

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de mau prognóstico que tem como características anormalidades da função ventricular esquerda acompanhada de ativação do sistema neuro-humoral, aumento da retenção de fluido, e a intolerância aos esforços, além de diminuir a longevidade (PACKER, 1997). Essa síndrome exige gastos em torno de 2% da renda de grandes centros (POOLE-WILSON, SWEDBERG, CLELAND, DI LENARDA, HANRATH, KOMAJDA, LUBSEN, LUTIGER, METRA, REMME, TORP-PEDERSEN, SCHERHAG & SKENE, 2003) e pode acometer em torno de 5% da população (SCHOCKEN, ARRIETA, LEAVERTON & ROSS, 1992). No Brasil, somente no ano de 2002, foram gastos aproximadamente 200 milhões de reais no tratamento da insuficiência cardíaca (ALBANESI, 2005).

O desenvolvimento da insuficiência cardíaca está associado à hiperatividade do sistema nervoso simpático que, apesar de benéfica em situações agudas (pois, exerce efeito inotrópico positivo, o que aumenta o débito cardíaco), é deletéria quando crônica, por levar a diminuição na contratilidade cardíaca, arritmias, remodelamento cardíaco associado à degradação de miócitos, dessensibilização dos receptores pós-sinápticos β_1 -adrenérgicos e a ativação de outros sistemas neuro-humorais, tais como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (HARRINGTON, LUTREL & ROCKMAN, 2003). Dessa forma, visando minimizar os já citados efeitos deletérios da hiperatividade simpática, os antagonistas β -adrenérgicos passaram a ser um dos principais agentes utilizados na terapia da insuficiência cardíaca e atualmente são foco de inúmeros estudos que têm como objetivo analisar os efeitos dessa droga em portadores de insuficiência cardíaca (DI LENARDA, SABBADINI & SINAGRA, 2004; POOLE-WILSON, 2004; POOLE-WILSON et al., 2003).

Por muito tempo, o tratamento da insuficiência cardíaca com base no bloqueio do sistema nervoso simpático, pelo uso de antagonistas β -adrenérgicos, foi contra-indicado por acreditar-se que a redução da frequência cardíaca e da contratilidade em um coração já insuficiente exerceria efeitos adversos. Dessa forma,

até o início da década de 90, a insuficiência cardíaca era conceituada e tratada como um distúrbio hemodinâmico e as principais formas de tratamento incluíam de diuréticos, vasodilatadores e agentes inotrópicos positivos. Tais medicamentos tinham como principal objetivo atenuar os sintomas da síndrome reduzindo a resistência periférica e aumentando a força de contração cardíaca (KATZ, 2003). Entretanto, com avanço de recursos tecnológicos que proporcionaram o maior entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da síndrome, a insuficiência cardíaca passou a ser entendida como uma síndrome de natureza neuro-humoral e, conseqüentemente, houve uma mudança de paradigma que levou a uma mudança no tratamento farmacológico da síndrome. Atualmente, é consenso tanto na literatura, (ARONOW, 1997; GOTTLIEB & MCCARTER, 2001; PACKER, COATS, FOWLER, KATUS, KRUM, MOHACSI, ROULEAU, TENDERA, CASTAIGNE, ROECKER, SCHULTZ & DEMETS, 2001) quanto na prática clínica, o poder benéfico da terapia à base do uso de antagonistas β -adrenérgicos, pela redução na frequência cardíaca, na atividade nervosa simpática, e por melhorar a função cardíaca e diminuir a mortalidade. Inúmeros ensaios clínicos foram conduzidos a fim de entender a ação dos principais β -bloqueadores (EFFECT..., 1999; POOLE-WILSON et al., 2003). Entretanto, apesar de amplamente estudados na literatura e utilizados na prática clínica, as diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas entre antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações, assim como, os mecanismos envolvidos na melhora da função cardíaca, ainda não estão totalmente esclarecidos. Três diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos foram desenvolvidas e utilizadas no tratamento da insuficiência cardíaca (1ª geração – não seletivo para os receptores β -adrenérgicos, 2ª geração – seletivo para o subtipo β_1 –adrenérgico e 3ª geração – não seletivo para os receptores β -adrenérgicos e com ação vasodilatadora).

Com o desenvolvimento de diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos a importância de se estudar os efeitos de tais medicamentos no tratamento da insuficiência cardíaca se faz necessária. Dessa forma, os modelos experimentais passaram a ter importância para o esclarecimento dos efeitos de diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos no tratamento da insuficiência

cardíaca. Atualmente, estudamos em nosso laboratório um modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, o que possibilita seu uso para a avaliação do tratamento farmacológico dessa cardiomiopatia. Previamente foi demonstrado (BRUM, KOSEK, PATTERSON, BERNSTEIN & KOBILKA, 2002) que a deleção dos genes dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos proporciona o desenvolvimento da cardiomiopatia por hiperatividade simpática. O desenvolvimento da doença ocorre em função dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos inibirem a liberação de catecolaminas nos terminais nervosos simpáticos. Portanto, a deleção destes receptores leva a um aumento da concentração de catecolaminas circulantes. Tais animais com deleção para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos (KO) apresentam 50% de mortalidade aos sete meses de idade e esse alto índice de mortalidade deve-se ao fato de a hiperatividade simpática exercer efeitos deletérios cardíacos, estando entre eles a diminuição significativa na capacidade máxima de realização do exercício físico, a perda de cardiomiócitos e disfunção sistólica associada à diminuição na contratilidade cardíaca.

