

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA Tese DE
MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DA UNICAMP, PELA ALUNA BEATRIZ MARIA ROMANO CARVALHO.

CAMPINAS, 29 DE MAIO DE 1992.

PROF. DR. SÉRGIO DE MORAES,
ORIENTADOR

BEATRIZ MARIA ROMANO CARVALHO

EFEITOS DO

N-p(AZIDO-M-iodofenilettilamidoisobutil)NORADRENALINA

(NAIN) "IN VIVO" E "IN VITRO":

UM AGONISTA DE ADRENOCEPTORES BETA

Tese apresentada ao
Departamento de Farmacologia
da Faculdade de Ciências
Médicas - UNICAMP para a
obtenção do grau de Mestre
em Ciências (Farmacologia).

Orientador: Prof. Dr. Sérgio
de Moraes

Campinas - SP
1992

C253e

16945/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Esta tese foi preparada no Laboratório de Adrenoceptores do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, durante o curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Farmacologia e apresentada ao Departamento de Farmacologia desta Universidade, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

UNICAMP - Campinas - SP
1992

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Sérgio de Moraes, pela oportunidade e contribuição para minha formação científica e profissional, bem como pelo imprescindível conhecimento sem o qual este trabalho não se realizaria.

A Profa. Dra. Regina Célia Spadari, meu carinho e gratidão pela amizade e auxílio essencial no desenvolvimento deste trabalho; bem como pela generosidade em me proporcionar livre acesso a seu laboratório e recursos nele disponíveis.

Aos colegas de equipe, pelo auxílio metodológico e pelas proveitosas discussões, bem como pela amizade que tornou mais agradável o período de execução deste trabalho.

A FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pelo apoio Financeiro concedido.

A Vanderci Aparecida dos Santos, pela amizade e pela ajuda constante no trabalho laboratorial.

Aos demais professores, alunos, e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP que, de algum modo, colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

Aos professores, alunos, e funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP que, de algum modo, colaboraram para a realização deste trabalho.

INDICE

I - INTRODUÇÃO	1
1. Relação Estrutura-Atividade	2
2. Adrenoceptores	5
3. Distribuição e Função dos Adrenoceptores Cardíacos em diferentes Espécies	9
4. Controle Nervoso da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	12
5. pA _x	15
II- OBJETIVOS	17
III-MATERIAIS E METODOS	19
1. Experimentos "In Vivo"	20
1.1. Animais	
1.2. Medida de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	
1.3. Grupos Experimentais	
2. Experimentos "In Vitro"	24
2.1. Animais	
2.2. Atrio Direito Isolado	
2.3. Pré-Tratamentos	
2.4. Curvas Concentração-Efeito a Agonistas Adrenérgicos	
2.5. Determinação do Valor pA ₂ para o Propranolol e Metoprolol	
3. Análise dos Dados	28
4. Fármacos e Soluções	28
IV- RESULTADOS	30
1. Efeito Cronotrópico	31
2. Efeito Pressórico	45
V- DISCUSSAO	50

VI- CONCLUSões	60
VII- RESUMO - ABSTRACT	62
VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

I - INTRODUÇÃO

1. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Estudos bioquímicos executados por RESEK & RUOHO (1988) demonstraram que o N-(p-azido-m-iodofeniletilamido isobutil)noradrenalina (NAIN) é um agonista total de adrenoceptores beta, uma vez que determina estimulação da adenilil-ciclase, em brônquios de cobaia, semelhante àquela produzida pelo isoproterenol (ISO). Quando incubados em conjunto, NAIN e ISO não induzem estimulação adicional da adenilil-ciclase, se comparada àquela produzida somente por NAIN. Esta estimulação pode ser inibida por alprenolol, antagonista não-seletivo de adrenoceptores beta. Não foi estabelecido, entretanto, se este agonista possui seletividade para um dos subtipos de adrenoceptores beta.

O composto NAIN é uma catecolamina sintética que apresenta um radical alquílico, no nitrogênio amínico, maior que o de outras catecolaminas, sintéticas ou não (Fig. 1).

A seletividade para adrenoceptores beta é favorecida pelas seguintes funções: a) hidroxila fenólica em posição meta no grupo catecólico, b) hidroxila alcoólica no carbono beta da cadeia lateral e c) um grupo volumoso no nitrogênio amínico (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982).

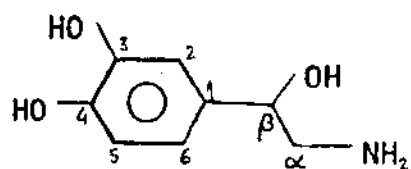
O grupo catecólico parece, por si só, ser mais crítico para a ativação de adrenoceptores beta do que para a ativação de adrenoceptores alfa, pois aminas não fenólicas são quase isentas de atividade beta, embora a atividade alfa

se mantenha. Deste modo, já seria de se esperar que o composto NAIN apresentasse maior seletividade por adrenoceptores beta, uma vez que esta é proporcional ao tamanho do radical no grupo catecólico. Agonistas seletivos de adrenoceptores beta-2 requerem maiores substituintes no grupo aminico e radicais hidroxila nas posições 3 e 5 do anel aromático, características apresentadas pelo NAIN e que sugerem a possibilidade de o mesmo ser um agonista seletivo deste tipo de adrenoceptores (Fig. 1).

Conforme observado por LANDS et al. (1967 a), muitos compostos que ativam adrenoceptores beta, apresentam substituintes metil no carbono alfa. Tais análogos alfa metilados apresentam um efeito relativamente maior em produzir vasodilatação do que estimulação cardíaca. Estes efeitos são mediados, respectivamente, por adrenoceptores do subtipo beta-2 e beta-1.

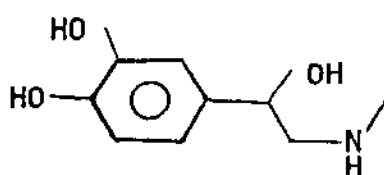
JOHANSSON et al. (1990) analisaram a seletividade de uma série de agonistas beta adrenérgicos para adrenoceptores do subtipo beta-2 em termos de afinidade do agonista e atividade intrínseca do complexo droga-receptor. Segundo estes autores, a substituição de hidrogênio por radicais alquílicos, no nitrogênio aminico de um agonista adrenérgico, aumenta a sua seletividade por adrenoceptores beta-2. Este efeito pode ser atribuído a uma mudança na afinidade do agonista e, em menor extensão, a uma alteração na atividade intrínseca do complexo droga-receptor.

FIG. 1: Relação estrutura-atividade de algumas catecolaminas



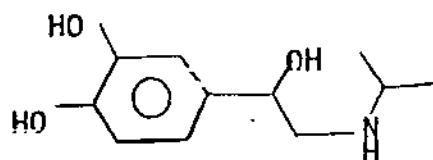
NORADRENALINA

4-[1-hidroxi-2(amino)etil]-1-2-benzenodiol



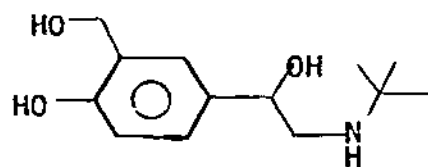
ADRENALINA

4-[1-hidroxi-2(metilamino)etil]-1-2-benzenodiol

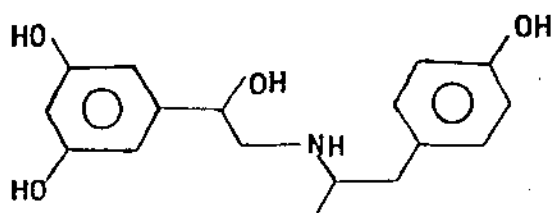


ISOPROTERENOL

4-[1-hidroxi-2[(1-metilet)amino]etil]-1-2-benzenodiol

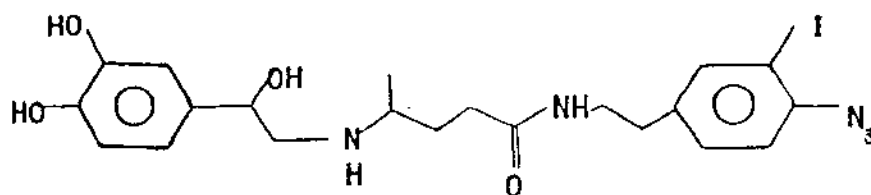


SALBUTAMOL

 α' -[(tert-butilamino)metil 4-hidroxi-m-xileno- α, α' diol]

FENOTEROL

5-[1-hidroxi-2[[2-(4-hidroxiifenil)-1-metilet]amino]etil]-1-3-benzenodiol



NAIN

N(p-azido-m-iodofeniletilamidoisobutil) noradrenalina

AUMENTO DA SELETIVIDADE PARA ADRENOCEPTORES BETA

2. ADRENOCEPTORES

Os receptores adrenérgicos foram inicialmente classificados por AHLQUIST (1948), que identificou dois tipos de acordo com a série de potências relativas de agonistas adrenérgicos em diferentes tecidos. A série característica dos adrenoceptores alfa é adrenalina (ADR) > noradrenalina (NA) >> isoproterenol (ISO), enquanto que, para os adrenoceptores beta a série é ISO > ADR > NA. Estes dois tipos de adrenoceptores foram posteriormente subdivididos.

Os adrenoceptores alfa foram subdivididos em alfa-1 e alfa-2 (LANGER, 1974). A distinção inicial foi baseada em considerações anatômicas e funcionais quando se observou que agonistas alfa adrenérgicos poderiam inibir a própria liberação de NA dos neurônios (LANGER, 1980; STARKE, 1987). Este efeito inibitório da NA na sua liberação é mediado por adrenoceptores alfa farmacologicamente distintos dos adrenoceptores alfa pós-sinápticos. Os adrenoceptores alfa pré-sinápticos foram denominados alfa-2, enquanto que os adrenoceptores alfa excitatórios pós-sinápticos foram denominados alfa-1 (LANGER & LEHMANN, 1988). Resultados recentes mostram que os adrenoceptores alfa-1 e alfa-2 apresentam subtipos. Foram clonados três subtipos de adrenoceptores alfa-1 (alfa 1A, 1B e 1C) e três subtipos de

adrenoceptores alfa-2 (alfa 2A, 2B, 2C) (HARRISON et al., 1991).

Os adrenoceptores beta foram subdivididos em beta-1 (miocárdio) e beta-2 (músculo liso e outros tecidos) devido a serem diferentemente ativados pela ADR e NA. Estes agonistas são essencialmente equipotentes em ativar os adrenoceptores beta-1, mas a ADR apresenta uma potência de dez a cinquenta vezes maior em ativar os adrenoceptores beta-2 do que a NA (LANDS et al., 1967 a e b). Foi recentemente isolado um gen humano que decodifica um terceiro tipo de adrenoceptor beta, denominado beta-3 (EMORINE et al., 1989). Uma vez que os adrenoceptores beta-3 são cerca de dez vezes mais sensíveis à NA do que a ADR e relativamente resistentes ao bloqueio pelo propranolol, acredita-se que eles possam mediar respostas a catecolaminas em sítios com características farmacológicas atípicas, como o tecido adiposo (LEFKOWITZ et al., 1990).

Os adrenoceptores constituem uma família de glicoproteínas estrutural e funcionalmente relacionadas entre si (STILES et al., 1983; VENTER & FRASER, 1983) e a receptores para hormônios e outros neurotransmissores, como por exemplo, o receptor para insulina e o receptor muscarínico (DOHLMAN et al., 1987).

Um aspecto interessante a se considerar é a topografia destes receptores. Eles apresentam sete "domínios transmembrana" interligados, um grupo amino terminal voltado para o exterior da célula e um grupo carboxílico voltado

para o citoplasma (LEFKOWITZ & CARON, 1988). Este modelo topográfico não se refere somente aos adrenoceptores, mas a toda uma família de receptores de membrana acoplados a proteínas "G", assim denominadas por serem sensíveis a nucleotídeos de guanina (LEFKOWITZ et al., 1990).

Os receptores deste grupo agem por facilitar a ligação de GTP a proteínas G específicas. Esta ligação ativa a proteína G, que passa a controlar a atividade de efetores específicos. Estes efetores incluem enzimas como a adenilil-ciclase e as fosfolipases C e Az (BORMANN et al., 1984), canais específicos para o Ca^{2+} , Na^{+} , ou K^{+} e algumas proteínas de transporte. Uma única célula pode apresentar cinco ou mais proteínas G, sendo que cada uma delas responde a vários receptores diferentes de acordo com um padrão característico de seletividade (ROSS, 1990).

As proteínas G se localizam na face interna da membrana plasmática e são compostas de subunidades que foram denominadas alfa, beta e gama (NORTHUP et al., 1983; HILDEBRANDT et al., 1984). A classificação das proteínas G é baseada na identidade da subunidade alfa. Já se conhecem quatro tipos desta proteína: G_s (s, *stimulatory*), G_i (i, *inhibitory*), G_o (o, *other*), $G?$, que desempenham diferentes funções (BOKOCH et al., 1984). $G?$ não tem sua função ainda bem definida.

Não é pouco usual que, em uma célula, diferentes receptores ativem uma única proteína G. Vários agonistas podem ativar a adenilil-ciclase unicamente através da G_s

(BOKOCH et al, 1984). O oposto também pode acontecer, um único receptor pode interagir com diferentes proteínas G; um único receptor muscarínico pode causar a inibição da adenilil-ciclase e a ativação da fosfolipase C por interagir com, no mínimo, duas proteínas G diferentes (ROSS, 1990). Do mesmo modo, uma única proteína G pode regular vários efetores, como é o caso da proteína Gs que ativa a adenilil-ciclase e promove a abertura do canal de Ca^{2+} a ela associado (BROWN & BIRNBAUMER, 1988). Há também a possibilidade de um efector ser controlado por diferentes proteínas G, como é o caso da fosfolipase C, que é ativada por dois tipos de proteínas G em resposta a grupos distintos de receptores (ROSS, 1990).

Aceita-se que ambos os subtipos de adrenoreceptores beta, beta-1 e beta-2, estimulam a enzima adenilil-ciclase através da Gs (GILMAN, 1987). A estimulação destes receptores leva ao acúmulo de AMP cíclico (LEFKOWITZ et al., 1982; LIMBIRD, 1984; STILES et al., 1984), ativação de proteína quinase dependente de AMP cíclico e alteração da função de inúmeras proteínas celulares devido à sua fosforilação. A Gs ativada através dos adrenoreceptores, pode também acionar canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes da membrana plasmática (BROWN & BIRNBAUMER, 1988), fornecendo um efeito adicional à estimulação destes receptores.

3. DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÃO DOS ADRENOCEPTORES EM DIFERENTES ESPÉCIES

Foi proposto que os adrenoceptores beta-1 e beta-2 predominariam, respectivamente, no coração e em músculos lisos (LANDS et al., 1967 a, b). Entretanto, aceita-se atualmente que estes adrenoceptores possam coexistir em diversos órgãos e tecidos (MINNEMANN et al., 1981). Este fato foi primeiramente observado por CARLSSON et al. (1972, 1977) em coração de gato, onde os subtipos de adrenoceptores coexistem em diferentes proporções, quando se comparam regiões do ventrículo e do nódulo sino atrial.

Há evidências de que, em coração de gato, ambos os subtipos de adrenoceptores participam, direta ou indiretamente, da resposta cronotrópica positiva evocada por agonistas simpatomiméticos, uma vez que esta, é inibida em diferentes extensões por H35\25 (um antagonista beta-2 seletivo) e practolol (um antagonista beta-1 seletivo) (CARLSSON et al., 1972). Outras evidências para a função cronotrópica de adrenoceptores beta-2 foram obtidas "in vivo", em humanos, com a observação de que a administração de um bloqueador beta não seletivo apresenta maior habilidade em antagonizar a taquicardia induzida por ISO do que um bloqueador seletivo de adrenoceptores beta-1 (BROWN et al., 1986). Verificou-se, também, que o bloqueio seletivo de adrenoceptores beta-2 diminui, de modo significativo, a resposta cronotrópica induzida por um agonista beta-

adrenérgico não seletivo (ARNOLD et al., 1985). O bloqueio seletivo de adrenoceptores beta-1, obtido com atenolol, reduz apenas levemente o efeito cronotrópico evocado pela terbutalina, um agonista seletivo beta-2, ou adrenalina, um agonista beta não seletivo (STRAUSS et al., 1986; LEENEN et al., 1983 e 1988). Mecanismos alternativos para explicar as alterações da função cardíaca por ação da terbutalina incluem: supressão do tônus vagal, decréscimo na pós-carga, e estimulação direta de adrenoceptores beta-2 (STRAUSS et al., 1986; MORDY et al., 1988).

A partir de resultados obtidos com estudos realizados em humanos, atribuiu-se também especial importância funcional aos adrenoceptores beta-2 em casos de insuficiência cardíaca congestiva, desde que nos estados finais desta cardiomiopatia, os adrenoceptores beta-1 apresentam-se reduzidos em número e sua resposta encontra-se diminuída, enquanto que os adrenoceptores beta-2 permanecem praticamente inalterados. Nestas condições, os adrenoceptores cardíacos beta-2 podem compensar as alterações dos adrenoceptores beta-1 e manter a contratilidade do miocárdio (BRODDE, 1988; BRISTOW et al., 1986).

Estudos com antagonistas marcados com radioisótopos demonstraram que a porcentagem de adrenoceptores beta-2 varia de 14 a 20 % no miocárdio ventricular humano, e de 20 a 50 % no tecido atrial (MINNEMANN et al., 1981).

BRODDE (1988) observou, em átrios direitos isolados de humanos, que o ISO aumenta a força de contração através da estimulação de adrenoceptores beta-1 e beta-2, enquanto que o agonista seletivo de adrenoceptores beta-2, procaterol, tem efeito inotrópico positivo, predominantemente por estimulação de adrenoceptores beta-2. A NA, entretanto, aumenta a força de contração somente através da estimulação de adrenoceptores beta-1, uma vez que este agonista tem baixa afinidade por adrenoceptores beta-2.

Os experimentos realizados por BRODDE (1988) reforçam os resultados anteriormente obtidos por ARNOLD et al. (1985) e BROWN et al. (1986). Estes resultados indicam que, além de mediar o efeito inotrópico, os adrenoceptores beta-2 atriais também podem estar envolvidos no controle da frequência cardíaca, uma vez que, em voluntários saudáveis, o antagonista beta-2 seletivo, ICI-118551, foi mais potente que o antagonista de adrenoceptores beta-1, bisoprolol, em antagonizar a taquicardia induzida por ISO, quando ambos os antagonistas foram administrados em doses que determinavam a ocupação de mais de 90% dos adrenoceptores beta-2 e beta-1, respectivamente (ARNOLD et al., 1985).

Em ratos, os adrenoceptores atriais beta-2 não participam, de modo considerável da resposta cronotrópica a agonistas de adrenoceptores beta. Apesar de ocorrerem numa proporção de 1:2 com relação ao subtipo beta-1 (O'DONNELL & WANSTALL, 1985; JUBERG et al., 1985), a resposta cronotrópica é mediada por uma população farmacologicamente

homogênea de adrenoceptores beta-1 (BRYAN et al., 1981; CALLIA & DE MORAES, 1984; JUBERG et al., 1985). Este fato, facilita o estudo da seletividade do agonista no modelo experimental em questão.

4. CONTROLE NERVOSO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUENCIA CARDIACA

O controle da pressão arterial média (PA) é feito através de três sistemas principais: o sistema neurovegetativo, o sistema renina-angiotensina, e o sistema arginina-vasopressina (PALLER & LINAS, 1984). Cada um destes sistemas participa, diferentemente, do controle da pressão arterial. Sabe-se que, no rato descerebrado, modelo experimental em que o Sistema Nervoso Central se encontra funcionalmente desconectado do corpo, o sistema renina-angiotensina contribui com 21% para a manutenção da PA, enquanto que o sistema arginina-vasopressina é responsável por apenas 6%. Neste caso, os fatores mais importantes na manutenção da PA são as propriedades intrínsecas do sistema cardiovascular (CARBONELL et al., 1986), expressas pela ação de catecolaminas circulantes sobre os adrenoceptores.

Entretanto sabemos que, no animal normal, a participação destes componentes é diferentemente distribuída. O sistema renina-angiotensina é, provavelmente, ativado pela hipotensão que se segue à cirurgia de descerebração. Esta hipotensão constitui-se em

um poderoso estímulo para a secreção de renina (ROMERO et al., 1976), o que juntamente com a ausência de controle nervoso, o capacita a participar com 21% do controle da PA. Esta participação é, proporcionalmente, maior do que aquela observada no animal íntegro. Neste predomina o sistema nervoso regendo as "propriedades intrínsecas" do sistema cardiovascular.

No leito vascular, os receptores presentes em sítios pré-sinápticos são do subtipo alfa-2 e modulam um mecanismo de retro-alimentação negativo no controle da liberação de NA pelas terminações nervosas simpáticas (LANGER, 1974; HEDQVIST & MOAWAD, 1975). Nos sítios pós-sinápticos, os adrenoceptores que mediam vasoconstrição em veias e artérias podem ser do tipo alfa-1 ou alfa-2 (FLAVAHAN & McGRATH, 1980; ELLIOT & REID, 1983; SHUMMANN & LUES, 1983; SHOJI et al., 1983; EGGLEME et al., 1984; STEEN et al., 1984 a e b; TODA et al., 1984). Os adrenoceptores alfa-2 podem, também, estar localizados nas células endoteliais. Neste caso, sua ativação reduz a contração em alguns vasos sanguíneos, pela liberação do "fator de relaxamento endotelial" (EDRF)(EGLEME et al., 1984). Todavia, a resposta vasodilatadora é mediada principalmente pela ativação de adrenoceptores do subtipo beta-2, localizados nas células musculares lisas que compõem a parede de artérias e veias (O'DONNELL & WANSTALL, 1984).

Os adrenoceptores beta-2 vasculares apresentam uma função diversa segundo sua localização, pré ou pós-sináptica. Os adrenoceptores beta-2 pré-sinápticos são

responsáveis por um mecanismo de retro-alimentação positivo controlador da liberação de NA (ADLER-GRASCHINSKY & LANGER, 1975; STJARNE & BRUNDIN, 1975 e 1976), e os adrenoceptores pós-sinápticos respondem, de modo geral, com um efeito vasodilatador a agonistas beta adrenérgicos.

O controle nervoso da atividade cardíaca se faz, essencialmente, através das duas divisões do Sistema Nervoso Autônomo (SNA): o SNA simpático e o SNA parassimpático. O SNA simpático estimula o automatismo do nódulo sino-atrial(SA), enquanto que o SNA parassimpático o inibe. As alterações na frequência cardíaca envolvem, em geral, uma relação recíproca das duas divisões do SNA. Portanto, um aumento de frequência cardíaca é causado pela diminuição da atividade parassimpática e aumento concomitante da atividade simpática. Com frequência, a diminuição é produzida por mecanismos opostos. Genericamente, nos indivíduos saudáveis em repouso, o tônus parassimpático é dominante. A abolição das influências parassimpáticas pela administração de atropina induz taquicardia acentuada. A abolição dos efeitos simpáticos pela administração de propranolol lentifica o coração de forma apenas moderada.

O nível de PA média de um animal depende do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Mudanças no débito cardíaco podem ser induzidas por alterações da frequência cardíaca (FC), do volume sistólico, ou de ambos. Modificações concomitantes da FC e do volume sistólico não resultam, necessariamente, em alterações do débito cardíaco,

podendo se anular; e em consequência, a PA média do animal não será afetada (BERNE & LEVY, 1990).

Considerando tais fatores, as respostas pressórica e cronotrópica ao NAIN foram avaliadas "in vivo" em ratos cateterizados, sendo comparadas àquelas obtidas ao ISO.

5. pAx

Foram também executados experimentos "in vitro", em átrios direitos isolados de ratos e cobaias, a fim de avaliar a seletividade do NAIN para adrenoceptores do subtipo beta-2. Os resultados obtidos a partir destes experimentos foram analisados pelo Método de Schild.

Na tentativa de definir uma escala universal para avaliar antagonistas, SCHILD, descreveu a escala de pA, de modo que "...a atividade de uma droga pudesse ser expressa em termos de um padrão estável". O valor pAx foi definido como o logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de um antagonista que reduz o efeito de uma dose múltipla do agonista àquele obtido por uma dose única 'x' " (SCHILD, 1947 a; 1949).

A escala "pA" foi considerada, primariamente, como uma escala empírica, mas, sob certas circunstâncias, há uma base teórica que identifica o valor pAz com o valor pK_B (FURCHGOTT, 1955; SCHILD, 1957; GADDUM 1957; ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959). Esta escala serve para medir a potência do antagonista e, teoricamente, para caracterizar sua atividade

e seletividade, permitindo a comparação de resultados obtidos por diferentes laboratórios (SCHILD, 1947 a). Embora os valores de pA de antagonistas sejam independentes da concentração ou do tipo do agonista (SCHILD 1947 a e b), também é possível o uso destes valores para distinguir e caracterizar efeitos de um agonista (KENAKIN, 1982), desde que dois agonistas ativando a mesma população de receptores forneçam o mesmo valor K_B para um dado antagonista sob condições estabelecidas.

O método de Schild, baseado na escala de pA , é também usado para verificar a presença de uma segunda população de receptores contribuindo para a resposta tissular. Este é o caso dos adrenoreceptores beta-1 e beta-2 pós-sinápticos no átrio direito isolado de cobaia, onde ambos os adrenoreceptores participam da resposta cronotrópica a agonistas adrenérgicos não seletivos (MOLENAAR & SUMMERS, 1987). O teste para a constatação de uma segunda população de receptores se baseia no fato de que, a regressão de Schild, na teoria, deveria fornecer uma reta de coeficiente angular igual à unidade quando existe somente uma população de receptores envolvida na resposta. A não satisfação deste critério pode ser uma evidência indireta de que esta condição para o método não foi satisfeita. Tal fato justifica o uso desta técnica para estudar, "in vitro", os efeitos do NAIN.

II - OBJETIVOS

1) Avaliar, "in vivo", as respostas cronotrópica e pressórica ao NAIN em ratos conscientes cateterizados. Observar se há predominância do efeito pressórico sobre o cronotrópico.

2) Analisar os efeitos cronotrópicos do NAIN "in vitro" em átrios de cobaia e de rato. Verificar se o NAIN apresenta seletividade por algum dos subtipos de adrenoceptores beta. Comparar a potência do NAIN à do ISO.

III-MATERIAIS E MÉTODOS

1. EXPERIMENTOS "IN VIVO"

1.1. ANIMAIS

Utilizamos ratos (*Rattus norvegicus*, Hannover, raça albina) Wistar, machos, adultos, pesando de 270 a 330 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram alojados pelo menos por uma semana no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, em gaiolas coletivas comportando, no máximo, 4 animais. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 h escuro/12 h claro, com as luzes acendendo às 7:00 h). Ração e água foram fornecidas "ad libitum".

1.2. MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para medida da pressão arterial média (PA) e da frequência cardíaca (FC), um catéter de "tygon", medindo 15 cm de comprimento, equivalente ao polietileno PE 50, conectado a outro catéter medindo 3 cm de comprimento e equivalente ao PE 10, foi implantado na artéria femoral esquerda do animal. Um catéter semelhante foi implantado na veia femoral esquerda. Este último foi utilizado para a

administração de doses de fármacos durante a obtenção das curvas dose-resposta, enquanto que o primeiro foi usado para avaliar alterações da PA e da FC, em decorrência da ação dos fármacos utilizados. Ambos os catéteres foram fixados adequadamente e seguiram sob a pele até a região dorsal da cabeça do animal, sendo aí exteriorizados e fixados. Os catéteres foram preenchidos com salina a 0,9%, contendo 350 U.I. de heparina/ml. Um clipe de aço inoxidável foi usado para obstruir a extremidade livre de cada catéter. Os catéteres foram lavados com salina heparinizada antes da obtenção das curvas dose-resposta aos agonistas. Todo o procedimento para a implantação dos catéteres foi realizado sob anestesia por hidrato de cloral (i.p., 40 mg/100 g).

Cerca de 24 horas após a implantação dos catéteres, media-se a PA do animal para averiguação de suas condições basais. A FC era obtida a partir do registro pulsátil da PA. Estas medidas, bem como as curvas dose-respostas foram realizadas com o animal acordado, em sua própria gaiola-moradia. Para a obtenção destes parâmetros, o catéter implantado na artéria femoral foi conectado a um tubo de polietileno (PE 50), preenchido com salina e acoplado através de um transdutor de pressão, a um polígrafo Sanborn - Hewlett Packard. As medidas foram realizadas sempre no mesmo horário (entre 14:00 e 17:00 h), a fim de se evitar variações decorrentes da hora do dia.

