Áreas de lesão

Este parâmetro quantitativo tem por objetivo determinar o grau de fibrose e, portanto, a magnitude das lesões miocárdicas.

As áreas de lesão do miocárdio foram avaliadas pela contagem de pontos (Weibel, 1979), utilizando-se um sistema-teste, no caso, uma ocular Zeiss Kpl (Komper plans) 8x, com retículo de integração de 100 pontos, exibindo 10 linhas paralelas, em uma área quadrangular e uma objetiva de 40 x. Em uma alíquota do órgão (20 campos microscópicos), dos diferentes grupos experimentais, foi contado o número de pontos que caíram sobre o tecido conjuntivo de sustentação e no tecido conjuntivo perivascular

nos grupos controle, propranolol e atenolol, pois nesses grupos experimentais não existiam áreas de lesão.

Já nos grupos experimentais L-NAME, L-NAME+propranolol e L-NAME + atenolol, foram contados os pontos que caíram no tecido conjuntivo de sustentação, no tecido perivascular, nas áreas de fibrose reparadora (áreas advindas, importantes na morte dos cardiomiócitos) e nas áreas de fibrose intersticial. Tais pontos foram computados e utilizados na fórmula abaixo, indicando que a Área de lesão (A) foi expressa em micrômetros (μm).

O intervalo entre as linhas do sistema-teste (d =distância entre as linhas) é o ponto de referência para calibrar o sistema e também para determinar a área do ponto teste. Em sistema-teste de padrão quadrático, a área do ponto teste é d^2 e a área é determinada pela fórmula:

$$A = (A_p) \sum P_T$$

sendo que:

A_p = pontos que caíram sobre as áreas de lesão

P_T = número total de pontos do sistema-teste nos 20 campos contados

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi aplicada para avaliar as diferenças no peso corporal e na pressão arterial da cauda, e ANOVA de uma via foi usada para comparar os pesos cardíacos. Quando os resultados da ANOVA foram significantes, o teste de Bonferroni foi aplicado.

Nos estudos estereológicos, ANOVA foi seguida pelo teste de Tukey. Em todos os casos, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias.

Procedência dos reagentes

N^G-nitro L-arginina metil éster foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O propranolol e atenolol foram cedidos gentilmente pela Biosintética (São Paulo, Brasil). O pentobarbital sódico (Sagatal[®]) foi fornecido pela Rhône-Merieux (França). A formalina fornecida por Lafan química fina Ltda (São Paulo, Brasil). Hemalume/Eosina e Tricrômico de Masson fornecidos pela Merck (São Paulo, Brasil).

3. Resultados

Peso corpóreo

Observamos que os animais dos grupos L-NAME, L-NAME + Propranolol e L-NAME + Atenolol apresentaram um ganho de peso significativamente menor em relação aos animais do grupo controle e dos demais grupos estudados (Tabela 1).

Pressão arterial da cauda

Na primeira semana de tratamento, podemos observar que o L-NAME elevou significativamente a pressão arterial. Os valores máximos de pressão arterial foram alcançados a partir da segunda semana de tratamento com L-NAME, após o qual se mantiveram marcadamente elevados.

Quando o propranolol ou atenolol foi associado ao L-NAME, a pressão arterial sofreu uma redução marcante, embora significativamente maior que a do grupo controle. Os animais tratados com propranolol ou atenolol individualmente mantiveram a pressão arterial em níveis normais (Figura 1).

Tabela 1. Evolução do peso corpóreo dos animais (g) dos diferentes grupos experimentais durante as oito semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média do peso corpóreo \pm EPM. * $p < 0.05$ são significativos, em relação ao grupo controle.

Grupos	Basal	Sem.1	Sem.2	Sem.3	Sem.4	Sem.5	Sem.6	Sem7	Sem.8
Controle	154 \pm 3	223 \pm 6	243 \pm 6	249 \pm 6	258 \pm 6	269 \pm 6	305 \pm 10	326 \pm 11	346 \pm 14
L-NAME	160 \pm 3	204 \pm 6*	213 \pm 6*	206 \pm 10*	211 \pm 13*	226 \pm 14*	257 \pm 12*	276 \pm 11*	290 \pm 13*
L-NAME + Proprano- lol	159 \pm 4	178 \pm 7*	201 \pm 6*	228 \pm 4*	241 \pm 5*	253 \pm 5*	269.4 \pm 6*	284 \pm 7*	309 \pm 8*
L-NAME + Atenolol	157 \pm 4	200 \pm 7*	207 \pm 8*	219 \pm 8*	229 \pm 9*	241 \pm 5*	265 \pm 9*	277 \pm 9*	293 \pm 9*
Proprano- lol	163 \pm 4	222 \pm 6	229 \pm 4	238 \pm 4	249 \pm 5	260 \pm 5	307 \pm 8	322 \pm 8	330 \pm 6
Atenolol	153 \pm 4	203 \pm 4	220 \pm 5	232 \pm 6	248 \pm 6	263 \pm 5	274 \pm 13	290 \pm 14	326 \pm 10

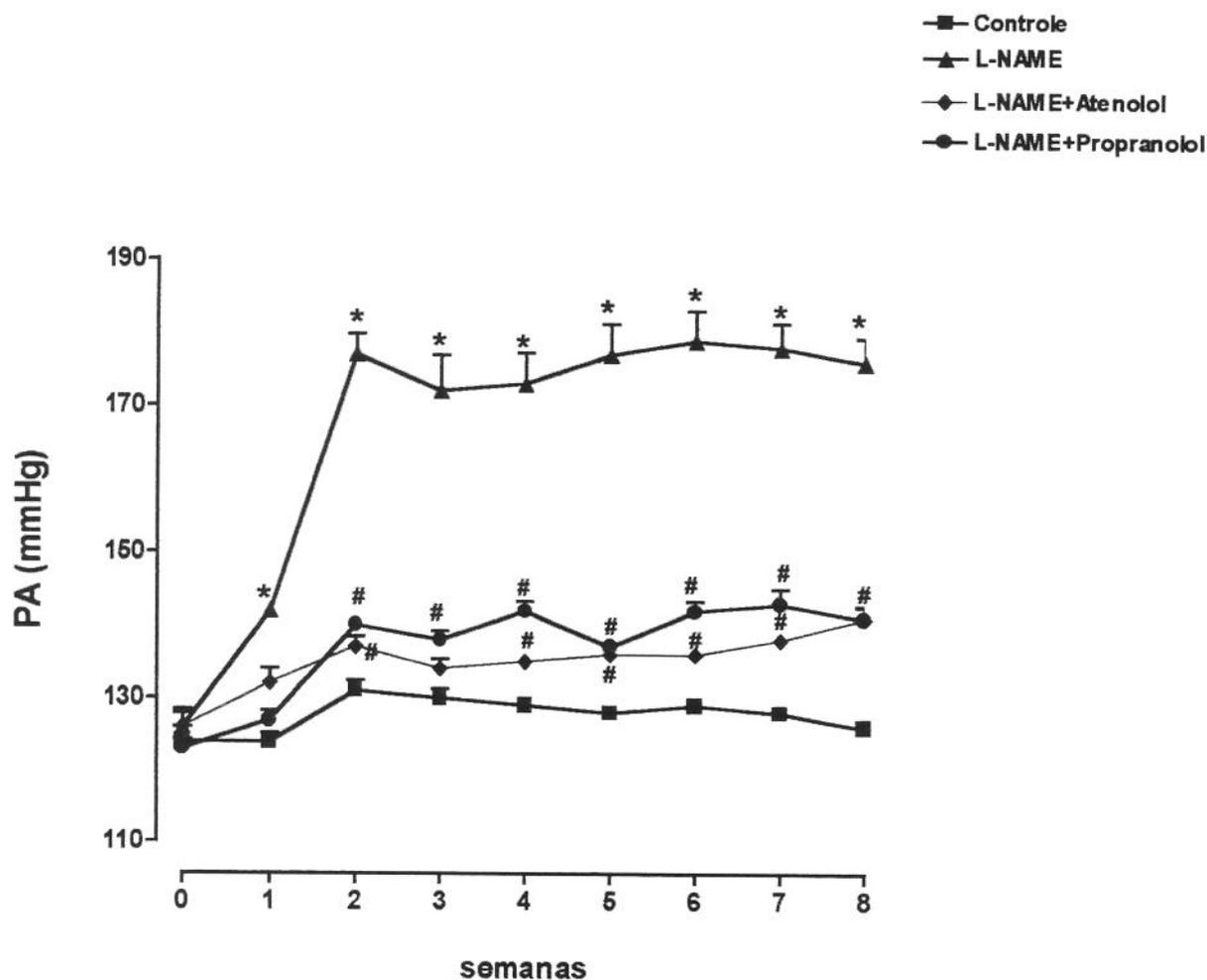


Figura 1. Hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com L-NAME, administrado na dose de 20 mg/rato/dia, por oito semanas: efeito do propranolol e atenolol, ambos administrados na dose de 30 mg/rato/ dia. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.001$ L-NAME versus controle, L-NAME + propranolol, L-NAME+ atenolol. # $p < 0.05$ L-NAME + propranolol e L-NAME + atenolol versus controle

Pesos cardíacos

Índice do peso cardíaco (IPC) e índice do peso ventricular esquerdo (IPVE)

Os animais do grupo L-NAME apresentaram uma pequena elevação, porém significativa, no IPC (Figura 2) e no IPVE esquerdo (Figura 3), sendo este aumento parcialmente prevenido pelo atenolol e propranolol. Os animais tratados apenas com esses dois β -bloqueadores não apresentaram modificações significativas dos IPC e IPVE, quando comparados aos do grupo controle.

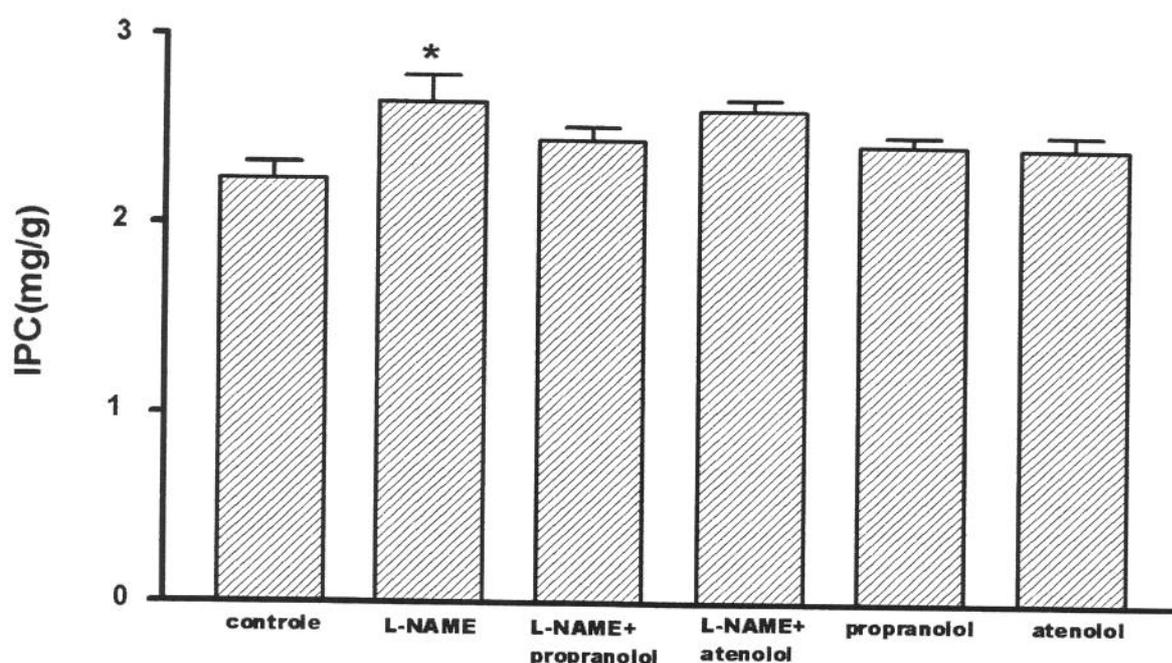


Figura 2. Índice do peso cardíaco (IPC) dos corações dos animais controle e tratados com L-NAME, L-NAME+propranolol, L-NAME+atenolol, propranolol e atenolol. Os valores são expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM). * $p < 0.05$ L-NAME *versus* controle

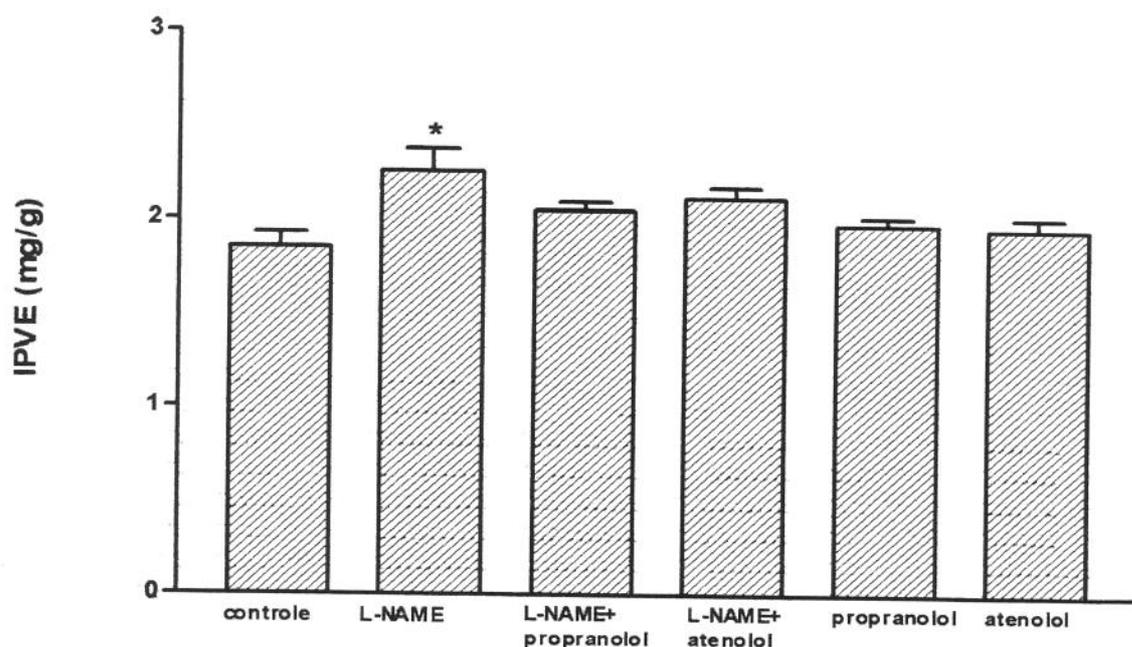


Figura 3 - Índice do peso ventricular esquerdo (IPVE) dos ventrículos esquerdo nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. Os valores são expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM). * $p < 0.05$ L-NAME *versus* controle

Resultados qualitativos

Grupo Controle

Neste grupo, a aparência histológica do miocárdio mostrou-se normal, conforme descrito a seguir. O estroma conjuntivo distribui-se, formando o perímio que envolve grupos de cardiomiócitos, e o endomísio que se dispõe em torno de cada fibra cardíaca. Os cardiomiócitos, por sua vez, são células alongadas e ramificadas, que se unem umas às outras

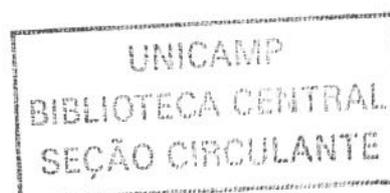
por intermédio dos discos intercalares. As fibras cardíacas apresentam estriações transversais e 1 ou 2 núcleos alongados localizados no centro da fibra (Figura 4).

Grupo L-NAME

A análise histológica qualitativa mostrou que a maioria dos animais do grupo L-NAME apresentou focos de fibrose cicatricial bem estabelecidos; essas cicatrizes microscópicas representam a substituição das fibras cardíacas necróticas derivadas de infartos mais antigos, sendo que o número e o tamanho desses focos variaram de animal para animal dentro do grupo. Além disso, nesse grupo, alguns animais exibiram áreas de tecido de granulação compatíveis com infartos mais recentes. Nestas áreas de cicatrização recente observaram-se muitos capilares, macrófagos e fibroblastos; a colagenização foi discreta (Figuras: 5, 6, 7, 8).

Grupos L-NAME + Propranolol e L-NAME + Atenolol

As alterações histológicas encontradas no miocárdio dos animais destes dois grupos são semelhantes às daquelas do grupo L-NAME. No entanto, avaliando-se qualitativamente as áreas de lesão nestes dois grupos, mostraram-se em número menor e menos extensas, quando comparadas às do grupo L-NAME (Figuras 9, 10, 11, 12).



Grupos Propranolol e Atenolol

Nestes grupos, a aparência histológica do miocárdio seguiu o padrão daquela encontrada no grupo controle, não se observando, portanto, nenhuma lesão (Figuras 13 e 14).

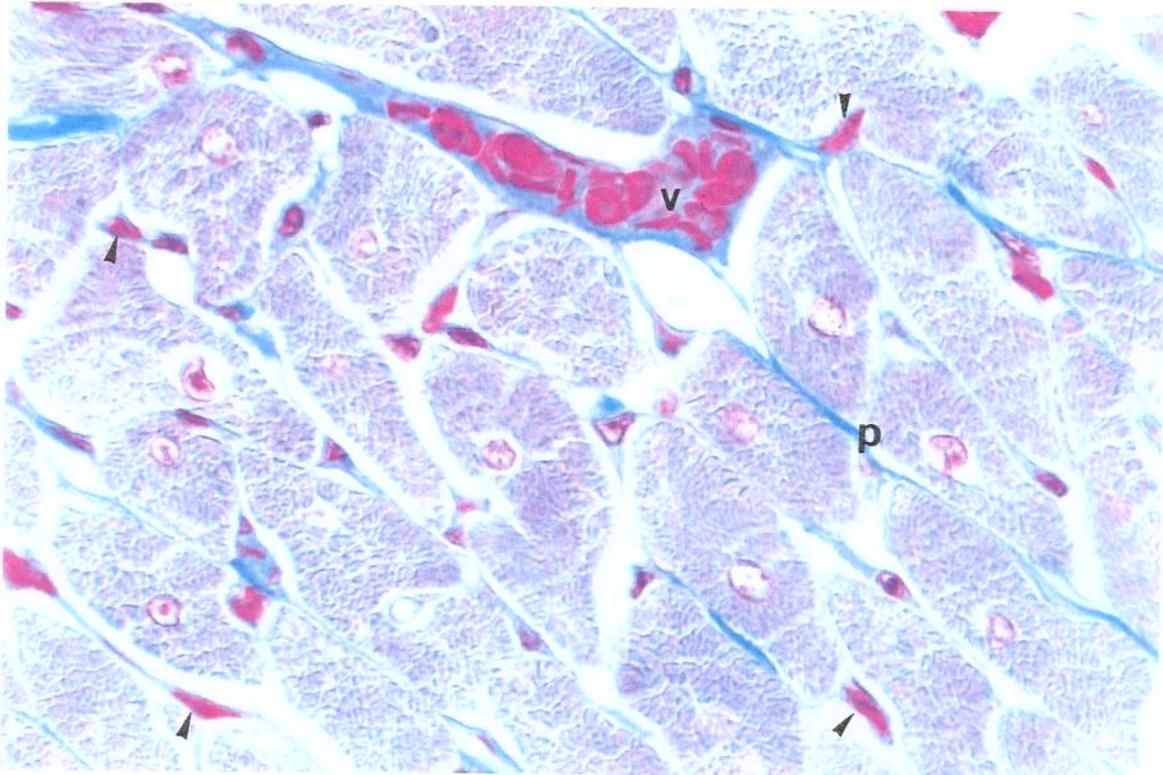


Figura 4 - Fotomicrografia de lâmina do coração (ventrículo esquerdo) de um dos animais do grupo controle. A aparência histológica miocárdica mostra-se normal. Notar o perímio (P) que envolve grupos de cardiomiócitos (m) que aparecem cortados transversal ou obliquamente; em alguns cardiomiócitos o plano de corte passou pelo núcleo que é claro, de cromatina frouxa e nucléolo, às vezes, evidente; o pontilhado do citoplasma dos cardiomiócitos corresponde aos cortes transversais das miofibrilas. Notar uma vênula (v) cuja luz mostra-se repleta de hemácias e os capilares sangüíneos (cabeça de seta) entremeados entre as fibras cardíacas. *Tricrômico de Masson. 1024 x*