1.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em sete grupos. Os grupos 1,3 e 5 (ISO) constituem-se, respectivamente, de animais sem pré-tratamento, animais pré-tratados com atropina (3,0 mg/kg) e animais pré-tratados com atropina (3 mg/kg) e metoprolol (0,2 mg/kg), submetidos a doses crescentes de ISO. Os grupos 2,4,6 e 7 (NAIN) constituem-se, respectivamente, de animais sem pré-tratamento, animais pré-tratados com atropina (3 mg/kg), animais pré-tratados com atropina (3 mg/kg) e metoprolol (0,2 mg/kg) (DEL'ITALIA & ALSH, 1989) e animais pré-tratados com atropina e butoxamina (3,5 mg/kg), submetidos a doses crescentes de NAIN. As curvas dose-resposta foram iniciadas, respectivamente, 40 e 20 minutos após os pré-tratamentos com atropina e metoprolol. O pré-tratamento com butoxamina também foi feito com 20 minutos de antecedência ao início das curvas. Foram analisadas as respostas pressórica e cronotrópica obtidas a ambos os agonistas, ISO e NAIN.

TABELA 1: Grupos experimentais utilizados nos experimentos "in vivo" estabelecidos de acordo com o pré-tratamento.

Agonista	Grupos	Pré-Tratamentos
ISO	1	nenhum
	3	atropina
	5	atropina + metoprolol
NAIN	2	nenhum
	4	atropina
	6	atropina + metoprolol
	7	atropina + butoxamina

2. EXPERIMENTOS "IN VITRO"

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados cobaias albinos, machos, adultos (300-350 g) e ratos Wistar, machos, adultos (270-330 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram alojados nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.2. ATRIO DIREITO ISOLADO

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e imediata secção dos vasos sanguíneos cervicais. O átrio direito foi dissecado e montado para registro isométrico das contrações espontâneas em câmara para órgão isolado, contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 0,5; NaH₂PO₄ 1,0; NaHCO₃ 25,0; e glicose 11,0. A solução de incubação foi mantida a 37 °C e borbulhada continuamente com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂).

A tensão estabelecida nos átrios foi a suficiente para obter uma deflexão da pena do polígrafo de 0,5 cm/bat sem considerar ruídos (BUCKNER et al, 1978). Os átrios foram equilibrados por 60 minutos com lavagens a cada 15 minutos, antes da adição de qualquer fármaco. A resposta cronotrópica

à adição de agonistas foi registrada através de um transdutor isométrico de tensão Narco Bio-System, modelo F-60, em um fisiógrafo Narco Bio-System, modelo Narcotrace.

2.3. PRÉ-TRATAMENTOS

2.3.1. Desnervação

As cobaias foram reserpinizadas (5mg/kg, i.p.) 18 a 22 horas antes de sua utilização (JOHANSSON et al., 1990).

Os átrios isolados de ratos foram desnervados "in vitro" pelo pré-tratamento com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA, 10^{-5} M) durante 10 minutos na presença de Krebs-Henseleit isento de NaHCO_3 e na presença de glutathione (20 μM) (APRILIGIANO & HERMSMEYER, 1976). A 6-OHDA foi removida por duas lavagens com o líquido de incubação, respeitando um intervalo de 15 minutos entre elas.

Tal diferenciação no pré-tratamento dos átrios de ratos foi feita a fim de que os resultados obtidos pudessem ser comparados a resultados prévios obtidos nesta preparação, sob as mesmas condições.

2.3.2. Bloqueio do sistema de captação extraneuronal

Em átrios isolados de cobaias, este bloqueio foi estabelecido pela presença contínua de tropolone no líquido de incubação (100 μM) adicionado 55 minutos antes do início

da curva. Não foi feito o bloqueio da captação neuronal, uma vez que o ISO não é substrato para este sistema de captação. Atribui-se a mesma propriedade ao NAIN devido ao tamanho de sua molécula (RUOHO, comunicação pessoal).

Em átrios isolados de rato, este bloqueio foi obtido pela exposição da preparação à fenoxibenzamina (PBZ - 10 μ M) durante 15 minutos, após o pré-tratamento com 6-OHDA. Para a lavagem da preparação, foram efetuadas duas trocas do líquido de incubação com intervalos de 15 minutos.

2.3.3. Bloqueio dos adrenoceptores alfa

O bloqueio de adrenoceptores alfa em átrios direitos isolados de cobaias foi obtido pela presença contínua de fentolamina no líquido de incubação. Esta foi adicionada na concentração de 10 nM com 45 minutos de antecedência ao início da curva.

Em átrios de ratos, este bloqueio foi obtido pela adição de fenoxibenzamina (10 μ M).

2.4. CURVAS CONCENTRAÇÃO - EFEITO A AGONISTAS BETA ADRENERGICOS

Após o período de estabilização e pré-tratamento, foram determinadas curvas concentração efeito, pelo método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963), aos efeitos cronotrópicos do

ISO, da adrenalina (ADR), ou do NAIN. Os incrementos de concentração foram de 0,5 unidade logarítmica. Consideramos que o efeito máximo foi obtido quando a adição subsequente de três concentrações crescentes do agonista não causou aumento da resposta previamente observada.

A sensibilidade da preparação foi avaliada pelo valor pD_2 , que apresenta distribuição normal (FLEMING et al., 1972) e corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50 % da resposta máxima (CE_{50}).

2.5. DETERMINAÇÃO DO VALOR pA_2

Os valores de pA_2 foram estimados de acordo com ARUNLAKSHANA & SCHILD (1959). Estabelecemos um período de equilíbrio de 60 min para o propranolol e de 45 min para o metoprolol. As razões entre as doses equiefetivas (DR) para o NAIN foram determinadas, sendo DR a razão entre as CE_{50} obtidas na presença de antagonista e na ausência de antagonista. A regressão de Schild foi determinada pelo cotejamento gráfico de $\log(DR-1)$ vs $-\log[B]$ (concentração molar do antagonista). A reta que define a competitividade do antagonismo foi determinada pela análise de regressão dos quadrados mínimos. Os valores de pA_2 foram calculados a partir da equação: $pA_2 = \log(DR-1) - \log[B]$.

3. ANALISE DOS DADOS

Os dados são apresentados como a média \pm EPM e foram analisados pelo teste-t de Student para amostras não pareadas e Análise de Variância (ANOVA), com o auxílio do programa Microstat. Foram considerados estatisticamente significantes valores com $P < 0.05$.

4. FARMACOS, SAIS E SOLUÇÕES

- cloreto de sódio (Merck, Sharp & Donne)
- cloridrato de butoxamina (Burroughs Wellcome)
- cloridrato de fentolamina (Ciba Co.)
- cloridrato de (\pm)isoproterenol (Sigma Chemical Co.)
- cloridrato de propranolol (Sigma Chem. Co.)
- cloridrato de reserpina (Sigma Chem. Co.)
- cloridrato de tropolone (Aldrich Co.)
- hidrato de cloral (Reagen)
- NAIN : N-(p-azido-m-iodofeniletilamidoisobutil)
noradrenalina (RESEK & RUOHO, 1988)
- sulfato de atropina (Sigma Chemical Co.)
- tartarato de (\pm)-metoprolol (Sigma Chemical Co.)

Nos experimentos "in vivo" , todos os fármacos foram dissolvidos em água desionizada ou salina 0,9%, e preparados

diariamente antes do uso, sendo em seguida descartados.

Nos experimentos "in vitro", as soluções de foram preparadas em salina a 0,9% com 0,05% de metabissulfito de sódio. As soluções de NAIN foram protegidas da luz e as curvas concentração-efeito ao NAIN foram obtidas em sala escurecida (RUOHO, comunicação pessoal).

IV- RESULTADOS

1. EFEITO CRONOTRÓPICO

Uma vez que é possível estabelecer uma relação entre a dose do agonista adrenérgico administrada e a resposta observada, através de curvas dose-efeito, os resultados obtidos confirmam que a medida da FC e da PA média, realizada em animais vivos e acordados, pode ser utilizada para o estudo da resposta do sistema cardiovascular a agonistas de adrenoceptores.

A figura 2 ilustra curvas dose-efeito obtidas em ratos para o efeito cronotrópico do ISO e do NAIN, na ausência de pré-tratamento. Observamos que não há alteração de FC para doses crescentes de NAIN, enquanto que o ISO induziu um aumento de até 140 bat/min na frequência cardíaca (FC varia de 453 ± 4 até 585 ± 19 bat/min).

O padrão de respostas ao ISO e ao NAIN em animais pré-tratados com atropina não se altera, quando comparado àquele obtido na ausência de pré-tratamento com atropina (Fig. 3). Não se observa aumento de FC em resposta ao NAIN, e a resposta ao ISO se mantém.

Na figura 4 são apresentadas curvas dose-efeito para o efeito cronotrópico do ISO e do NAIN, na presença de atropina e metoprolol. Verificamos que as respostas cronotrópicas induzidas por ISO e NAIN não apresentam diferença estatística neste caso ($P > 0,05$) e que não há alteração na FC em resposta a doses crescentes dos agonistas, exceto em resposta à dose de 1,0 ug/100 g de

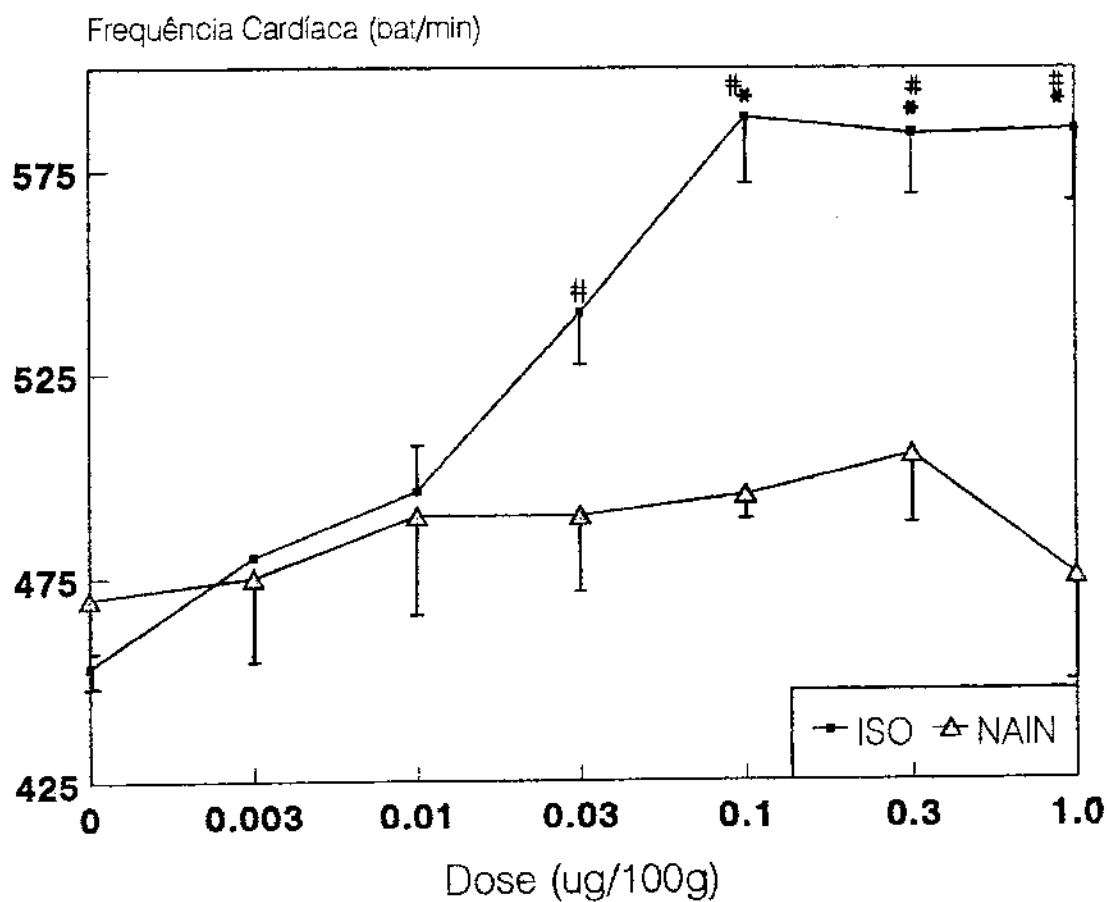


FIG. 2: Resposta cronotrópica ao ISO (n=7) e ao NAIN (n=8) de ratos conscientes não pré-tratados. As barras verticais representam o EPM (erro padrão da média). FC_B - frequência cardíaca basal.
 * P < 0.05 (respostas do ISO e NAIN)
 # P < 0.05 (respostas do ISO e FC_B)

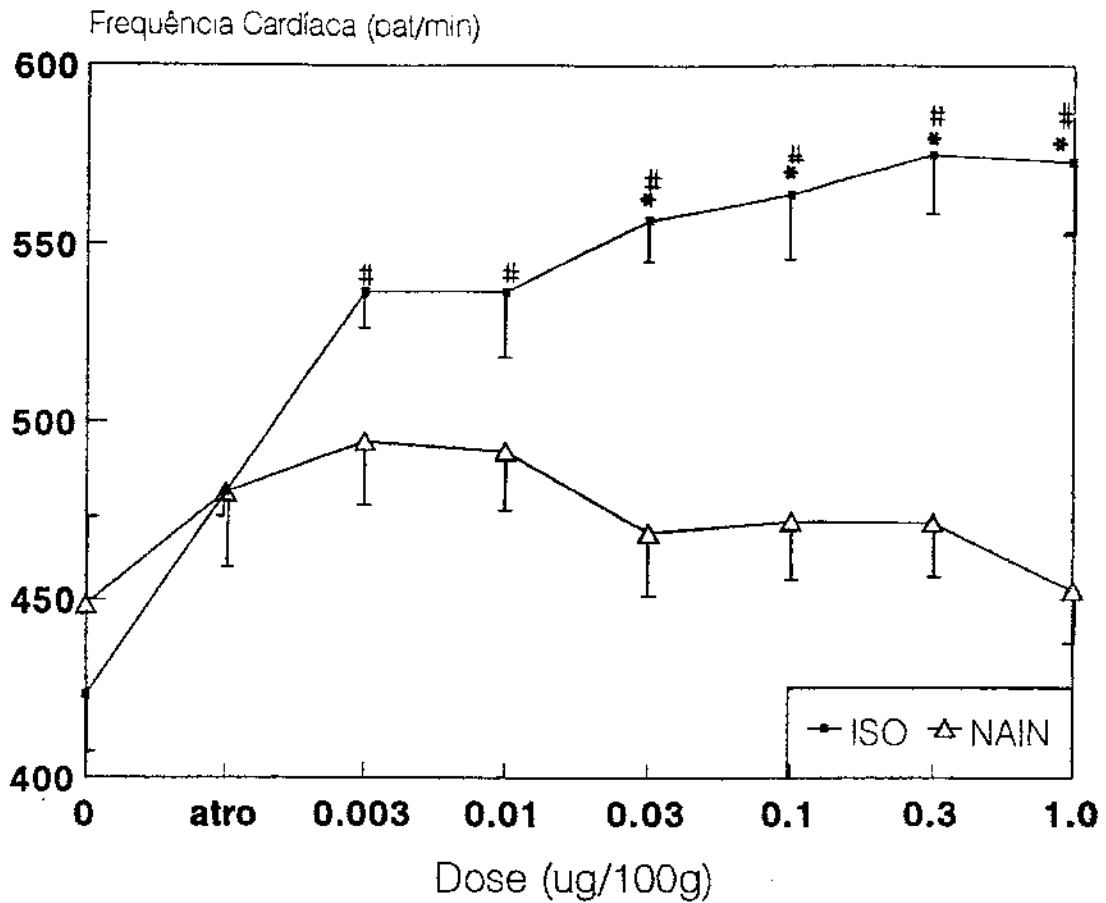


FIG. 3: Resposta cronotrópica ao ISO (n=6) e ao NAIN (n=6) de ratos conscientes pré-tratados com atropina (3 mg/Kg) 20 minutos antes do início da curva. As barras verticais representam o EPM. FC_B e FC_{atro} - frequência cardíaca basal e após o pré-tratamento com atropina, respectivamente.
 * $P < 0.05$ (respostas do ISO e NAIN)
 # $P < 0.05$ (respostas do ISO e FC_{atro})