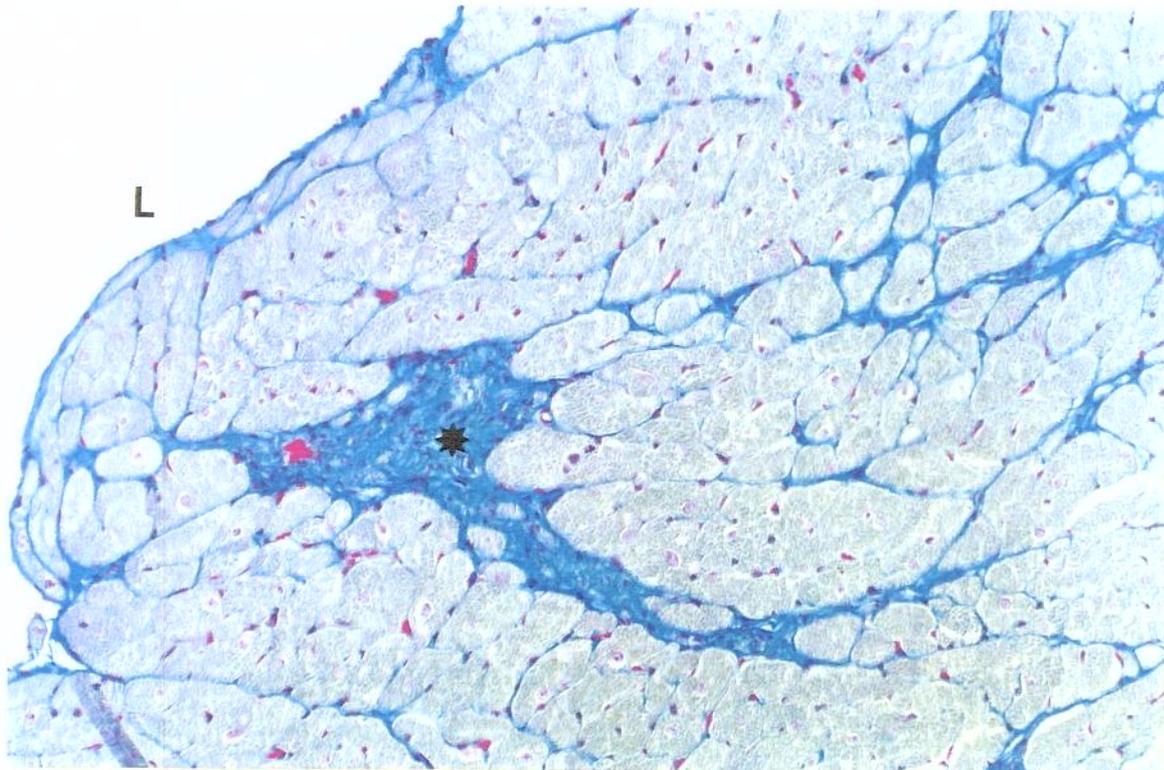


Figura 5 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo tratado com L-NAME. Observar área de fibrose reparativa (*) entre as fibras miocárdicas; ela representa uma área de micro-infarto onde ocorreram necrose de cardiomiócitos e substituição dos mesmos por tecido conjuntivo cicatricial. Notar que essa área cicatricial possui poucas células e um predomínio de fibras colágenas, indicando tratar-se, portanto, de um infarto antigo. No quadrante superior direito, observar áreas de fibrose intersticial (tecido conjuntivo anormalmente aumentado ao redor dos cardiomiócitos) Luz ventricular (L) à esquerda. *Tricrômico de Masson. 256 x*

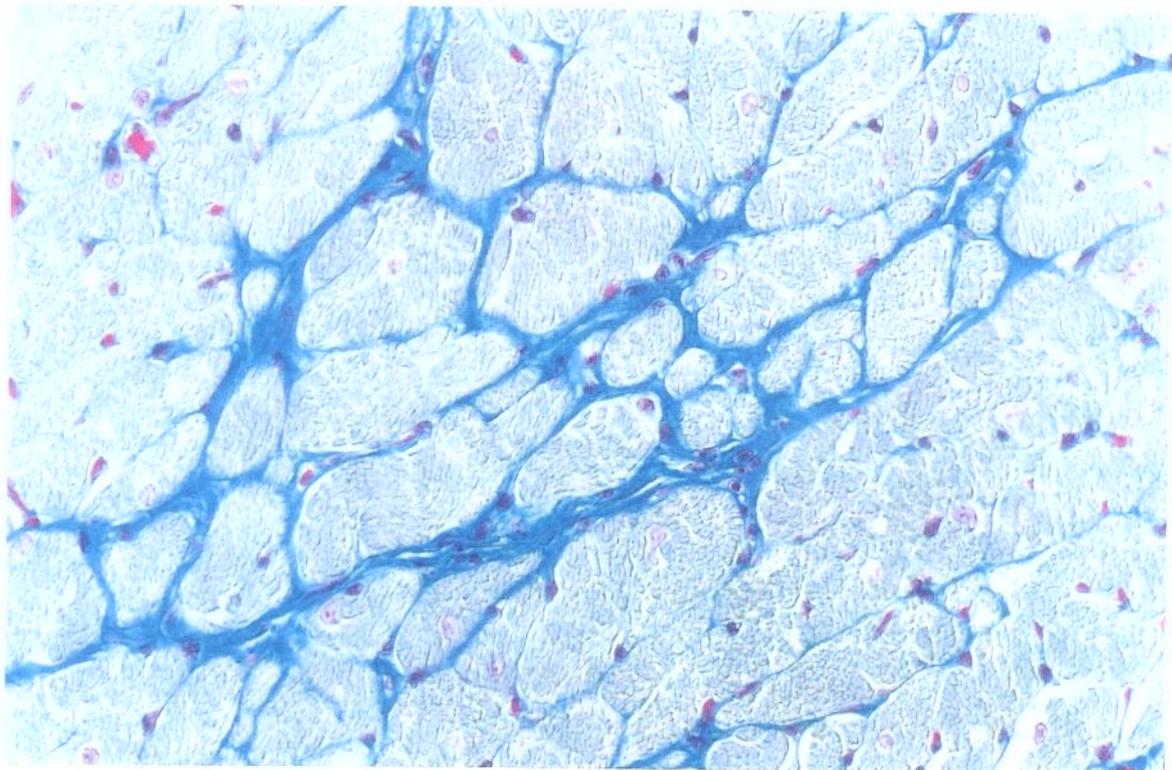


Figura 6 - Grupo L-NAME : A figura mostra, em detalhe, uma área de fibrose intersticial, definida pelo aumento da quantidade de tecido conjuntivo ao redor dos cardiomiócitos. *Tricrômico de Masson. 512x*

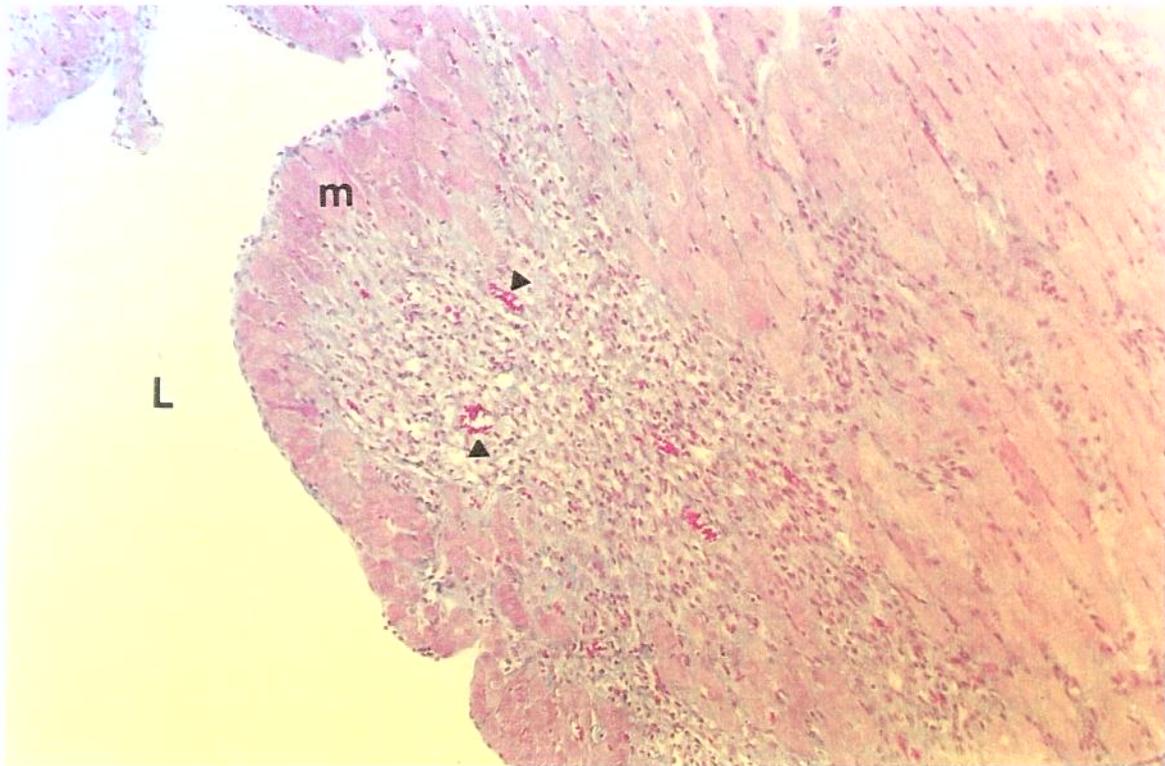


Figura 7 - Grupo L-NAME : Esta figura representa uma área de infarto subendocárdico recente (cerca de 1-2 semanas de duração). Notar cardiomiócitos normais (m) junto da luz ventricular (L), logo abaixo deles se observa uma área extensa com muitas células do conjuntivo, pequenos vasos (cabeça de seta) e uma colagenização incipiente caracterizando, assim, um tecido de granulação (fase inicial do processo de cicatrização). *Tricrômico de Masson. 128x*

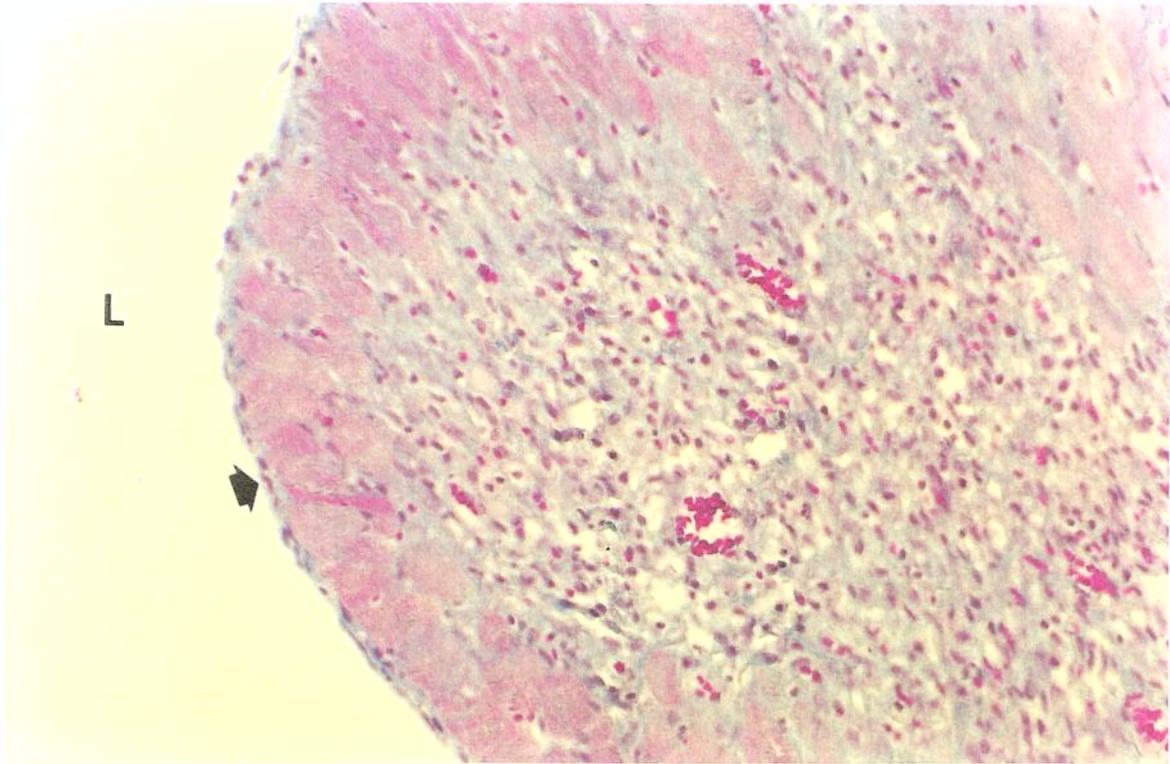


Figura 8 - Grupo L-NAME : Área de infarto subendocárdico recente. Notar o endotélio (seta) revestindo a luz ventricular (L). Abaixo notar extensa área de tecido de granulação, indicando que houve necrose dos cardiomiócitos e sua substituição por tecido conjuntivo de reparação (fibrose cicatricial ou reparativa). *Tricrômico de Masson. 256x*

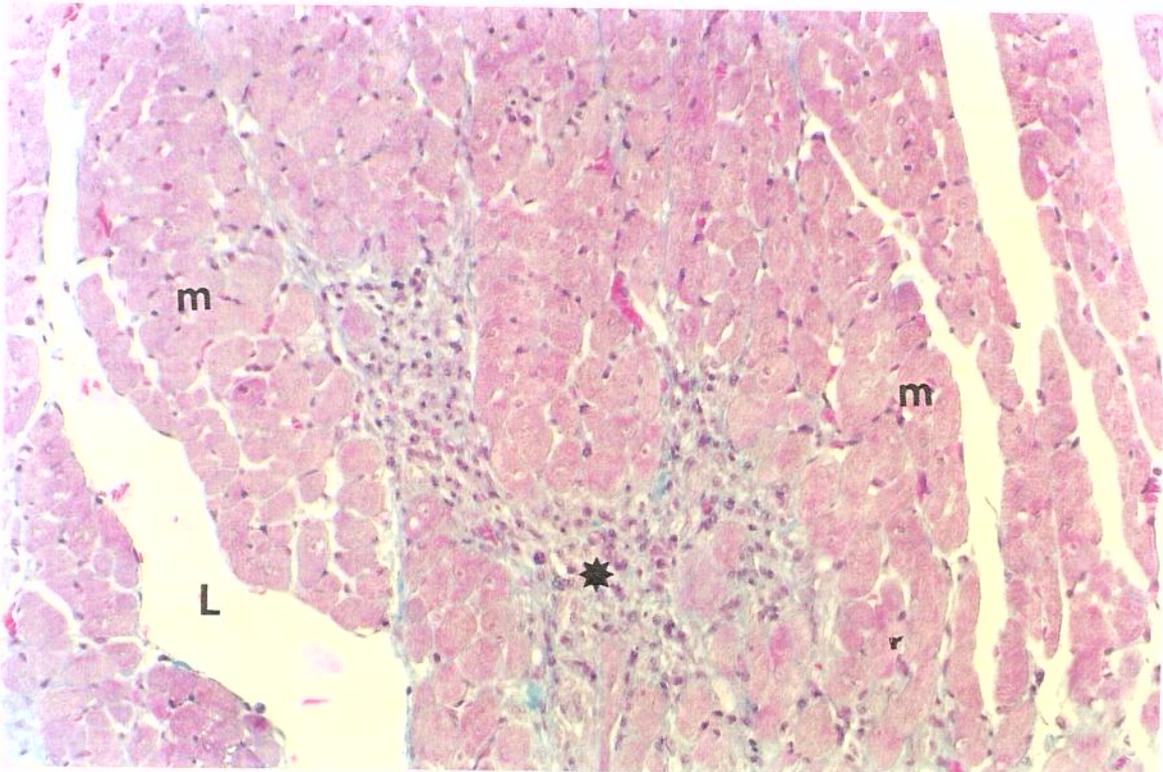


Figura 9 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo que recebeu concomitantemente L-NAME+propranolol. A aparência histológica miocárdica mostra áreas de lesão menores e menos extensas, quando comparadas aos do grupo L-NAME. Nota-se área de micro-infarto subendocárdico recente. Nesta figura pode-se notar uma pequena área de fibrose cicatricial recente (*), caracterizada pela presença de poucas fibras colágenas e muitas células do conjuntivo. Observar cardiomiócitos normais (m) em corte transversal e a luz ventricular (L). *Tricrômico de Masson. 256x*

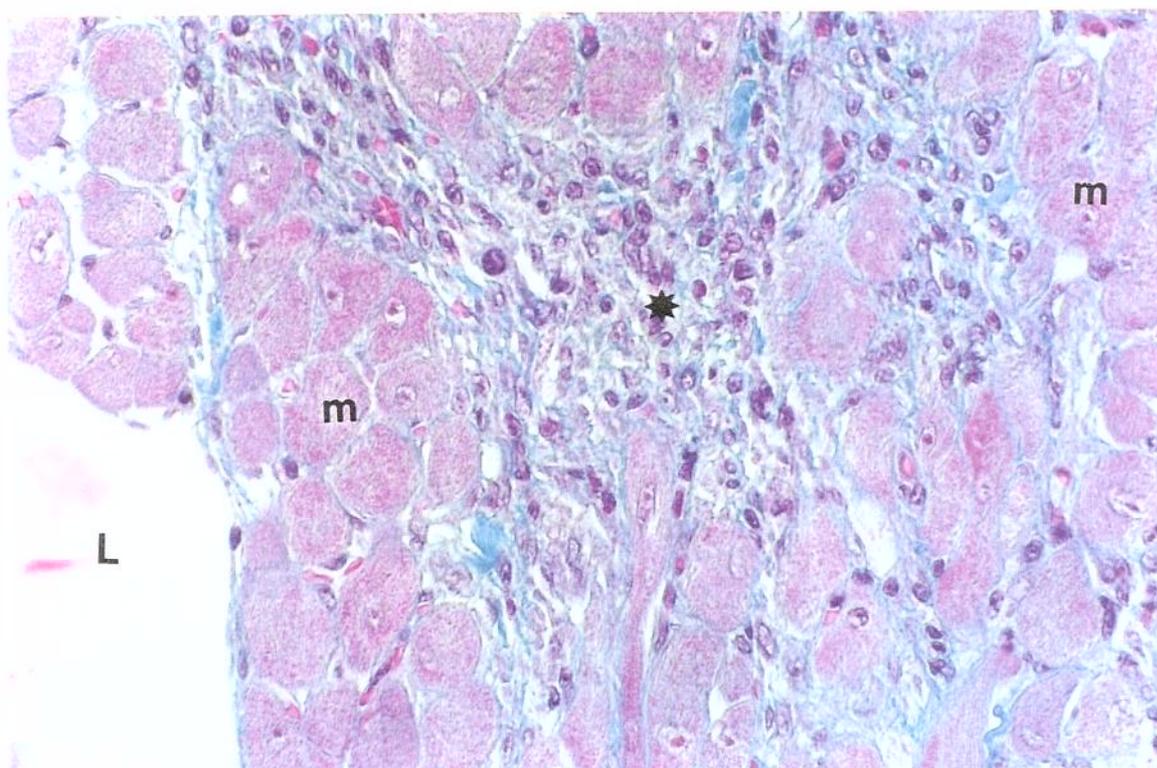


Figura 10 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo que recebeu concomitantemente L-NAME+propranolol. Área de micro-infarto subendocárdico recente. Nesta figura pode-se notar mais detalhadamente, a área de fibrose cicatricial (*), o endotélio (seta) revestindo a luz ventricular (L) e os cardiomiócitos normais (m) em corte transversal.