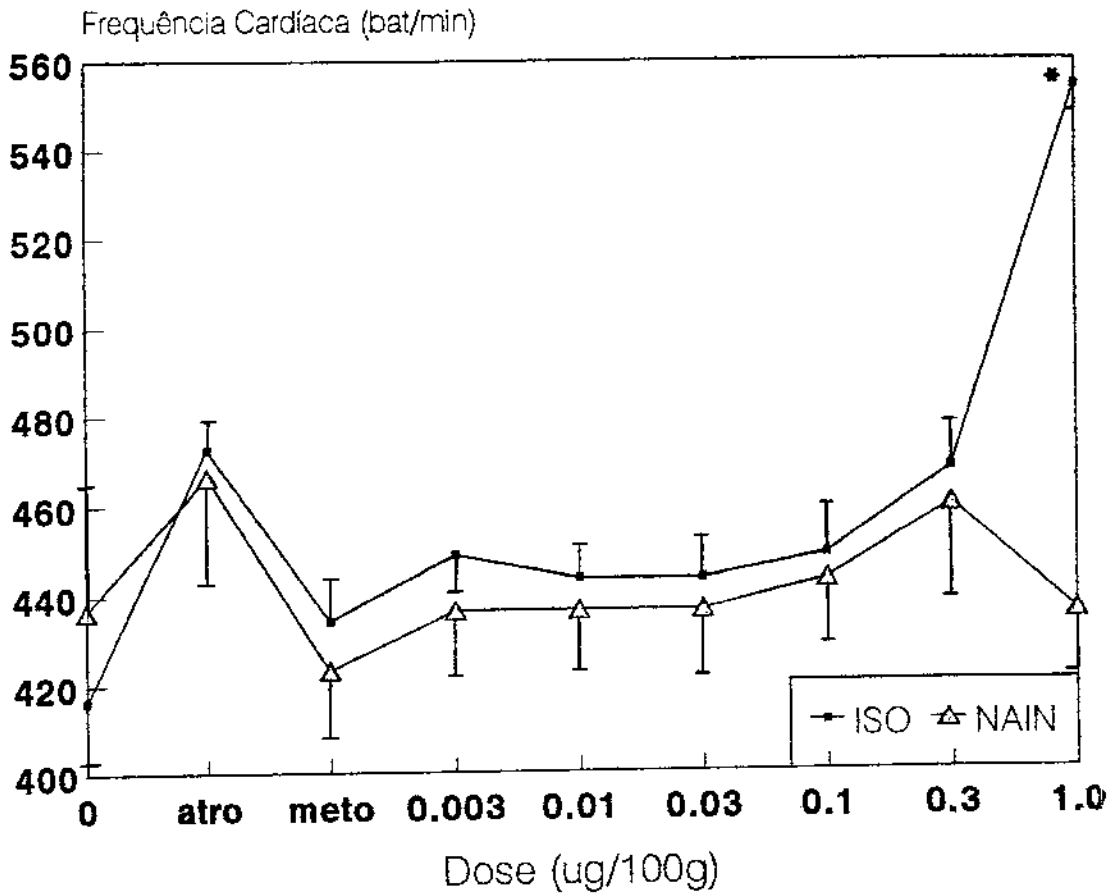


FIG. 4: Resposta cronotrópica ao ISO (n=9) e ao NAIN (n=11) de ratos conscientes pré-tratados com atropina (3 mg/Kg) e metoprolol (0,2 mg/Kg), respectivamente, 40 e 20 minutos antes do início da administração de ISO ou NAIN. As barras verticais representam o EPM. FC_B , FC_{atro} , e FC_{meto} - frequência cardíaca basal, após o pré-tratamento com atropina, e após o pré-tratamento com atropina e metoprolol, respectivamente.

* $P < 0.05$ (respostas entre o ISO e o NAIN)

ISO, que promoveu um aumento súbito do cronotropismo de aproximadamente 90 bat/min em relação à FC deste grupo obtida em resposta à dose anterior de ISO, 0,3 ug/100 g ($P < 0,05$).

A avaliação da resposta cronotrópica ao ISO nas três condições experimentais possibilita verificar a qualidade de nossos pré-tratamentos, uma vez que permite observar diferenças estatisticamente significantes em resposta ao ISO nestas condições (Fig. 5). Na ausência de pré-tratamento há um aumento significativo ($P < 0,05$) do cronotropismo em resposta à menor dose de ISO (0,003 ug/100 g), sendo que, em resposta à dose mais elevada de ISO, a FC atinge o valor médio de 585 ± 19 bat/min. Após o pré-tratamento com atropina, o padrão de respostas ao ISO se mantém. Não há alteração da resposta máxima, que atinge o valor de 573 ± 17 bat/min, porém o aumento de FC é mais acentuado em resposta às três menores doses de ISO. Na presença de atropina e metoprolol, não observamos aumento do cronotropismo em resposta ao ISO, exceto em resposta à sua dose máxima (1,0 ug/100 g), quando a FC atinge o valor de 555 ± 6 bat/min (Fig. 5).

Uma vez que estudos "in vitro" propiciam melhor isolamento das variáveis, também foram obtidas curvas concentração-efeito (CCE) para o efeito cronotrópico do NAIN em átrios direitos isolados de cobaias e de ratos. Estas foram comparadas àquelas obtidas a outros agonistas beta adrenérgicos.

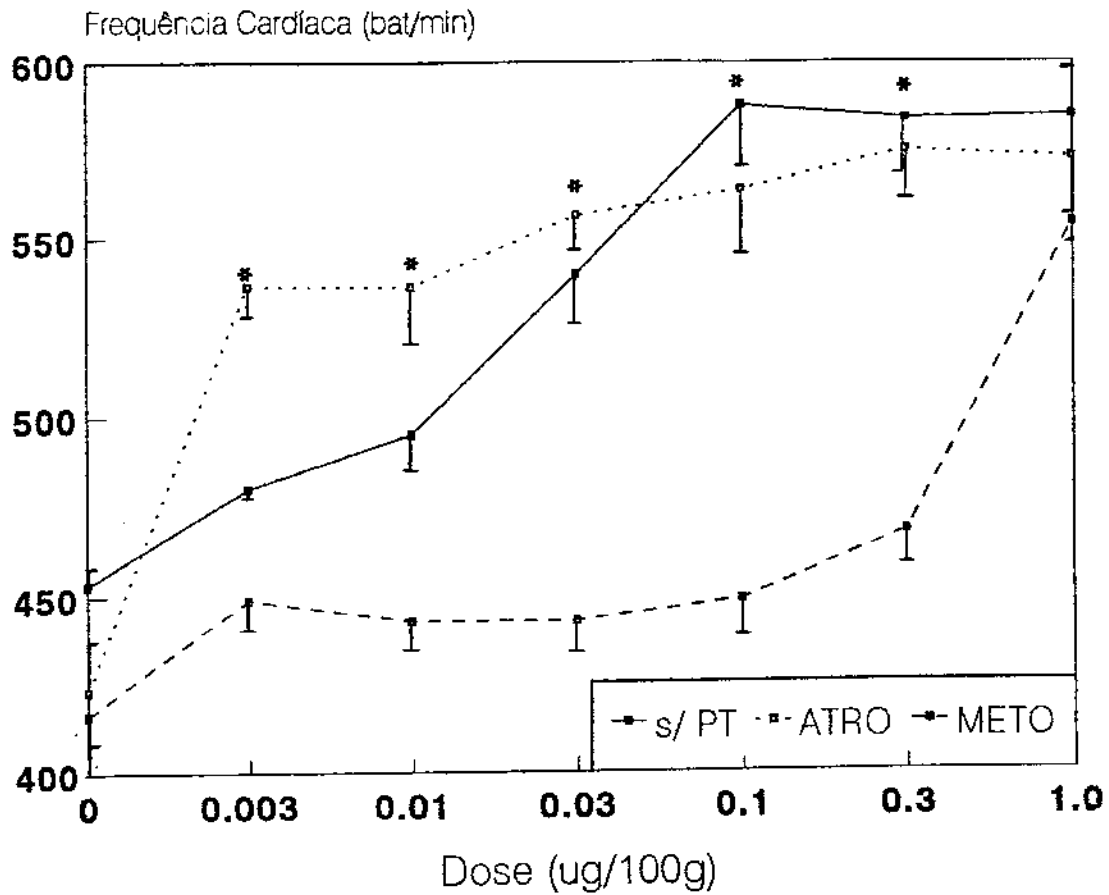


FIG. 5: Resposta cronotrópica de ratos conscientes ao ISO em três condições experimentais: não pré-tratados (n=7), pré-tratados com atropina (3 mg/Kg) (n=6) e pré-tratados com atropina e metoprolol (0,2 mg/Kg) (n=9). As barras verticais representam o EPM. FC_i - frequência cardíaca imediatamente antes do início da curva (FC_B, FC_{atro} ou FC_{meto})
 * P < 0.05 (respostas ao NAIN nas três condições experimentais / ANOVA).

Foram obtidas CCE para o NAIN em átrios direitos de cobaias com concentrações variando entre 0.1 nM a 1 uM. A frequência basal das preparações era de 165 ± 9 bat/min e a resposta máxima induzida por NAIN correspondeu a um aumento de 151 ± 13 bat/min (Fig. 6, Tabela 2), não diferindo daquele determinado pelo ISO (dados não apresentados). O valor da CE_{50} para o efeito cronotrópico do NAIN é de $7,7 (2,3-26) \times 10^{-10}$ M.

Na figura 7 são apresentadas as CCE obtidas em átrios direitos isolados de ratos para o efeito cronotrópico de diferentes agonistas, a saber ISO, NAIN e ADR. A potência do NAIN foi comparada à destes agonistas através de suas respectivas CE_{50} . A frequência basal média foi de 270 ± 14 bat/min (n=16). As curvas são expressas como porcentagem da resposta máxima ao ISO, sendo esta igual a um acréscimo de 146 ± 19 bat/min. Em átrios direitos isolados de ratos observamos que o NAIN apresenta um valor de CE_{50} inferior ao do ISO e ADR (Tabela 2). Foram calculadas as razões entre as CE_{50} do NAIN, ISO, e ADR observadas em átrios direitos isolados de ratos. O átrio de rato parece diferenciar o NAIN de outros agonistas quanto à sua potência (CE_{50} ISO / CE_{50} NAIN = 8,98 ; CE_{50} ADR / CE_{50} NAIN = 957).

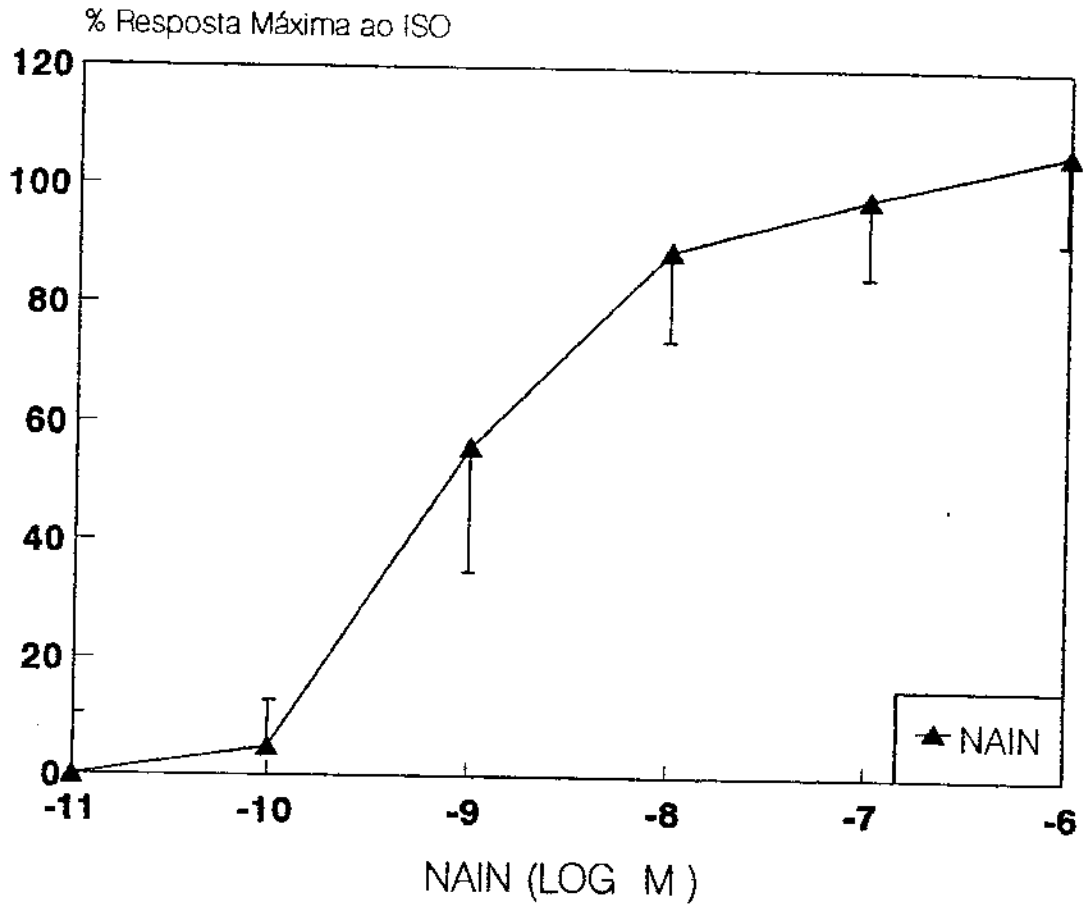


FIG. 6: Curva concentração-efeito para o efeito cronotrópico do NAIN em átrios direitos isolados de cobaias (n=5). As barras verticais representam o EPM.