Tricrômico de Masson. 512x

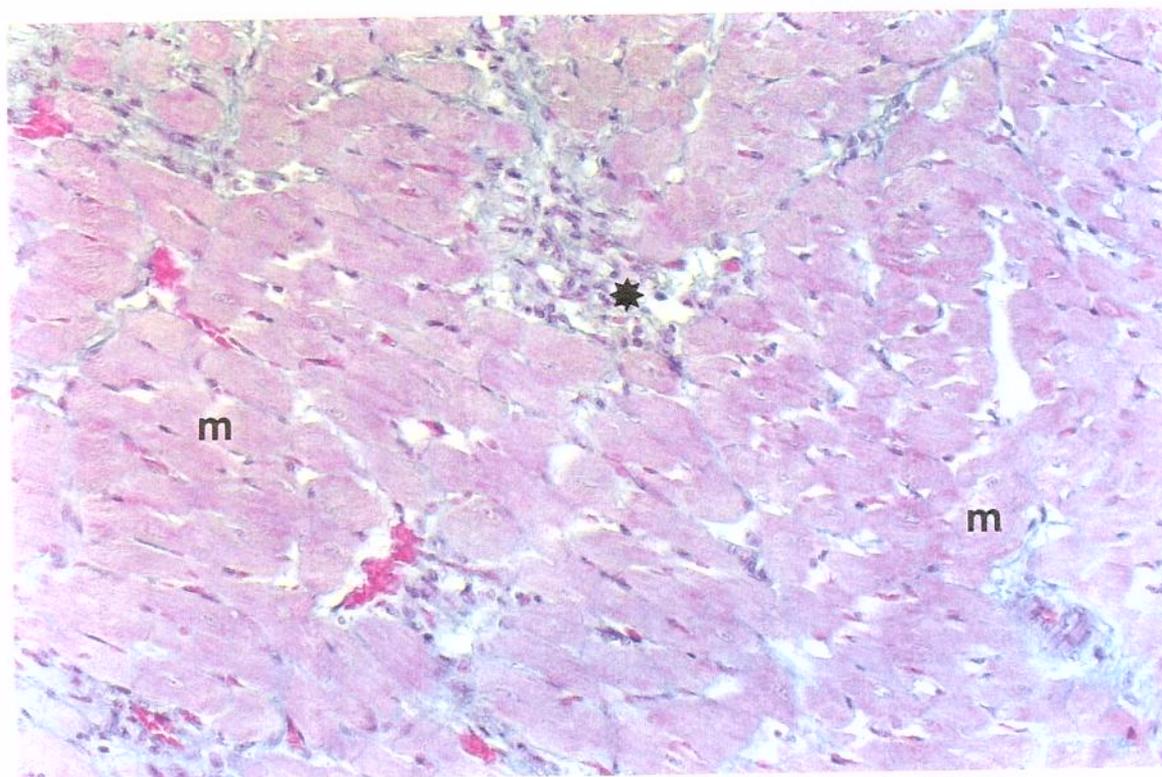


Figura 11 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo que recebeu concomitantemente L-NAME+ atenolol. Nesta figura pode-se notar uma pequena área de fibrose cicatricial (*) entre os cardiomiócitos (m) que aparecem cortados oblíqua e longitudinalmente..

Tricrômico de Masson. 256x

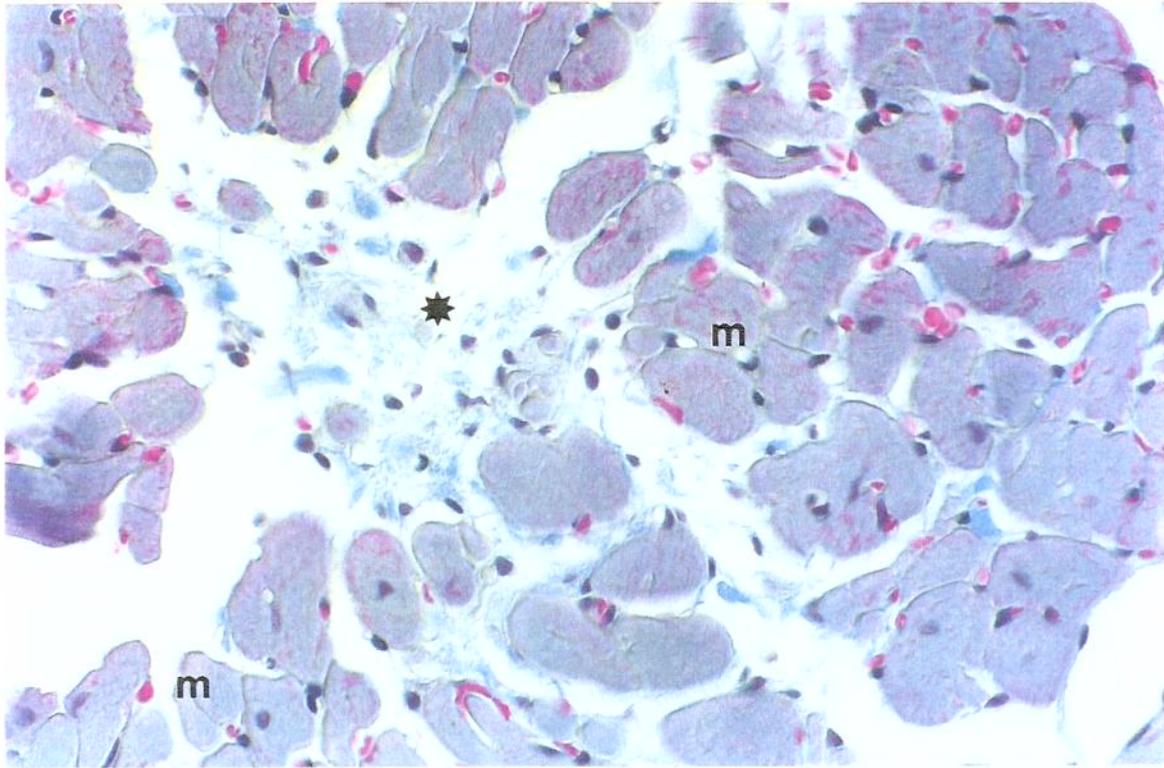


Figura 12 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo que recebeu concomitantemente L-NAME+ atenolol. A aparência histológica miocárdica mostra áreas de lesão menores e menos extensas, quando comparadas aos do grupo L-NAME. Nesta figura pode-se notar uma pequena área de fibrose cicatricial recente (*) entre os cardiomiócitos normais (m) que aparecem cortados transversalmente. *Tricrômico de Masson. 512x*

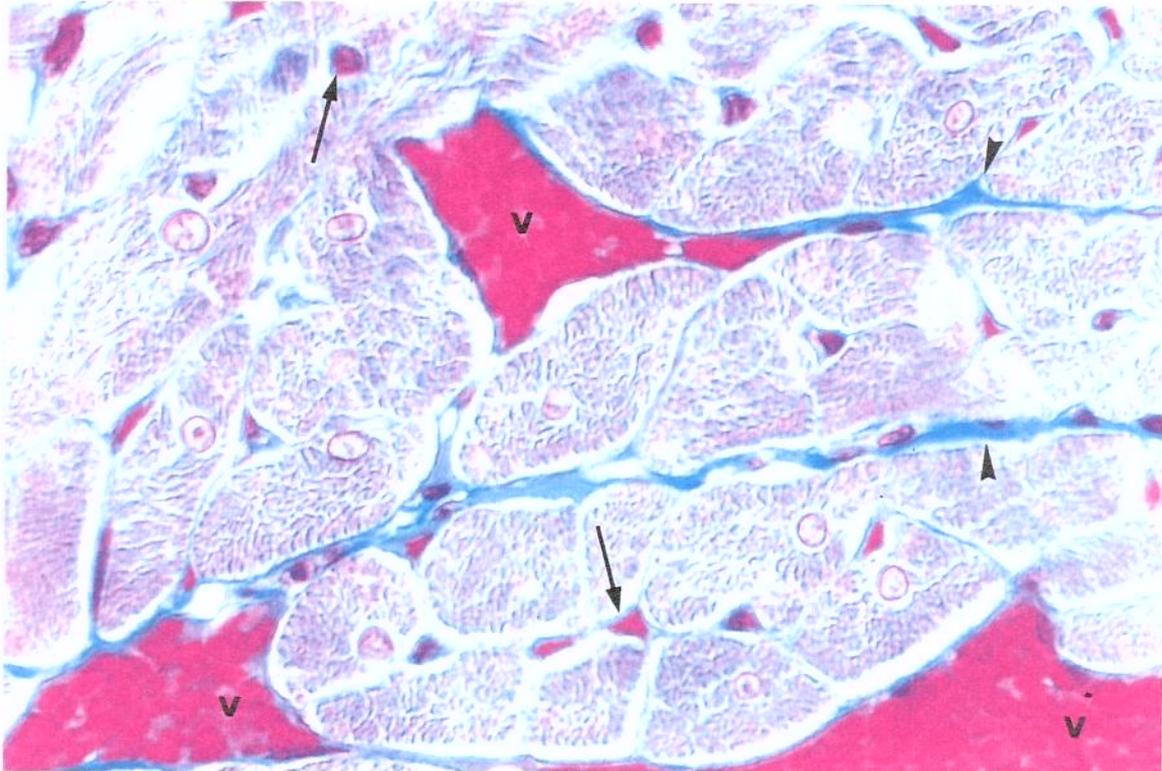


Figura 13 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo propranolol. A aparência histológica miocárdica mostra-se normal como a do grupo controle. Observam-se cardiomiócitos em corte transversal e oblíquo; notam-se, ainda, vênulas (v) com luz repleta de hemácias, capilares sangüíneos entre os cardiomiócitos (setas) e o perimísio (cabeça de setas) que envolve o grupo de cardiomiócitos, que apresentam 1 ou 2 núcleos alongados de localização central. *Tricrômico de Masson . 1024 X*

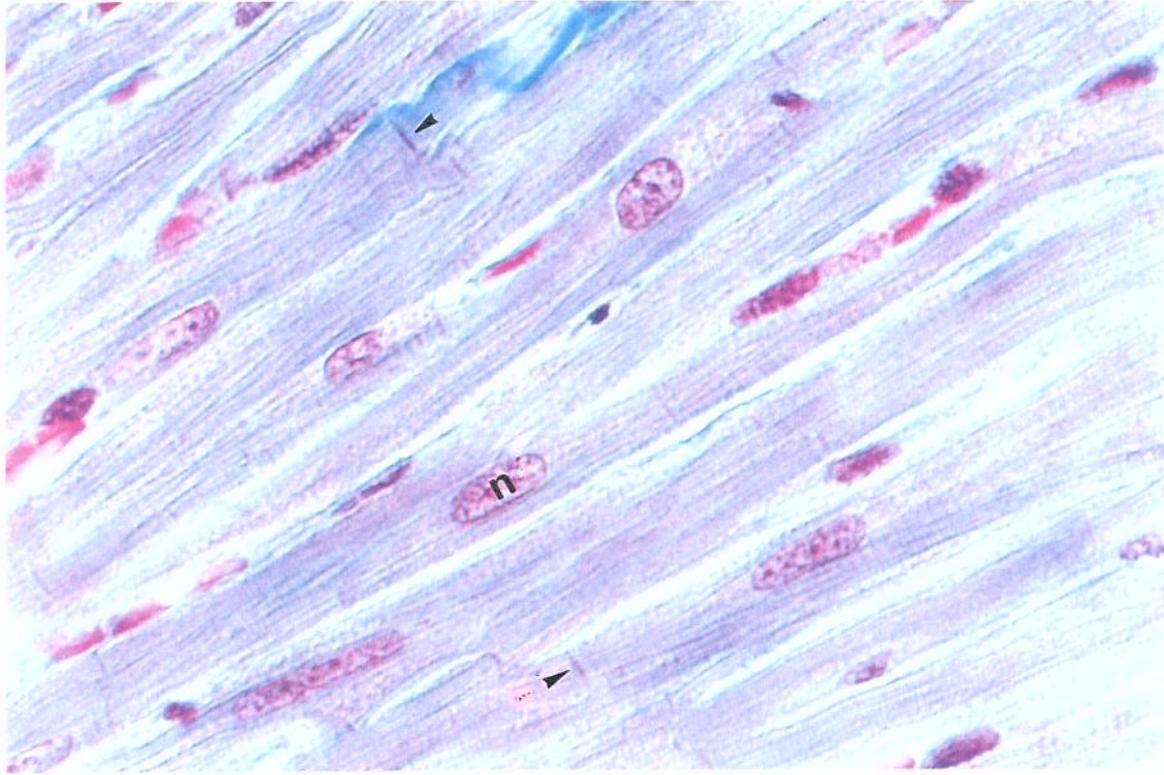


Figura 14 - Fotomicrografia de lâmina do coração de um dos animais do grupo atenolol. A aparência histológica miocárdica mostra-se normal. Não se observam alterações patológicas, como no grupo controle. Notar cardiomiócitos em corte longitudinal; nessas células observa-se a presença de núcleo claro, alongado e de localização central (n); podem-se notar, ainda, os discos intercalares (cabeça de seta) que representam a junção entre uma célula e outra. *Tri-crômico de Masson. 1024x*

Estereologia e resultados quantitativos

Densidade de volume ocupada pelos cardiomiócitos (Vv)

Analisando-se comparativamente os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que os valores médios obtidos para o Vv não apresentam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Assim sendo, a fração de volume ocupada pelos cardiomiócitos em relação aos demais componentes estruturais do coração (tecido conjuntivo e vasos), não variou com os diferentes tratamentos aos quais os animais foram submetidos.

Tabela 2 - Densidade de volume (Vv) ocupada pelos cardiomiócitos nos diversos grupos analisados. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo experimental.

Grupos	Vv cardiomiócitos (%)
Controle	0.62 \pm 0.001
L-NAME	0.64 \pm 0.016
L-NAME + Propranolol	0.65 \pm 0.017
L-NAME + Atenolol	0.67 \pm 0.009
Propranolol	0.65 \pm 0.016
Atenolol	0.67 \pm 0.017

Área do cardiomiócito (Acel)

Observa-se que houve um aumento da Acel nos animais tratados

com L-NAME, em relação ao grupo controle. Nos animais tratados com L-NAME + Propranolol ou com L-NAME+Atenolol, os valores da Acel não encontram-se significativamente diferentes em relação àqueles do grupo controle. Nos animais tratados com propranolol ou atenolol individualmente não houve modificações da Acel em relação aos animais do grupo controle. (Figura 15)

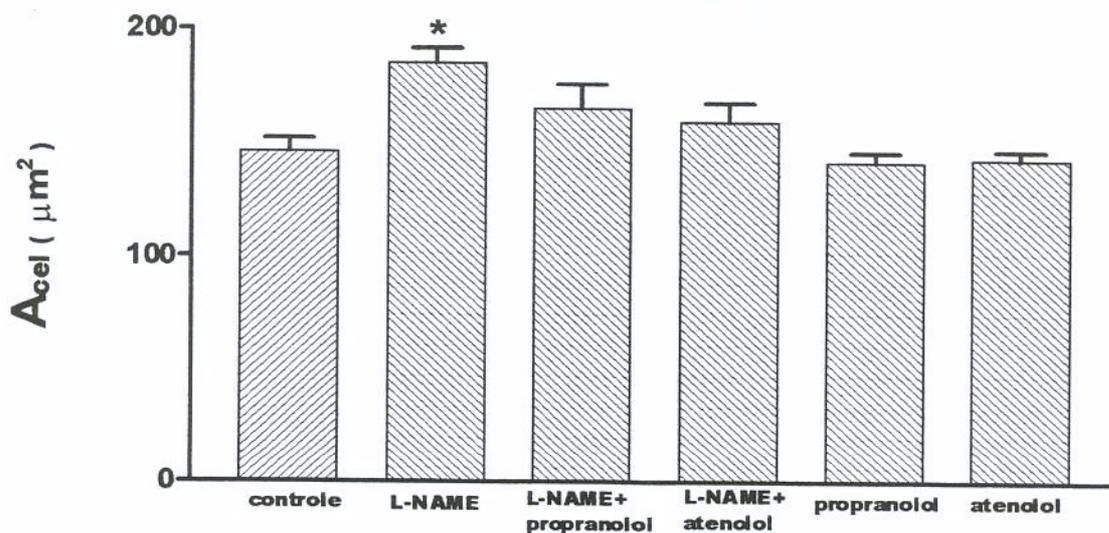


Figura 15 - Área (μm^2) dos cardiomiócitos (Acel) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados representam as médias \pm EPM. * $p < 0.05$ controle versus L-NAME

Densidade de volume dos vasos da microcirculação (Vv)

Nos resultados mostrados na tabela 3, nota-se que a densidade de volume ocupada pelos vasos da microcirculação não apresentou diferenças significativas dentre os diferentes grupos estudados.

Tabela 3 - Densidade de volume (Vv) ocupada pelos vasos da microcirculação, nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. Os resultados representam médias \pm EPM.

Grupos	(Vv) (%)
Controle	0.09 \pm 0.008
L-NAME	0.11 \pm 0.007
L-NAME + Propranolol	0.09 \pm 0.005
L-NAME + Atenolol	0.09 \pm 0.005
Propranolol	0.09 \pm 0.006
Atenolol	0.09 \pm 0.006

Densidade de comprimento dos vasos da microcirculação (Lv)

Os valores médios obtidos para o comprimento dos vasos da microcirculação (Lv) não mostraram-se significativamente diferentes nos grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 - Densidade média do comprimento dos vasos da microcirculação (Lv), nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. Os resultados representam médias \pm EPM.

Grupos	L _v (mm/mm ³)
Controle	0.008 \pm 0.0002
L-NAME	0.007 \pm 0.0003
L-NAME + Propranolol	0.005 \pm 0.0002
L-NAME + Atenolol	0.005 \pm 0.0004
Propranolol	0.006 \pm 0.0002
Atenolol	0.006 \pm 0.0002

Densidade de área dos vasos da microcirculação (S_v)

A análise estatística indicou que não houve alterações significativas na densidade média de área dos vasos que compõem a microcirculação (arteríolas, vênulas e capilares) nos diferentes grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Densidade da área dos vasos da microcirculação (S_v) nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. Os resultados representam médias ± EPM.

Grupos	S_v (mm²/ mm³)
Controle	0.05 ± 0.002
L-NAME	0.06 ± 0.002
L-NAME + Propranolol	0.05 ± 0.004
L-NAME + Atenolol	0.05 ± 0.003
Propranolol	0.05 ± 0.003
Atenolol	0.05 ± 0.003

Áreas de lesão (μm²)

A figura 16 indica que, quando tratados com L-NAME, o coração dos animais apresentaram áreas de lesão bastante acentuadas (fibroses cicatríciais e reparadoras); porém, quando submetidos ao tratamento de L-NAME associado ao propranolol ou Atenolol, as áreas de lesão diminuíram significativamente. (Figura 16)

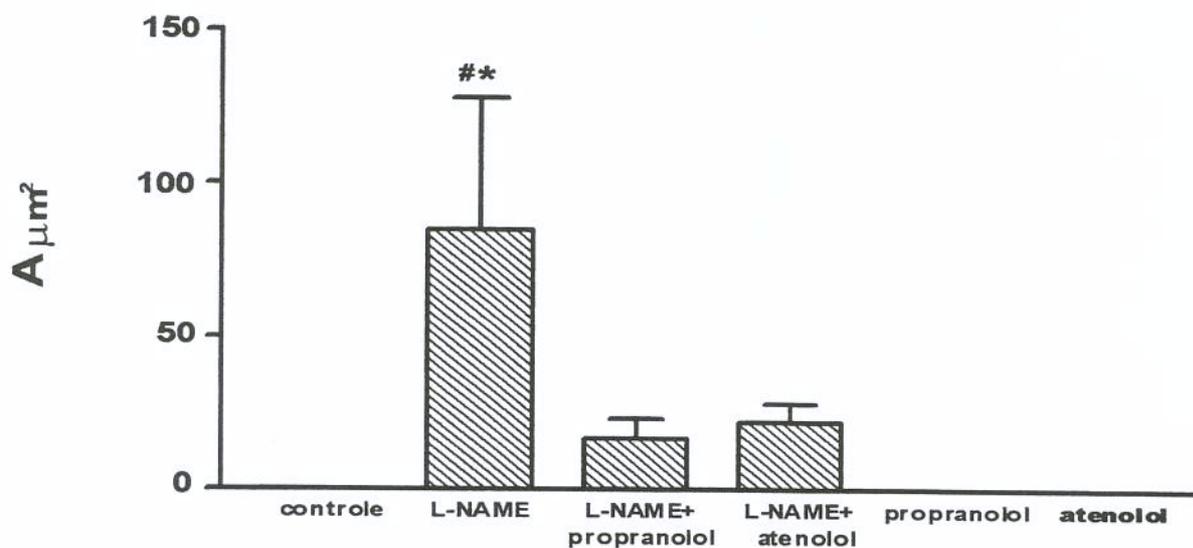


Figura 16 - Áreas de lesão (μm^2) nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. O resultado representa as médias \pm EPM. * $p < 0.01$ L-NAME versus L-NAME+propranolol e L-NAME+atenolol. # $p < 0.001$ L-NAME versus controle, propranolol e atenolol

Mortalidade

No grupo L-NAME, o índice de mortalidade foi de 33 % (5 mortes de um total de 15 ratos). Todos os animais dos grupos controle, L-NAME + propranolol, L-NAME + atenolol, propranolol e atenolol sobreviveram.

4. *Discussão*

Em pacientes hipertensos, o tratamento a longo prazo com antagonistas dos receptores β -adrenérgico promove a atenuação de hipertensão arterial e cardioproteção, mas os mecanismos responsáveis por estes efeitos benéficos ainda não estão bem esclarecidos (Kahönen et al., 1996).