TABELA 2: Valores CE_{50} de diferentes agonistas testados em átrios direitos isolados de cobaias e de ratos.

Animal Agonista	CE_{50}^a (LC)	F.I. ^b (bat/min)	Resp.Máx. ^c (bat/min)	N ^d
COBAIA				
NAIN	$7,7 \times 10^{-10}$ (2,3 - 26)	165 ± 9	151 ± 13	5
RATO				
NAIN	$2,5 \times 10^{-11}$ (0,6 - 11,3)	205 ± 19	147 ± 11	4
ISO	$2,3 \times 10^{-10}$ (0,7 - 6,9)	314 ± 17	146 ± 19	6
ADR	$2,45 \times 10^{-8}$ (1,9 - 3,1)	261 ± 11	151 ± 10	6

a. CE_{50} : valores médios acompanhados do limite de confiança

b. Frequência Inicial (valores médios \pm EPM)

c. Resposta Máxima (valores médios \pm EPM)

d. Número de experimentos.

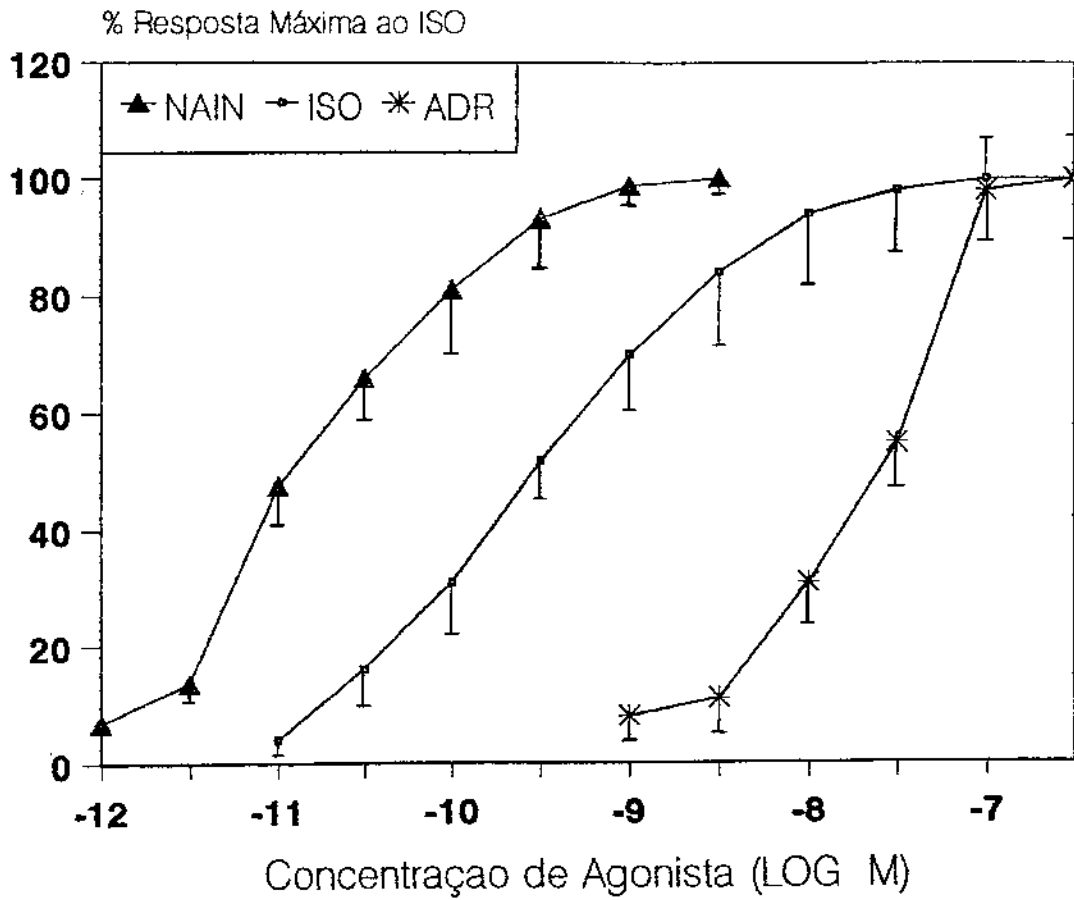


FIG. 7: Curvas concentração-efeito para o efeito cronotrópico do NAIN (n=4), do ISO (n=6) e ADR (n=6) em átrios direitos isolados de ratos. Os tecidos foram pré-tratados "in vitro" com 6-OHDA (10^{-5} M) e fenoxibenzamina ($10 \mu\text{M}$). Os resultados foram expressos como porcentagens da resposta máxima ao ISO. As barras verticais representam o EPM.

O gráfico de Schild obtido para o propranolol, utilizando o NAIN como agonista é apresentado na figura 8. O coeficiente angular indica que o antagonismo do NAIN pelo propranolol em átrios de cobaia é do tipo competitivo, uma vez que o seu valor não difere da unidade. Entretanto, o efeito do NAIN não é competitivamente antagonizado por metoprolol em concentrações variando de 1 a 10 nM, isto se verifica pelo valor do coeficiente angular, que difere significativamente de 1,0 ($P < 0,05$). Porém, aumentando a concentração de metoprolol para uma faixa de 100 a 1000 nM, obtivemos um valor igual à unidade para o coeficiente angular ($P > 0,05$) e verificamos que se estabelece um antagonismo competitivo entre o NAIN e o metoprolol (Fig. 9). Os valores de pA_2 , assim como o dos coeficientes angulares para o propranolol e metoprolol, são apresentados na tabela 3.

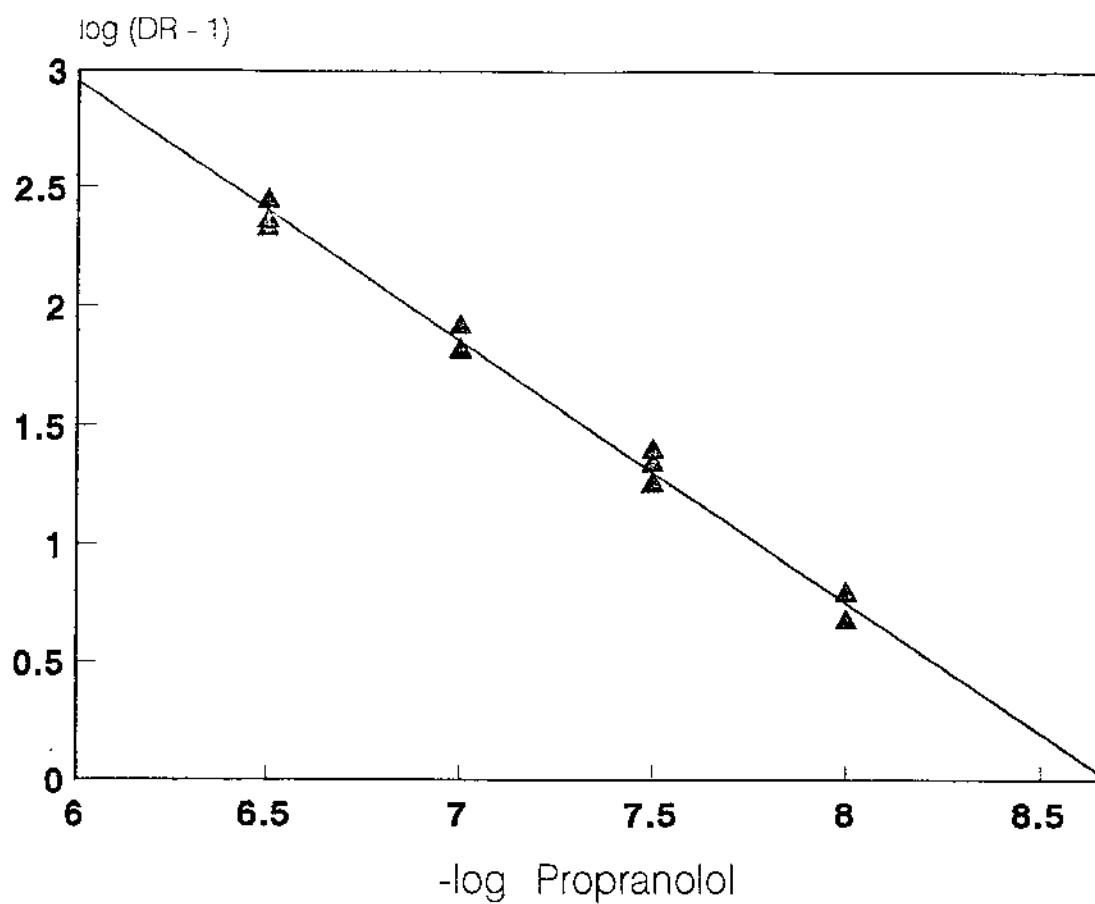


FIG. 8: Gráfico de Schild para o antagonismo competitivo do efeito cronotrópico do NAIN pelo propranolol em átrios direitos isolados de cobaias. $pA_2 = 8.83 \pm 0.99$; coeficiente angular = 1.09 ± 0.06 .

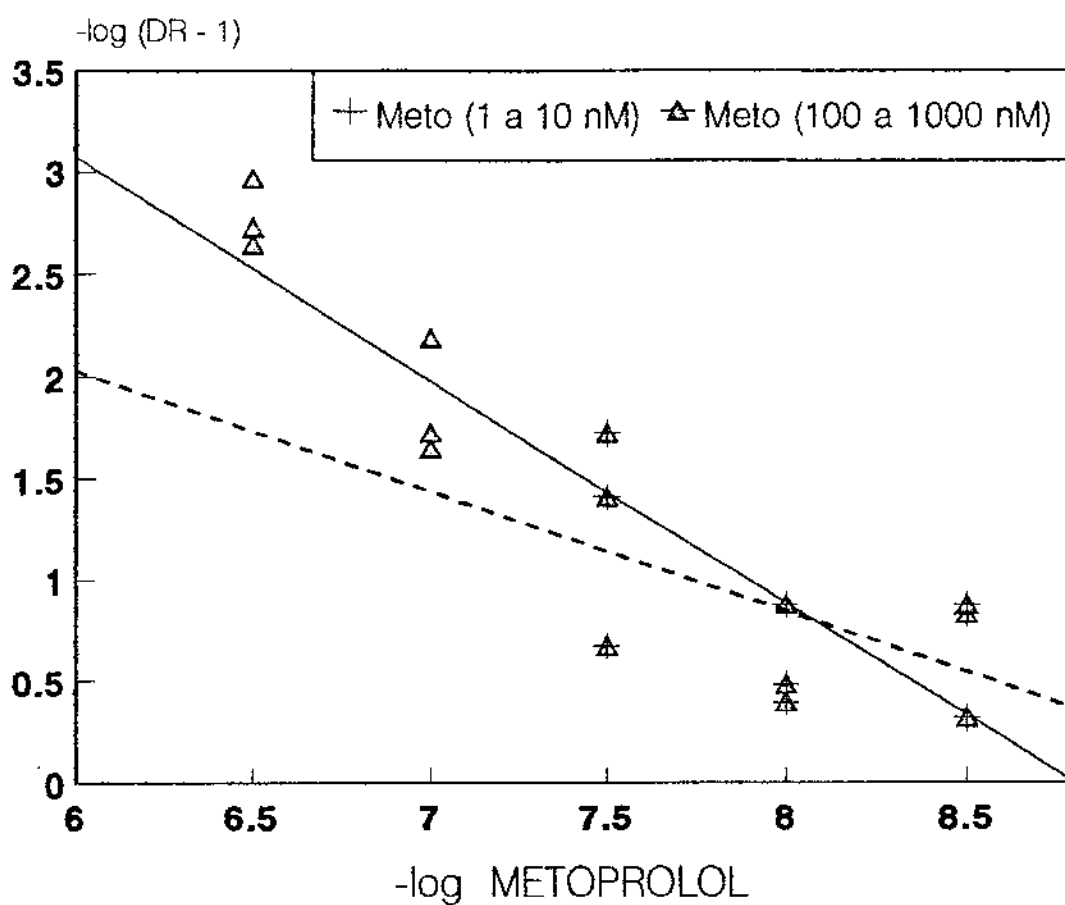


FIG. 9: Gráfico de Schild para o antagonismo competitivo do efeito cronotrópico do NAIN pelo metoprolol em átrios direitos isolados de cobaias. $pA_2 = 8.82 \pm 0.50$; coeficiente angular = 1.08 ± 0.09 .

TABELA 3: Valores de pA_2 do propranolol e do metoprolol em átrios direitos isolados de cobaias usando o NAIN como agonista.

Antagonista	N ^a	pA_2 (EPM) ^d	Coefficiente angular (LC) ^e
Propranolol	12	8.83 (0.09)	1.09 (0.95-1.22)
	9 ^b	----	0.62 (0.55-0.68)
Metoprolol	12 ^c	8.82 (0.50)	1.08 (0.88-1.27)

a. número de experimentos

b. concentrações de metoprolol na faixa de 1 a 10 nM.

c. concentrações de metoprolol na faixa de 100 a 1000 nM.

d. valores médios (EPM)

e. limite de confiança

2. EFEITO PRESSÓRICO

Os efeitos pressóricos do NAIN foram inicialmente comparados aos do ISO na ausência de qualquer pré-tratamento (Fig.10). Verificamos uma redução significativa da PA de 20 mmHg em resposta a menor dose de NAIN (0,003 ug/100g), enquanto que uma redução equivalente ocorre com uma dose três vezes superior de ISO (0,01 ug/100 g). O aumento das doses de NAIN não promove redução adicional da PA, como ocorre em resposta ao ISO e a administração da maior dose de NAIN (1.0 ug/100 g) determina o retorno do valor da PA até os níveis basais (124 ± 4 mmHg) enquanto que uma dose equivalente de ISO promove uma acentuada redução nos valores da PA a qual atinge 75 ± 5 mmHg.