A inibição da síntese de NO pelo tratamento crônico com L-NAME acarreta hipertensão arterial acompanhada de alterações patológicas do coração, tais como fibrose intersticial, necrose subendocárdica e discreta hipertrofia ventricular esquerda (Moreno et al., 1996).

Vasoconstrição e hipoperfusão renais, além de queda de filtração glomerular, também são comuns a esse quadro (Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992). A inibição da síntese de NO ou a disfunção endotelial leva um aumento significativo da resistência arterial devido a mudanças morfofuncionais da estrutura vascular, e isto representa a principal anormalidade hemodinâmica causadora da hipertensão arterial em animais e humanos.

A normalização da pressão sangüínea em pacientes hipertensos aumenta a sobrevida dos indivíduos e diminui os riscos de insuficiência

renal e cardíaca. A maioria dos agentes anti-hipertensivos, incluindo os inibidores de ECA, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , diuréticos e os antagonistas dos receptores α -adrenérgicos, interferem com os mecanismos de vasoconstrição e diminuem a resistência vascular (Bohlen, 1986; Mulvany et al., 1990). Nossos resultados sugerem que antagonistas dos receptores β -adrenérgicos são de valor benéfico em tratamento deste tipo de desordem vascular e cardíaca.

O NO tem papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo e pressão arterial (Moncada et al., 1991). Nosso estudo mostrou que o propranolol e o atenolol reduziram notadamente a hipertensão causada por administração prolongada de L-NAME, sugerindo que os mesmos corrigem a vasoconstrição determinada pela deficiência crônica de NO.

Em pacientes hipertensos, os β -bloqueadores causam inicialmente um discreto aumento do débito cardíaco, associado a uma elevação da resistência vascular, sem qualquer mudança da pressão sanguínea; porém, entre duas e cinco horas depois de administrados, é observada uma queda gradual na pressão sanguínea devido a uma redução na resistência vascular. Depois de 24 horas, o efeito anti-hipertensivo é associado a uma redução de resistência vascular abaixo do nível da fase do pré-tratamento, indicando que os β -bloqueadores exercem sua ação anti-hipertensiva por meio de vasodilação arterial (Veld, 1991). Os mecanismos responsáveis pela vasodilatação durante administração de β -bloqueadores estão ainda

obscuros, mas em preparações arteriais em *vitro*, os β -bloqueadores induzem relaxamento endotélio-dependente (Mostaghim et al., 1986; Gao et al., 1991) e aumentam a secreção de fatores relaxantes do endotélio (Janczewski et al., 1987).

Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o tratamento com atenolol a longo prazo não apenas atenuou o aumento da pressão sanguínea, como também aumentou as respostas relaxantes do mesentério dos anéis arteriais pela acetilcolina (Kahönen et al., 1994). Curiosamente, em oito semanas de tratamento com o celiprolol (β_1 -bloqueador) em humanos, observou-se o aumento da atividade da síntese de NO em neutrófilos do sangue periférico e diminuiu-se a geração de ânion superóxido (Mehta, 1994). Assim, apesar de todos esses estudos sugerirem que os β -bloqueadores produzem vasodilatação, principalmente por "normalizarem" a produção de NO nas células endoteliais, acreditamos que isto seja impossível, uma vez que trabalhamos com ratos cronicamente tratados com inibidor de NO. A atenuação da pressão arterial pelos β -bloqueadores talvez se reflita em outras funções celulares, como a produção aumentada de prostaglandina pelos rins e vasos (Schmieder et al., 1996), redução da liberação de fatores contráteis derivados do endotélio; melhora do Na^+ vascular; K^+ -ATPase e capacidade elevada do músculo liso vascular para seqüestrar Ca^{2+} em compartimentos celulares (Dominiczak et al., 1997).

A hipertensão essencial seguida do aumento da massa ventricular

esquerda é observada freqüentemente em animais experimentais e pacientes. Isso tem sido associado à alta incidência de arritmias ventriculares, função diastólica prejudicada, complacência ventricular reduzida, circulação coronariana prejudicada e risco de morbidez cardiovascular e mortalidade (Hoglund et al., 1998; Schmieder et al., 1996).

Nesse modelo experimental de inibição crônica de NO, observou-se que a hipertrofia ventricular esquerda e dos cardiomiócitos acompanha a hipertensão arterial (Moreno-Jr et al., 1996; Numagachi et al., 1995; De-vlin et al., 1998; Moreno-Jr et al., 1995; Akuzawa et al., 1998; Gomes-Pessanha et al., 1999). Isto foi confirmado em nosso estudo, em que oito semanas de tratamento com L-NAME causaram aumentos significantes no IPC e IPVE, como também, no tamanho dos cardiomiócitos, embora atenuados pela terapia concomitante com propranolol ou atenolol.

Estudos prévios mostraram que os inibidores de ECA previnem a hipertensão induzida por L-NAME e a hipertrofia ventricular (Moreno-Jr et al., 1995; Akuzawa et al., 1998). A hipertrofia ventricular esquerda pode refletir adaptações estruturais do coração em resposta à hipertensão arterial sistêmica e sobrecarga aumentados (Dominiczak et al., 1997),

Assim, podemos especular que a regressão parcial da hipertrofia ventricular pelos β -bloqueadores seja conseqüência da sua capacidade em reduzir a hipertensão arterial induzida por L-NAME. No entanto, a hidralazina, um agente antihipertensivo, previne a hipertensão arterial indu-

zida por L-NAME, mas não mostra nenhum efeito sobre a hipertrofia cardíaca resultante (Numagachi et al., 1995). Além disso, em humanos, diferentes tentativas com agentes anti-hipertensivos, inclusive β -bloqueadores, indicam que eles não reduzem igualmente a massa ventricular esquerda, apesar de apresentarem reduções compatíveis nas pressões sanguíneas diastólicas e sistólicas (Schmieder et al., 1996; Cruickshank et al., 1992; Hoglund et al., 1998).

É bem conhecido que o aumento da massa ventricular esquerda pode acarretar isquemia miocárdica extensa (Cruickshank et al., 1992).

Em nosso estudo, o propranolol e o atenolol reduziram moderadamente a hipertrofia ventricular, bem como preveniram a formação de fibrose miocárdica de forma bastante significativa. Isto indica que a hipertrofia cardíaca e as lesões do miocárdio, em resposta ao L-NAME, não estabelecem uma relação dependente entre si.

A administração aguda ou prolongada da síntese de inibidores de NO causa vasoconstrição coronária, redução de fluxo coronariano e infarto do miocárdio (Moreno-Jr et al., 1996; Humphries et al., 1991). A isquemia miocárdica devido à ingestão prolongada de L-NAME pode conduzir a morte dos cardiomiócitos, necrose e formação subsequente de fibroses intersticiais. No presente estudo foi mostrado que o propranolol e atenolol atenuaram o aumento do tecido fibroso causado pelo L-NAME a longo prazo; porém, é improvável que a redução da hipertensão por esses

agentes compense a falta de NO na circulação coronária.

Outros agentes anti-hipertensivos como o enalapril (Moreno-Jr et al., 1995), nifedipina e diltiazem (Oliveira et al., 1999) são capazes de atenuaram significativamente a hipertensão induzida por L-NAME, mas não afetam as lesões do ventrículo esquerdo promovidas por esse composto.

Os mecanismos pelos quais o propranolol e o atenolol compensam a deficiência local de NO na circulação coronária ainda não nos são claros.

Estudos anteriores mostraram que os β -bloqueadores podem seletivamente aumentar o fluxo de sangue para áreas de isquemias do coração (Becker et al., 1971). O aumento do fluxo sanguíneo e a atenuação do infarto pelo propranolol e atenolol explicariam a prevenção da mortalidade observada nos animais tratados com L-NAME. De acordo com esta hipótese, a injeção intravenosa aguda (ISIS, 1986; MIAMI, 1985) ou a administração oral a longo prazo (Yusuf et al., 1985) de β -bloqueadores, reduziriam o risco de mortalidade vascular em pacientes com infarto agudo do miocárdio.

5. *Conclusões*

O propranolol e o atenolol reduziram significativamente a hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com L-NAME.

Os animais do grupo L-NAME apresentaram elevação significativa no peso cardíaco relativo e no índice do peso ventricular esquerdo, sendo essa elevação prevenida pelo tratamento com atenolol e propranolol.

O propranolol e atenolol diminuíram a hipertrofia celular (aumento da área média dos cardiomiócitos) nos animais tratados com L-NAME.

Baseados nestas considerações e nos resultados obtidos, podemos sugerir que, no modelo de inibição crônica de NO, o atenolol e propranolol sejam eficientes como anti-hipertensivos e protetores da musculatura cardíaca.

6. *Summary*

The effects of the β -blockers propranolol and atenolol were investigated on arterial hypertension, cardiomyocyte hypertrophy and ventricular ischaemic lesions in response to long-term administration of the nitric oxide (NO) synthase inhibitor N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in rats. Male Wistar rats received L-NAME (20 mg/rat per day) in the drinking water for 8 weeks. Propranolol (30 mg/rat per day) and atenolol (30 mg/rat per day) were also given in the drinking water concomitantly to L-NAME. Treatment with L-NAME caused a time-dependent increase in tail-cuff pressure, whereas untreated rats remained normotensive during the whole study period.

Propranolol or atenolol markedly attenuated L-NAME-induced hypertension. When given alone, propranolol and atenolol had no significant effect on tail-cuff pressure. A significant increase in the mean cross-sectional area of cardiomyocytes (A_{cel}) of left ventricles was observed in L-NAME-treated rats, and this was partly attenuated by either propranolol or atenolol.

Additionally, L-NAME caused a marked increase in the fibrosis index (interstitial, repairing and perivascular fibrosis), an effect markedly attenu-

ated in animals receiving concomitantly propranolol or atenolol. In L-NAME group, 33% mortality was observed, whereas all the animals from the other groups survived. Our study demonstrates that propranolol and atenolol reduce arterial hypertension, cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis induced by a 8-week treatment with L-NAME, suggesting that β -blockers are of beneficial value in treatment of vascular and cardiac alterations caused by chronic NO deficiency.

Keywords: Propranolol – Atenolol - L-NAME – Myocardial infarction – Nitric oxide synthase inhibitors

7. Referências

Bibliográficas

AHERNE, W.: Quantitative methods in Histology. *J. Med. Lab. Technol.* **27**: 160-170, 1970.