Para verificar o efeito do NAIN, na presença de bloqueio vagal, fizemos medidas de PA após administração de atropina (3 mg/kg). A figura 11 mostra curvas obtidas ao ISO e ao NAIN nestas condições. Observa-se que o valor basal da PA não se altera após o pré-tratamento com atropina (PA_{atrop}), assim como o padrão de respostas obtido. Observamos redução máxima da PA em resposta a menor dose de NAIN ($P < 0,05$) e retorno ao valor basal em resposta à sua dose máxima ($P > 0,05$). O ISO induz uma redução de PA dependente da dose.

Na figura 12 é apresentada, em valor relativo, a curva dose-efeito para o efeito pressórico do NAIN obtida na presença de atropina e comparada àquela obtida na presença

de atropina e butoxamina. Verificamos que a redução de PA em resposta à dose 0,003 ug/100g de NAIN é bloqueada pelo pré-tratamento com butoxamina.

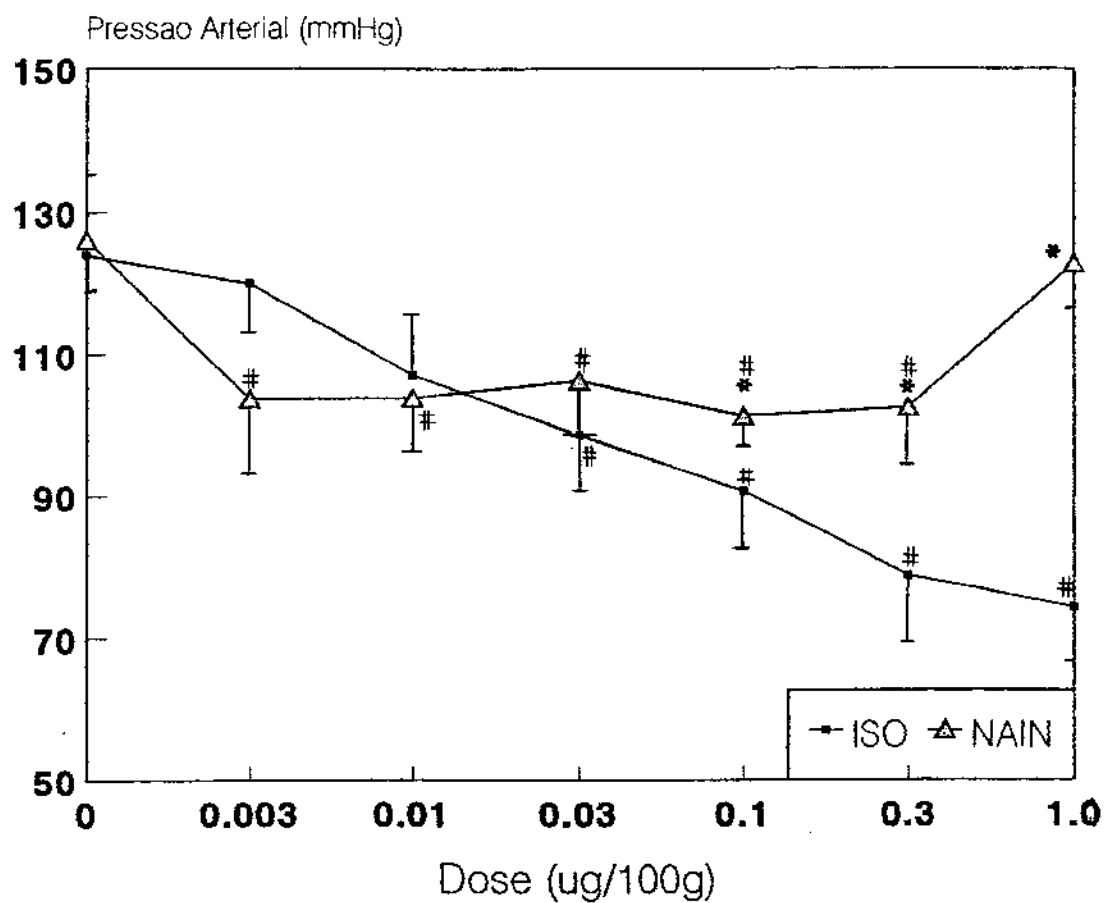


FIG. 10: Resposta pressórica ao ISO (n=7) e ao NAIN (n=8) de ratos conscientes não pré-tratados. As barras verticais representam o EPM.
 PA_B - pressão arterial basal
 * P < 0.05 (respostas do ISO e NAIN)
 # P < 0.05 (pontos assinalados e PA_B)

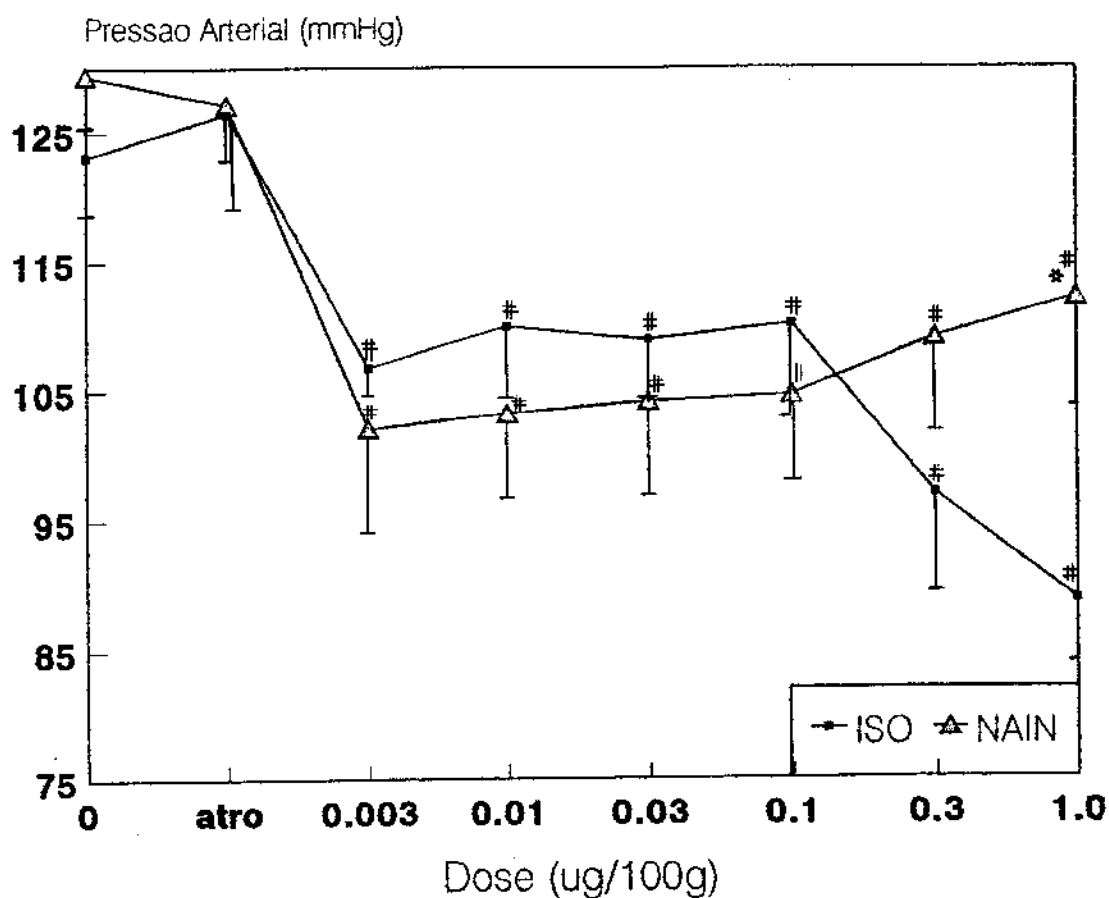


FIG. 11: Resposta pressórica ao ISO (n=6) e ao NAIN (n=7) de ratos conscientes pré-tratados com atropina (3 mg/kg). As barras verticais representam o EPM. PA_B e PA_{atro} - pressão arterial basal e após o pré-tratamento com atropina.
 * P < 0.05 (respostas do ISO e NAIN)
 # P < 0.05 (ponto assinalado e PA_{atro})

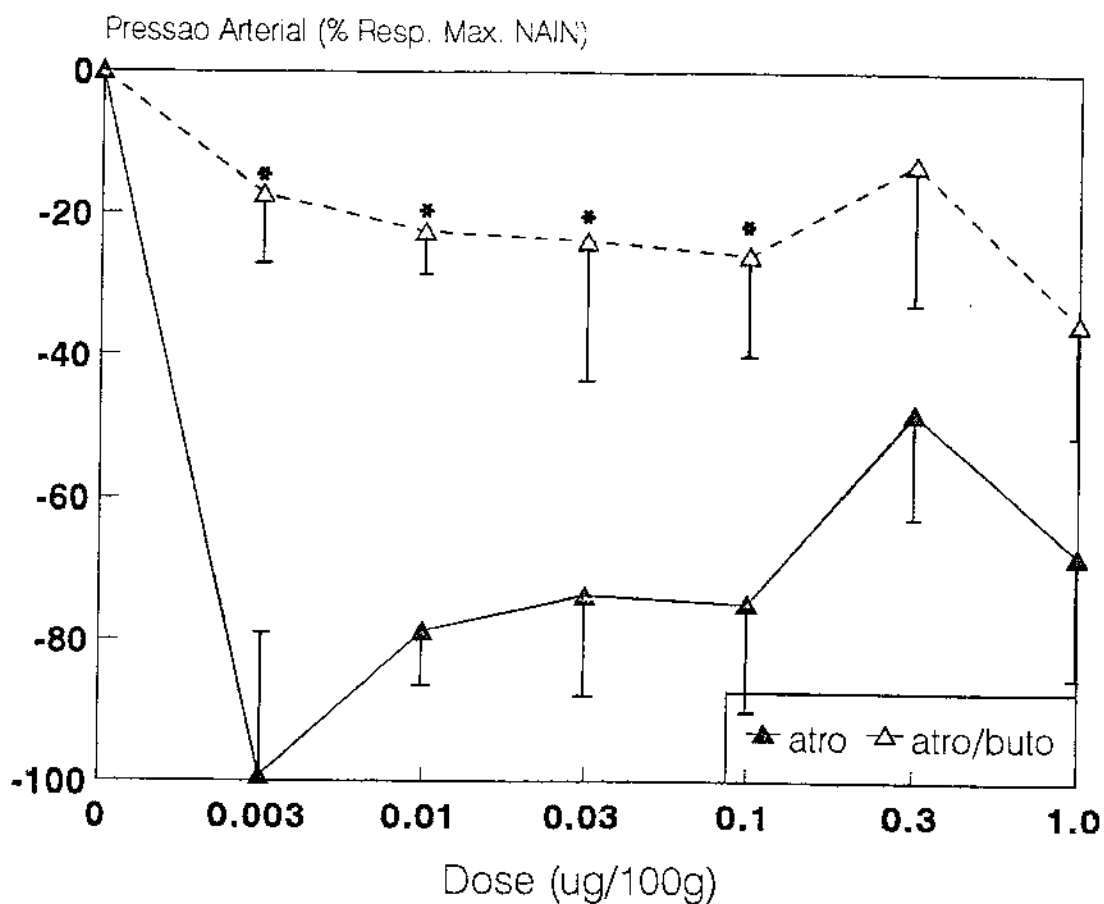


FIG. 12: Resposta pressórica ao NAIN de ratos conscientes pré-tratados com atropina (3 mg/kg) (n=6) e, com atropina e butoxamina (3,5 mg/kg) (n=6). Os resultados foram expressos como porcentagens da resposta máxima ao NAIN. As barras verticais representam o EPM.
* P < 0.05 (respostas do NAIN na presença de atropina e na presença de atropina e butoxamina)

V- DISCUSSÃO

Nos experimentos "in vivo", foram avaliadas a FC e a PA médias de ratos submetidos a doses crescentes de ISO ou NAIN, sabendo-se que estes parâmetros se alteram por modificações da resistência vascular periférica e do volume sistólico, sob controle do SNA, sujeito a ação de catecolaminas, sintéticas ou não.

Ao avaliarmos a resposta cronotrópica ao ISO ou NAIN, esperávamos observar um aumento do cronotropismo, que é mediado em ratos por uma população funcionalmente homogênea de adrenocetores do subtipo beta-1 (BRYAN et al., 1981; CALLIA & DE MORAES, 1984; JUBERG et al., 1985). Este efeito realmente foi verificado para o ISO em animais não pré-tratados com metoprolol. Entretanto, para o NAIN, este efeito cronotrópico positivo não foi observado.

Segundo uma hipótese de LEVINE & LEENEN (1989), elaborada com resultados obtidos a partir de estudos realizados com seres humanos, a ativação de adrenocetores beta-2 vasculares poderia desencadear, um mecanismo reflexo incluindo a participação de barocetores, o qual promoveria aumento do tônus simpático e/ou diminuição do tônus parassimpático. Sabemos, que em experimentos "in vitro", o NAIN é um agonista de adrenocetores beta (RESEK & RUOHO, 1988). Consequentemente, esperávamos obter uma resposta hipotensora, podendo ou não estar a mesma associada a um aumento do cronotropismo. Este aumento poderia ser mediado

por ativação direta de adrenocetores beta-1 atriais ou por ativação reflexa. Para diminuir a participação do SNA parassimpático, realizamos pré-tratamento com atropina, o que nos permitiu fixar o tônus parassimpático enquanto variável, padronizando-o.

Foi verificado que o metoprolol é 20 vezes mais potente em bloquear os adrenocetores beta-1 do que os beta-2 (van HERWAARDEN et al., 1977). Isto é corroborado pela observação de que, indivíduos recebendo metoprolol apresentam uma modesta vasodilatação em resposta a NA, enquanto que aqueles que receberam propranolol respondem com vasoconstrição ao mesmo agonista (van HERWAARDEN et al., 1977; JOHNSSON, 1979; MINNEMANN et al., 1979; HOUBEN et al., 1982; HIATT et al., 1984). Partindo-se deste fato, temos que o pré-tratamento com metoprolol reduz a participação dos adrenocetores beta-1 na resposta cronotrópica consequente da ativação reflexa do simpático via barocetores ou de possível estimulação direta, permitindo melhor avaliação dos efeitos do agonista em estudo. Conforme as expectativas, a resposta cronotrópica ao ISO é abolida na presença de metoprolol, e a resposta ao NAIN não se altera.

Os pré-tratamentos com atropina e metoprolol respectivamente, enfatizam a resposta cronotrópica a agonistas de adrenocetores beta por suprimir o efeito bradicardizante vagal e atenuam a mesma por bloqueio dos adrenocetores beta-1. A eficiência destes pré-tratamentos

pode ser verificada comparando-se as respostas obtidas ao ISO na presença dos mesmos.

Foi observado em humanos que a infusão de agentes agonistas de adrenoreceptores beta adrenérgicos como o ISO resulta não só em um aumento da FC e da força de contração, como também, em considerável redução da resistência vascular periférica e, portanto, aumento do retorno venoso, via estimulação de adrenoreceptores beta-2 (GREEN, 1977; LEENEN et al., 1983).

Quando avaliamos as respostas pressóricas obtidas ao NAIN na ausência de pré-tratamento, observamos uma redução da PA apenas em resposta à menor dose de NAIN, valor que se mantém com as dose subsequentes, retornando ao valor basal em resposta à dose de 1,0 ug/100g. Este fato poderia sugerir uma estimulação de adrenoreceptores beta-2 vasculares pós-sinápticos por pequenas doses do NAIN.

Nos vasos a acetilcolina atua como um vasodilatador endotélio-dependente e somente causa relaxamento do músculo liso vascular na presença de endotélio íntegro, podendo até causar contração dos músculos vasculares desprovidos de endotélio (WALTER, 1989). Tais vasodilatadores estimulam as células endoteliais a produzirem EDRF, recentemente identificado como NO (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987). Entretanto, há indicações de que o controle do tônus vascular é exercido, primordialmente, pelo SNA simpático não havendo participação direta da atividade parassimpática sobre o tônus vascular.

Sendo a PA definida pela resistência vascular periférica e pelo débito cardíaco, possíveis alterações da PA decorrente da atividade parassimpática podem ser observadas por efeito indireto da mesma, que predomina no controle do cronotropismo cardíaco. As curvas concentração-efeito obtidas para o efeito pressórico do NAIN e ISO na presença de atropina não apresentaram alterações no seu padrão de respostas. Entretanto, verificamos uma menor redução de PA em resposta ao ISO, possivelmente devido à supressão do efeito modulatório parassimpático sobre o cronotropismo cardíaco. Tal hipótese é corroborada por resultados obtidos por ARNOLD & McDEVITT (1984), que evidenciam a importância do tônus vagal na resposta cronotrópica a agonistas não seletivos de adrenoceptores beta. Resultados obtidos pelos mesmos autores justificam também o uso da atropina como pré-tratamento.

A administração de um agonista beta-2 como a terbutalina, induz alterações hemodinâmicas similares às obtidas em resposta a agonistas não seletivos (BUCH et al., 1983; STRAUSS et al., 1986). A terbutalina, embora seletiva para adrenoceptores beta-2, apresenta também alguma atividade estimulatória sobre os adrenoceptores beta-1 (DANILO & ROSEN, 1982). Além disto, o aumento do tônus simpático, bem como estimulação de adrenoceptores beta-2 pré-sinápticos, podem ativar os adrenoceptores beta-1 pós-sinápticos indiretamente (VINCENT et al., 1982).

Procurando isolar os efeitos vasculares mediados por

adrenoceptores beta-2, utilizamos a butoxamina, antagonista beta-2 seletivo. Segundo WILKENFIELD & LEVY (1986), uma dose de 1,0 mg/kg de butoxamina seria suficiente para bloquear os efeitos vasodilatadores do ISO, enquanto que a resposta cronotrópica permanece inalterada com doses superiores a 4 mg/kg. O bloqueio efetivo da resposta cronotrópica do ISO é observado com doses superiores a 20 mg/kg deste antagonista (LEVY, 1966; BURNS & SALVADOR, 1967). Verificamos que, na presença de 3,5 mg/kg de butoxamina, a redução de 31 ± 6 mmHg da PA, em resposta à menor dose de NAIN, foi suprimida. Esta redução representa 66% daquela observada em resposta à dose de 1,0 ug/100g de ISO. Entretanto, os resultados obtidos "in vivo" não permitem conclusões claras quanto aos efeitos do NAIN ou à sua seletividade.

Já os dados obtidos com experimentos "in vitro" indicam que, em átrios direitos isolados de ratos e cobaias, o NAIN é um potente agonista não seletivo de adrenoceptores beta.

Experimentos realizados por DE MORAES demonstraram que o NAIN promove relaxamento do brônquio esquerdo de cobaia pré-contráido com carbacol. Neste tecido predomina uma população de adrenoceptores do subtipo beta-2. Este relaxamento ocorre em uma faixa de concentrações que varia de 0,1 nM a 10 nM. O valor pD_2 para o efeito inibitório do NAIN nestas condições é $8,89 \pm 0,12$. O efeito relaxante máximo do NAIN não difere daquele obtido com a papaverina (DE MORAES, comunicação pessoal).

Em átrios direitos isolados de cobaias, onde uma população mista de adrenoceptores modula o cronotropismo, foram observadas respostas cronotrópicas significantes com concentrações de NAIN tão baixas quanto 0,3 nM. Também não foram observadas diferenças nos valores pD_2 obtidos para o NAIN em átrio direito e brônquio de cobaia, assim como, não se observam diferenças entre as respostas máximas obtidas ao NAIN ou ao ISO.

Nesta mesma preparação, átrio direito isolado de cobaia, os estudos foram estendidos para a obtenção do gráfico de Schild. A regressão de Schild propicia o cálculo da constante de dissociação de um antagonista competitivo para uma população de receptores (K_B), a qual é um parâmetro de considerável valor na classificação sistemática de fármacos e receptores em vários tecidos. Teoricamente, o K_B é único para cada par antagonista-receptor. Porém, em termos práticos, o K_B também constitui um meio para delinear a ação do agonista, desde que, dois agonistas ativando o mesmo receptor deveriam fornecer o mesmo valor de K_B estimado para um dado par antagonista-receptor.

A estimativa do valor K_B pode ser feita através do valor de pA_2 obtido na regressão de Schild, quando esta apresenta um coeficiente angular que não difere estatisticamente da unidade. Este coeficiente permite a diferenciação entre casos de antagonismo competitivo e não competitivo. Um coeficiente angular menor que a unidade ocorre, entre outras situações, naquela em que o agonista

ativa um segundo tipo de receptor não bloqueado pelo antagonista (FURCHGOTT, 1972 e 1976). O coeficiente angular do gráfico de Schild é independente da seletividade do agonista quando se usa um antagonista não seletivo. Em contrapartida, na presença de um antagonista seletivo, o valor do coeficiente angular é dependente da seletividade do agonista. Conforme esperado, o propranolol bloqueou efetivamente o efeito cronotrópico do NAIN numa faixa nM de concentrações e o coeficiente angular do gráfico de Schild não diferiu de 1,0. Nenhum dos resultados obtidos até então excluiria a possibilidade de o NAIN estar ativando unicamente a população de adrenoceptores beta-2 em átrios de cobaia. Entretanto, o coeficiente angular do gráfico de Schild obtido para o metoprolol numa faixa de concentrações de 1 a 10 nM difere de 1,0; igualando-se à unidade e àquele obtido para o propranolol com o uso de concentrações mais elevadas de metoprolol (100 a 1000 nM).

Resultados obtidos por MILNOR (1986) demonstraram que a regressão de Schild pode ser um método relativamente insensível para a presença de uma segunda população de receptores. Mesmo quando esta população constitui uma fração considerável do número total de receptores, a regressão pode se aproximar de uma reta de coeficiente angular não significativamente diferente da unidade. É pouco provável que uma segunda população de receptores constituindo menos que 35 % da população da população total possa ser experimentalmente reconhecida pela regressão de Schild, uma

vez que o coeficiente angular seria maior que 0,90 e não significativamente diferente de 1,0. Tendo em vista estas observações, pode-se inferir que o coeficiente angular diferente da unidade obtido para concentrações seletivas do metoprolol, implica não só na participação de uma segunda população de receptores, mas também numa incidência dos mesmos superior a 35 %, fato já comprovado por MOLENAAR & SUMMERS (1987).

Considerados em conjunto, estes dados sugerem fortemente que o NAIN esteja ativando, de maneira não seletiva, toda a população de adrenoreceptores beta em átrios isolados de cobaia, uma vez que nesta preparação ambos os adrenoreceptores medulam a resposta cronotrópica (JOHANSSON & PERSSON, 1983; MOLENAAR & SUMMERS, 1987) e, são corroborados, pelo fato de que o salbutamol, descrito como agonista altamente seletivo de adrenoreceptores beta-2, se comporta como um agonista parcial em átrios de cobaia (O'DONNELL, 1972; GILES et al., 1973; O'DONNELL & WANSTALL, 1978). Tal efeito não é observado para o NAIN, que se comporta como um agonista pleno nesta preparação.

Estes resultados foram amparados pelo aumento da FC que se observa em resposta ao NAIN, em átrios direitos isolados de ratos, onde uma população funcionalmente homogênea de adrenoreceptores beta-1 modula a resposta cronotrópica (JUBERG et al., 1985). Neste tecido, a CE_{50} do NAIN é igual a $2,56 \times 10^{-11}$ M, sugerindo grande potência do NAIN sobre os adrenoreceptores beta-1, quando comparada à do ISO e da ADR.

A ausência de resposta cronotrópica observada "in vivo" talvez possa ser explicada por deficiência na difusibilidade deste agonista para o tecido cardíaco. Não existem, entretanto, estudos farmacocinéticos que assegurem esta hipótese.

VI- CONCLUSões

1) Os resultados obtidos permitem concluir que, nas condições experimentais vigentes nos experimentos "in vivo", o NAIN não possui efeitos cronotrópico e pressórico significativos. Porém, nas mesmas condições, os efeitos cronotrópico e pressórico do ISO foram claramente observados.

2) Embora não se observe efeito cronotrópico positivo em resposta ao NAIN "in vivo", os dados obtidos "in vitro" estabelecem que o NAIN é um agonista não seletivo de adrenoceptores beta.

3) Os resultados obtidos "in vitro" indicam que o NAIN, em átrios direitos isolados de ratos, apresenta maior potência que o ISO.

VII- RESUMO - ABSTRACT

O objetivo do presente estudo foi analisar a seletividade do composto NAIN para os subtipos de adrenoceptores beta-1 e beta-2. Com esta finalidade, avaliamos as respostas cronotrópica (FC) "in vivo" e "in vitro" e a resposta pressórica (PA) "in vivo". Os experimentos "in vivo" foram realizados em ratos cateterizados e conscientes submetidos a doses crescentes de NAIN (0.003 a 1.0 ug/100g) administradas por via endovenosa. Os resultados obtidos foram comparados aos do isoproterenol (ISO). Observamos que o NAIN não induz aumento significativo da FC, e induz redução da PA apenas em resposta à sua menor dose (0,003 ug/100g). Enquanto que o ISO, tal como esperado, determina um aumento da FC e redução da PA de maneira dose-dependente.

Os experimentos "in vitro" conduzidos em átrios direitos isolados de ratos e cobaias sugerem que o NAIN é um agonista não seletivo de adrenoceptores beta cardíacos. A reta da regressão de Schild obtida para o metoprolol, em concentrações seletivas para os adrenoceptores beta-1 em átrios de cobaia, usando o NAIN como agonista, apresentou coeficiente angular diferente da unidade, indicando que o efeito cronotrópico positivo do NAIN, nesta preparação, deve-se à ativação de ambos os subtipos de adrenoceptores.

The selectivity of NAIN as a beta-adrenoceptor agonist was studied "in vivo" and "in vitro". The effects of the drug on arterial pressure and heart rate in conscious rats were compared with those obtained using isoproterenol. The pA₂ value, obtained in isolated guinea-pig right atria for propranolol was compared to that obtained for metoprolol. The results from guinea-pig atrial preparations strongly suggest that NAIN activates both adrenoceptor subtypes since metoprolol was incapable of competitively blocking the chronotropic effect of NAIN (Schild Plot slope different from unity). These results are supported by the increase in heart rate observed in the rat right atrial preparation. In contrast, the experiments in conscious rats did not provide any significant evidence of receptor subtype activation, nor was there a clear-cut dose-response relationship. The latter phenomenon may reflect, at least in part, the discrete bioavailability of the drug.

VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-GRASCHINSKY, E. & LANGER, S.Z. Possible role of beta-adrenoceptor in the regulation of noradrenaline release by nerve stimulation through a positive feed-back mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, **53**: 43-50, 1975.

AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. *Am J. Physiol.*, **153**: 586-600, 1948.

APRILIGIANO, O. & HERMSMEYER, K. In vitro denervation of the portal vein and caudal artery of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **198**: 568-577, 1976.

ARNOLD, J.M.O. & McDEWITT, D.G. Vagal activity is increased during intravenous isoprenaline infusion in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **18**: 311-316, 1984

ARNOLD, J.M.O.; O'CONNOR, P.C.; RIDDEL, J.G.; HARROW, D.W.G.; SHANKS, R.G. & McDEWITT, D.G. Effects of the beta-2 adrenoceptor antagonist ICI 118,551 on exercise-induced tachycardia and isoprenaline-induced beta adrenoceptor responses in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **19**: 619-630, 1985.

ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H.O.J. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **14**: 48-58, 1959.

BERNE, R.M. & LEVY, M.N. *Fisiologia*. 2^o Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., pp. 383-389, 1990.

BOKOCH, G.M.; KATADA, T.; NORTHUP, J.K. & GILMAN, A.G. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, **259**: 3560-3567, 1984.

BORMANN, B.J.; HUANG, C.K.; MACKIN, W.M.; & BECKER, E.L. Receptor mediated activation of a phospholipase A₂ in rabbit neutrophil plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 767-770, 1984.

BRISTOW, M.R.; GINSBURG, R.; UMANS, V.; FOWLER, M.; MINOBE, W.; RASMUSSEN, R.; ZERA, P.; MENLOVE, R.; SHAN, P.; JAMIESON, S. & STINSON, E.B. Beta-1 and beta-2 adrenergic receptor subpopulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptors subtypes to muscle contractions and selective beta-1 receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.*, **59**: 297-309, 1986.

BRODDE, O.E. The functional importance of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in the human heart. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 24C - 29C, 1988.