AKUZAWA N.; NAKAMURA T.; KURASHIMA T. et al. Anthihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. *Am J Hypertens* **11**: 697-707, 1998.

ALLEN J.W.; KAISER P.J.; MONTENEGRO A. Effects of atenolol on left ventricular hypertrophy and early left ventricular function in essential hypertension. *Am J Cardiol.* **18**: 1157-61, 1989.

ARNAL J.F.; DINH-XUAN AT; PUEYO M.; DARBLADE B.; RAMI J.; Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 1078-1087, 1999.

ARONOW WS., Beta-bloquers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and calcium antagonists in treatment of elderly patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* **11(4)**: 331-338, 2000.

AMRANI M. O' SHEA J.; ALLEN NJ.; Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat

heart. *J Physiol.* **456**: 681-7, 1992.

BATLOUNI M. & RAMIRES J. A. F. Importância do endotélio na doença arterial e na aterogênese. *Arq. Bras. Cardiol*, **62(4)**: 255-270, 1994.

BAYLIS C.; MITRUKA B.; DENG A.. Chronic blockade of nitric oxide in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, **90**: 278-281, 1992.

BECKER, LC., FORTUIN, NJ., PITT, B. Effect of ischemia and antianginal drugs on the distribution of radioactive microspheres in the canine left ventricle. *Circ. Res*, **28**: 263-9, 1971.

BOHLEN, HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension*, **8**: 181-3, 1986.

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.

BOUCHER J. L.; MOALI C.; TENU J. P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular life Sciences*. **55**: 1015-1028, 1999.

BREDDT D.S. & SNYDER S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 682-5, 1990.

CARRIER, GO.; FUCHS, LC.; WINECOFF, A.P.; GIULUMIAN, A.D & WHITE, R.E. Nitrovasodilators relax mesenteric microvessel by a cGMP-

induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am. J. Physiol.*, **273**: h76-H84, 1997.

CRUICKSHANK J; LEWIS J; MOORE V; DODD C. Reversibility of left ventricular hypertrophy by different types of antihypertensive therapy. *J. Hum. Hypertens.* **6**: 85-90, 1992.

DELESSE, ACHILLE ERNEST (1817-1881), 1848, apud AHERNE, W, 1970.

DEVLIN AM; BROSNAN MJ; GRAHAM D; et al. Vascular smooth muscle cell polyploid and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. *Am. j. Physiol.* **274**: H52-H59, 1998.

DOMINICZAK AF, DEVLIN AM; BROSNAN MJ, et al. Left ventricular hypertrophy and arterial blood pressure in experimental models of hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **423**: 23-33, 1997.

DUNN F.G.; VENTURA H. A .; MESSERLI F.H.; KOBRIN I.; FROHLICH E.D. Time course of regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with atenolol. *Circulation*; **76** (2): 254-8, 1987.

FLETCHER P.J.; HORVATH J.S.; BAILEY B.P.; TILLER D. Effects of drug therapy on hypertensive left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **12**(3): 291-4, 1985.

FURCHGOTT R.F.& ZAWADSKI J.V. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Na-*

ture; **228**: 373-6, 1980.

GAO Y; NAGAO T; BOND R; JASSENS WJ; VANHOUTTE PM. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **17**: 964-9, 1987.

GARDINER S.M.; COMPTON A.M.; KEMP P. A.; BENNETT T. Regional and hemodynamic effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.*; **101**: 625-31, 1990.

GOMES-PESSANHA M; MANDARIM de LACERDA CA; DUMAS HAHN M. Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of nitric oxide synthesis. *Pathobiology*; **67**: 26-33, 1999.

GOTTDIENER J. S.; REDA D.J.; MASSIE B.M.; MATERSON B.J.; WILLIAMS D.W.; ANDERSON R.J. Effect of single-drug therapy on reduction of left ventricular mass in mild to moderate hypertension: comparison of six antihypertensive agents. The Department of veterans affairs cooperative study group on antihypertensive agents. *Circulation*; **15;95** (8).

GOTTDIENER J. S.; REDA D.J.; WILLIAMS D.W.; MATERSON B.J.; CUSHMAN W.; ANDERSON R.J. Effect of single-drug therapy on reduction of left atrial size in mild to moderate hypertension: comparison of six antihypertensive agents. *Circulation*; **14;98**(2): 140-8, 1998.

HIRAWA N; UEHURA Y; NUMABE A; et al. Stimulating effects of atenolol on vasodepressor prostanoid generation in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci*, **81**: 499-507, 1991.

HOGLUND C.; CIFKOVA R.; MINRAN A .; TENCZER J.; WATT A.; WILKINS M.R.; LINDBERG E. A comparison of the effects of mibefranil and atenolol on regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Cardiology*; **89**(4): 263-70, 1998.

HUMPHRIES RG; CARR RD; NICOL AK; TOMLINSON W; O'CONNOR SE. Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N^G-nitro-arginine. *Br J Pharmacol*, **102**: 565-6, 1991.

IGNARRO L.; BUGA G.; WOOD K.; BYRNS R.; CHAUDHURI G. Endothelium derived relaxing factor produce and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad of Sci USA*; **84**: 9265-9269, 1987.

JANCZEWSKI P; BOULANGER C; IQBAL A; VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent effects of carteolol. *J Pharmacol Exp Ther.* **247**: 590-5, 1987.

JUNQUEIRA L.C & CARNEIRO J. *Histologia Básica. A histologia e seus métodos de estudo*; 1-2, 1999.

KÄHÖNEN M.; ARVOLA P.; MÄKYNEN H.; PÖRSTI I. Antihypertensive therapy and arterial function in experimental hypertension. *Gen. Pharmac*; **27**: 221-228, 1996.

KLATT P.; SCHMIDT K.; MAYER B. Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *Biochem. J.*; **288**: 15-17, 1992.

LEVI D; GARRISON R; SAVAGE D; KANNEL W; CASTELLI W.

Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med*, **322**: 1561-6, 1990.

MEHTA JL. Emerging options in the management of myocardial ischemia. *Am J Cardio*.**73**: 18A -27A, 1994.

MONCADA S.; PALMER R.M.J.; HIGGS E.A . Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*; **43**(2): 109-141, 1991.

MONCADA S.; GRYGLEWISKI R.; VANE J.R.An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**: 663-5, 1976.

MORENO JR, H., METZE, ANTUNES, E., ZATZ, R., DE NUCCI, G., Chronic nitric oxide inhibition as a model of ischemic cardiopathy. *J. Cardio. Pharmacol* , 1994.

MORENO JR, H., NATHAN LP; COSTA SKP, et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischaemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis.*Eur. J Pharmacol*. **287**: 93-6, 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. *Basic Res. Cardiol*. **91**: 248-255, 1996.

MOSTAGHIM R; MADDOX YT; RAMWELL PW. Endothelial potentiation of relaxation response to beta adrenoceptor blocking agents. *J Pharmacol Exp Ther*. **239**: 797-801, 1986.

MOTZ W.; STRAUER B.E. Regression of cardiac hypertrophy after therapy in animal hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* **7** Suppl 2: S56-61, 1985.

MÜLSCH A. & BUSSE R. N^G-nitro-L-arginine (N⁵imino(nitroamino) methyl] -L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **341**:143-147, 1990.

NUMAGACHI K; EGASHIRA K; TAKEMOTO M; et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension*, **26**: 957-62, 1997.

OLIVEIRA CF.; CINTRA K.A.; TEIXEIRA S.A; DE LUCA IM.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of nitric oxide synthesis inhibitor. *Eur J Pharmacol.* **391**: 121-126, 2000.

OLIVEIRA CF.; NATHAN L.; METZE K.; MORENO JR. H.; DE LUCA IM.; SUCUPIRA M.; ZATZ R.; ZAPPELLINI A.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. Effect of Ca²⁺ channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*; **373**: 195-200, 1999.

PALMER R.; ASHTON D.S.; MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**: 664-666, 1988.

PALMER R.; FERRIGE A.; MONCADA S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*,

327: 524-526, 1987.

PRICHARD BN, GRAHAM BR, CRUICKSHANK JM. New approaches to the uses of beta blocking drugs in hypertension. *J Hum Hypertension*, **Article**: S63-S68.

QIU C.; MUCHANT D.; BEIERWALTES W.; RACUSEN L.; BAYLIS C. Evolution of Chronic Nitric oxide inhibition hypertension – relationship to renal function. *American Heart Association, Inc.* **31 [part 1]**: 21-26, 1998.

RIADO SR.; ZANESCO A.; BARKER LA.; DE LUCA IM.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. Long-term nitric oxide inhibition and chronotropic responses in rat isolated right atria. *Hypertension*. **34(4 Part 2)**: 802-807, 1999.

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.

SCHMIEDER R; MARTUS P; KLINGBEIL. Reserval of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: A meta-analysis of randomized double-blind studies, *JAMA*, **275**: 1507-13, 1996.

TENENBAUM ^a; FISMAN Z.E.; MOTRO M. L-Arginine: Rediscovery in progress. *Cardiology*, **90**: 153-159, 1998.

The MIAMI Trial Research group. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomize placebo-controlled international trial. *Eur Heart J*, **6**: 199-226, 1985.

VELD AJ. Vasodilation, not cardiodepression, underlies the antihypertensive effect of beta-adrenoceptor antagonists. *Am J Cardiol*, **67**: 13B - 17B, 1991.

ZAPPELLINI A.; TEIXEIRA S.A.; MUSCARÁ M.N.; ZATZ R.; ANTUNES E.; DE NUCCI G. In vivo inhibition of nitric oxide synthesis does not depend on renin-angiotensin system activation. *Eur. J. Pharmacol.*; **317**: 285-291, 1996.

ZAPPELLINI A.; MORENO JR. H.; ANTUNES A .; DE NUCCI G. Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N^o-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs. *Braz. J. Biol. Res.*, **29(1)**: 33-39, 1996.

WADWORTH, A.N.; MURDOCH, D.; BROGDEN, R.N. Atenolol reappraisal of its properties and therapeutic uses in disorders cardiovascular. *Drugs* **42**: 468-510, 1991.

WALLACE A.; TATEO I.; LI J.; HOLLEMBERG M.; BROWNER W.; MILLER D.; MANGANO T.D. Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. *Journal of American society of anesthesiologists. Inc.* V **88**, N°1, 1998.

YUSUF S; PEDRO R; LEWIS J; COLLINS R; SLEIGHT P. Beta blockade during and after myocardial infarction. *Prog Cardiovasc dis.* **27**: 335-71, 1985.