- BROWN, A.M. & BIRNBAUMER, L. Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.*, **254**: H401-H410, 1988.
- BROWN, J.E.; McLEOD, A.A. & SHAND, D.G. In support of cardiac chronotropic beta-2 adrenoceptors. *Am. J. Cardiol.*, **57**: 11F - 16F, 1986.
- BRYAN, L.J.; COLE, J.J.; O'DONNELL, S.R. & WANSTAL, J.C. A study designed to explore the hypothesis that beta-1 adrenoceptors are "innervated" receptors and beta-2 adrenoceptors are hormone receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**: 395-400, 1981.
- BUCH, J.; WALDORFF, S.; HANSEN, P.B. & RASMUSSEN, O.O. Non-selective measuring of the circulatory effect of afterload reduction in order to monitor the pharmacodynamic effects of drugs in normal volunteers. *Br. Heart.J.*, **50**: 170-5, 1983.
- BUCKNER, C.K.; THORPHY, T. & COSTA, D.J. Studies on beta adrenoceptors mediating changes in mechanical events and adenosine 3', 5'-monophosphate levels in rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **47**: 259-268, 1978.
- BURNS, J.J. & SALVADOR, R.A. Metabolic blockade by methoxamine and its analogs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **139**: 833-840, 1967.
- CALLIA, M.L. & DE MORAES, S.M. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **230**: 450-454, 1984.
- CARBONELL, L.F.; GARCIA-ESTAN, J.; UBEDA, M.; SALOM, M.G.; FENOY, F. & QUESADA, T. Blood pressure control in the pithed rat. *Gen. Pharmacol.*, **17**: 469-472, 1986.
- CARLSSON, E.; ABLAD, B.; BRANDSTROM, A. & CARLSSON, B. Differentiated blockade of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. *Life Sci.*, **11**: 953-958, 1972.
- CARLSSON, E.; DAHLOF, C.G.; HEDBERG, A.; PERSSON, H. & TANGSTRAND, B. differentiation of cardiac chronotropic and inotropic effects of beta adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **300**: 101-105, 1977.
- DANILO, P. & ROSEN, T. Effects of terbutaline on cardiac automaticity and contractility. *J. Clin. Pharmacol.*, **22**: 223-230, 1982.
- DELL'ITALIA, L.J. & ALSH, R.A. Effect of intravenous metoprolol on left ventricular performance in Q-wave acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, **63**: 166-171, 1989.

DOHLMAN, H.G.; BOUVIER, M.; BENOVIC, J.L.; CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. The multiple membrane spanning topography of the beta-2 adrenergic receptor. Localization of the sites of binding, glycosylation and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **262**: 14282-14288, 1987.

EGLEME, C.; GODFRAIND, T. & MILLER, R.C. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after the removal of the endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **81**: 16-18, 1984.

ELLIOT, H.L.O. & REID, J.L. Evidence for post-junctional vascular alpha-2 adrenoceptors in peripheral vascular regulation in man. *Clin. Sci.*, **65**: 237-241, 1983.

EMORINE, L.J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M.M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C. & STROSBURG, D. Molecular characterization of the beta-3 adrenergic receptor. *Science*, **245**: 1118-1121, 1989.

FLAVAHAN, N.A. & McGRATH, J.C. Blockade by yohimbine of prazosin resistant pressor effects of adrenaline in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.*, **69**: 355-357, 1980.

FLEMING, W.W.; WESTFALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S. & JELLET, T. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**: 339-45, 1972.

FURCHGOTT, R.F. The pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, **7**: 183-255, 1955.

FURCHGOTT, R.F. The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. IN: *Catecholamines. Handbook of Experimental Pharmacology*, Blaschko, H. & Muscholl, E. (eds.). Berlin and Heidelberg, Springer-Verlag, Vol. **33**; pp. 283-335, 1972.

FURCHGOTT, R.F. Postsynaptic adrenergic receptor mechanisms in vascular smooth muscle. IN: *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Bevan, J.A., Godfraind, T., Maxwell, R.A.; & Vanhoute, P.M. (eds.). S. Karger AG, Basel. pp. 131-142, 1976.

GADDUM, J.H. Theories of drug antagonism. *Pharm. Rev.*, **9**: 211-218, 1957.

GILES, R.E.; WILLIAMS, J.C. & FINKEL, M.P. The bronchodilator and cardiac stimulant effect of Th 1165a, salbutamol and isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**: 472-481, 1973.

- GILMAN, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated-signals. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**: 615-649, 1987.
- GREEN, J.F. Mechanism of action of isoproterenol on venous return. *Am. J. Physiol.*, **232**: H152-H156, 1977.
- HARRISON, J.K.; PEARSON, W.R. & LYNCH, K.R. Molecular characterization of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors. *TIPS*, **12**: 62-67, 1991.
- HIATT, W.R.; FRADL, D.C.; ZERBE, G.O.; BYYNY, R.L.; NIES, A.S. Selective and nonselective blockade of the peripheral circulation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**: 12-19, 1984.
- HEDQVIST, P. & MOAWAD, A. Presynaptic alpha and beta-adrenoceptor mediated control of noradrenaline release in human oviduct. *Acta Physiol. Scand.*, **95**: 494-496, 1975.
- HILDEBRANDT, J.D.; CODINA, J.; RISINGER, R. & BIRNBAUMER, L. Identification of a gamma subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. *J. Biol. Chem.*, **259**: 2039-2042, 1984.
- HOUBEN, H.; THIEN, T. & VAN'T LAAR, A. Effect of low-dose epinephrine infusion on hemodynamics after selective and nonselective beta-blockade in hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **31**: 685-690, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E. & CHAUDHURI, G. Endothelium-derived-relaxing-factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**: 9265-9269, 1987.
- JOHANSSON, L.H. & PERSON, H. Beta-2 adrenoceptors in guinea-pig atria. *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**: 804-10, 1983.
- JOHANSSON, L.H.; ELIASSON, E.L.; PERSON, H. & ROSENGREN, E. An analysis of the beta-2 adrenoceptor selectivity in three series of beta-adrenoceptor agonists. *Pharmacol. Toxicol.*, Mar, **66**: 203-208, 1990.
- JOHNSSON, J. Influence of metoprolol and propranolol on hemodynamic effects induced by adrenaline and physical work. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **36** (Suppl. V): 59-68, 1979.
- JUBERG, E.N.; MINEMANN, K.P. & ABEL, P.N. Beta-1 and beta-2 adrenoceptors binding and functional responses in right and left atria of rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **330**: 193-202, 1985.
- KENAKIN, T.P. The Schild Regression in the process of receptor classification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**: 249-265, 1982.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J.H. Química Farmacêutica. Editora Guanabara Dois S.A. Rio de Janeiro - RJ. pp 331-332, 1982.

LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P. & BROWN, T.G. Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. *Nature (London)*, **214**: 597-598, 1967 a.

LANDS, A.M.; LUDUENA, F.P. & BUZZO, H.J. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.*, **6**: 2241-2249, 1967 b.

LANGER, S.Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.*, **23**: 1793-1800, 1974.

LANGER, S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 337-362, 1980.

LANGER, S.Z. & LEHMANN, J. Presynaptic receptors on catecholamine neurons. IN: *Catecholamines I*. (Tredelenberg U & Weiner N, eds) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 90. Springer-Verlag, Berlin, pp 419-508, 1988.

LEENEN, F.H.H.; SMITH, D. & DeLEVE, L. Non-selective beta-adrenoceptor stimulation and blockade and left ventricular function. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **34**: 570-5, 1983.

LEENEN, F.H.H.; CHAN, Y.K.; SMITH, D.L. & REEVES, R.A. Epinephrine and left ventricular function in man: effects of beta-1 versus non-selective beta-blockade. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **43**: 519-520, 1988.

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.

LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G.; MICHEL, T. & STADEL, J.M. Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the beta-adrenergic receptor and adenylate-cyclase. *Fed. Proc.*, **41**: 2264-2270, 1982.

LEFKOWITZ, R.J.; HOFFMAN, B.B. & TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. IN: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman Gilman, A.; Rall, T.W.; Nies, A.S. & Taylor, P.; Eds) 8^o Ed. New York. Pergamon Press Inc., pp 110-111, 1990.

LEVINE, M.A.H. & LEENEN, F.H.H. Role of the beta-1 receptors and vagal tone in cardiac inotropic and chronotropic responses to a beta-2 agonist in humans. *Circulation.*, **79**: 107-115, 1989.

- LEVY, B. The adrenergic blocking activity of N-tert-butylmethoxamine (butoxamine). *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **151**: 413-422, 1966.
- LIMBIRD, L.E. GTP and Na⁺ modulate receptor-adenyl-cyclase coupling and receptor mediated function. *Am. J. Physiol.*, **247**: E59-E68, 1984.
- MILNOR, W.R. Limitations of Schild plot in a two-receptor system: alpha adrenoceptor of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**: 237-241, 1986.
- MINNEMANN, K.P.; HEDBERG, A. & MOLINOFF, P. Comparison of beta adrenergic receptor subtypes in mammalian tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **211**: 502-508, 1979.
- MINNEMANN, K.P.; PITMANN, R.N. & MOLINOFF, P.B. Beta adrenergic receptor subtypes properties: distribution and regulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, **4**: 419-461, 1981.
- MOLENAAR, P. & SUMMERS, A.J. Characterization of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in guinea-pig atrium: functional and receptor binding studies. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **241**: 1041-1047, 1987.
- MORDY, F.M.D. et al. Accentuated antagonism between beta adrenergic and vagal effects on ventricular refractoriness in humans. *Circ.*, **17**: 289-297, 1988.
- NORTHUP, J.K.; SMIGEL, M.D.; STERNWEIS, P.C. & GILMAN, A.G. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylyl cyclase. Resolution of the activated 45,000 dalton (alpha) subunit. *J. Biol. Chem.*, **258**: 11369-11376, 1983.
- O'DONNELL, S.R. An examination of some adrenoceptor stimulants for selectivity using the isolating trachea and atria of the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **19**: 371-8, 1972.
- O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. Evidence that the efficacy (intrinsic activity) of fenoterol is higher than that of salbutamol on beta adrenoceptors in guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **47**: 333-340, 1978.
- O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor mediated responses in preparation of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**: 733-738, 1984.
- O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. Responses to the beta-2 selective agonist procaterol of vascular and atria preparations with different beta-adrenoceptor population. *Br. J. Pharmacol.*, **84**: 227-33, 1985.

- PALLER, M.S. & LINAS, S.L. Role of angiotensin II, adrenergic system and arginine-vasopressin on arterial pressure in rat. *Am. J. Physiol.*, **246**: H25-H30, 1984.
- PALMER, R.M.J.; FERRIDE, G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived-relaxing-factor. *Nature*, **327**: 5524-526, 1987.
- RESEK, J.F. & RUOHO, A.E. Photoaffinity labeling of the beta adrenoceptor with an iodoazide derivative or norepinephrine. *J. Biol. Chem.*, **263**: 14410-14416, 1988.
- ROMERO, J.C.; DUNLOP, L.C. & STRONG, C.G. The effect of indomethacin and other antiinflammatory drugs on the renin-angiotensin systems. *J. Clin. Invest.*, **58**: 282-288, 1976.
- ROSS, E.M. Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. IN: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman Gilman, A.; Rall, T.W.; Nies, A.S. & Taylor, P.; Eds) 8^o Ed. New York. Pergamon Press Inc., pp 33-48, 1990.
- SCHILD, H.O. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.*, **2**: 198-206, 1947 a.
- SCHILD, H.O. The use of drug antagonists for identification and classification of receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **2**: 251-258, 1947 b.
- SCHILD, H.O. pA_x competitive drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.*, **4**: 277-280, 1949.
- SCHILD, H.O. Drug antagonism and pA_x. *Pharmacol. Rev.*, **9**: 242-246, 1957.
- SHUMANN, H.J. & LUES, I. Post-junctional alpha-adrenoceptors in the isolated saphenous vein of the rabbit: characterization and influence of angiotensin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **323**: 328-334, 1983.
- SHOJI, T.; TSURU, H. & SHIJI, T. A regional difference in the distribution of postsynaptic alpha-adrenoceptor subtypes in canine veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **324**: 246-255, 1983.
- STARKE, K. Presynaptic alpha-autoreceptors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **107**: 73-146, 1987.
- STEEN, S.; SKARBY, T.U.C.; NORGRÉN, L. & ANDERSON, K.E. Pharmacological characterization of post-junctional alpha-adrenoceptors in isolated human omental arteries and veins. *Acta Physiol. Scand.*, **120**: 109-116, 1984 a.

STEEN, S.; SJOBEG, T.; SKARBY, T.U.C.; NORGRÉN, L. & ANDERSON, K.E. Post-junctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors mediating contraction in isolated human groin arteries and veins. *Acta Physiol. Scand.*, **122**: 323-329, 1984 b.

STILES, J.L.; CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms and physiological regulation. *Physiol. Rev.*, **64**: 661-743, 1984.

STILES, J.L.; STRASSER, R.H.; LAVIN, T.N.; JONES, L.R.; CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. The cardiac beta-adrenergic receptors: structural similarities of beta-1 and beta-2 receptor subtypes demonstrated by photoaffinity labelling. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8443-8449, 1983.

STJARNE, L. & BRUNDIN, J. Dual adrenoceptor mediated control of adrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: Facilitation by beta-receptors and inhibition by alpha-receptors. *Acta Physiol. Scand.*, **94**: 139-141, 1975.

STJARNE, L. & BRUNDIN, J. Beta-2 adrenoceptor facilitating noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves. *Acta Physiol. Scand.*, **97**: 88-93, 1976.

STRAUSS, M.H.; REEVES, R.A.; SMITH, D.L. & LEENEN, F.H.H. The role of cardiac receptors in the hemodynamic response to a beta-2 agonist. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **40**: 108-115, 1986.

TODA, N.; OKAMURA, T.; NAJAJIMA, M. & MYIAZAKI, M. Modification by yohimbine and prazosin of the mechanical response of isolated dogs mesenteric, renal, and coronary arteries to transmural stimulation and norepinephrine. *Eur. J. Pharmacol.*, **98**: 69-78, 1984.

van HERWAARDEN, C.; FENNIS, J.; BINKHORST, R.; VAN T LAAR, A. Haemodynamic effects of adrenaline during treatment of hypertensive patients with propranolol and metoprolol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **12**: 397-402, 1977.

van ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**: 299-330, 1963.

VENTER, J.C. & FRASER, C.M. The structure of alpha and beta-adrenergic receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **4**: 256-258, 1983.

VINCENT, H.H.; MAN INT'VELD, A.J.; BOOMSMA, F.; WENTIG, P.J. & SCHALEKAMP, A.M.D.H. Elevated plasma noradrenaline in response to beta adrenoceptor stimulation in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **13**: 717-721, 1982.

WALTER, W. Physiological role of cGMP-dependent protein-kinase in the cardiovascular system. In: *Rev. Biochem. Pharmacol.*, 113: 44-48, 1989.

WILKENFELD, B.E. & LEVY, B. Adrenergic blocking properties of MJ 1999 and butoxamine on cardiac and vascular beta receptors. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 176: 218-232, 1986.