Portanto, no presente projeto de pesquisa temos como objetivo avaliar o possível efeito terapêutico de antagonistas β -adrenérgicos de três diferentes gerações sobre a tolerância ao esforço, função e ultraestrutura cardíacas e sobrevida em camundongos KO que desenvolvem cardiomiopatia induzida pela hiperatividade simpática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de mau prognóstico que envolve disfunção miocárdica associada à intolerância ao exercício físico, alterações funcionais e estruturais cardíacas, incidência de arritmias ventriculares, além da diminuição da expectativa de vida. Segundo dados epidemiológicos, a insuficiência cardíaca acomete em torno de 1 a 2% da população geral (SCHOCKEN et al., 1992), podendo esses valores chegar a 5% em grandes centros (SUTTON, 1990). Dados

recentes (GREENBERG, 2004) confirmam que, somente nos Estados Unidos, existem, atualmente, mais de 5 milhões de portadores de insuficiência cardíaca. No Brasil, as doenças do aparelho circulatório são a maior causa de mortalidade e, segundo o DATASUS do Ministério da Saúde¹, somente em 2002 ocorreram 982.807 óbitos, sendo 267.496 devido a doenças do aparelho circulatório, o que representou aproximadamente 27% dos óbitos ocorridos naquele ano.

A insuficiência cardíaca é a via final da maioria das doenças do aparelho circulatório. Com o agravamento da síndrome, observa-se diminuição do débito cardíaco, como consequência da perda de eficiência do coração em suprir as demandas do organismo.

Concomitantemente à diminuição do débito cardíaco, observa-se um aumento reflexo na atividade nervosa simpática visando restabelecer o aporte sanguíneo para os tecidos. A ativação reflexa do sistema nervoso simpático é inicialmente benéfica na medida em que o aumento do tônus simpático leva a um aumento na frequência cardíaca e na força de contração do miocárdio. Entretanto, cronicamente a hiperatividade do sistema nervoso simpático está associada a efeitos deletérios ao tecido cardíaco em virtude da sua alta toxicidade (MOLAVI & MEHTA, 2004), leva a disfunção contrátil (DHALLA, AFZAL, BEAMISH, NAIMARK, TAKEDA & NAGANO, 1993) e desencadeia arritmias (NERHEIM, BIRGER-BOTKIN, PIRACHA & OLSHANSKY, 2004). A hiperatividade simpática acarreta em mudanças estruturais importantes no tecido cardíaco, como o aumento na fração de colágeno cardíaco (KATZ, 2002) e a perda de cardiomiócitos. Logo, na tentativa de compensar essa perda de células viáveis, observa-se hipertrofia dos cardiomiócitos remanescentes, que visam manter a função contrátil.

¹Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>

Portanto, atualmente é consenso tanto na literatura quanto na prática clínica, a importância da investigação do tratamento da insuficiência cardíaca, uma vez que sua prevalência na sociedade é alta e, segundo previsões, a tendência é de que em dez anos o número de pacientes portadores dessa síndrome seja de aproximadamente 10 milhões (GREENBERG, 2004).

2.2 O tratamento da insuficiência cardíaca: Breve histórico

Entre as décadas de 40 e 80 a insuficiência cardíaca era conceituada principalmente como uma síndrome de natureza hemodinâmica cujos principais sintomas observados eram retenção de fluidos, a alta pressão venosa e o baixo débito cardíaco (KATZ, 2003). A visão de distúrbio hemodinâmico como sendo o principal fator desencadeante da síndrome foi favorecida em virtude de recursos técnicos e tecnológicos existentes na época. Dessa forma, os diuréticos, vasodilatadores e agentes inotrópicos positivos eram as principais terapias da insuficiência cardíaca.

Em relação ao uso de diuréticos no tratamento da síndrome, os mesmos visavam prevenir a congestão observada nos pacientes, pois os diuréticos diminuem a retenção hídrica e, conseqüentemente, diminuem a pressão venosa central. Entretanto, em longo prazo, observava-se falência renal e hepática associada a uma diminuição de débito cardíaco (KATZ, 2003). Isso provavelmente ocorria em função das altas doses de diuréticos utilizadas, quando essa droga era a base do tratamento dos pacientes.

Os vasodilatadores foram também alvo no tratamento da síndrome na década de 70 (ROSS, 1976) visando redução da pós-carga aumentada nos pacientes acometidos. Entretanto, em ensaios clínicos realizados com os principais vasodilatadores da época, não foi possível observar melhora no prognóstico dos pacientes tratados com vasodilatadores, tais como hidralazina e flosequinan (COHN, 1993; COHN, ARCHIBALD, ZIESCHE, FRANCIOSA, HARSTON, TRISTANI, DUNKMAN, JACOBS, FRANCIS, FLOHR, et al., 1986) provavelmente por uma ativação reflexa dos sistemas nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-

aldosterona, associada à queda da pressão arterial com o uso de vasodilatadores. Porém, dentre as várias drogas com ação vasodilatadora, vale a pena ressaltar que quando os inibidores da ECA eram usados com o objetivo de diminuir a resistência vascular periférica dos pacientes, observava-se melhora na sobrevida dos mesmos, diferentemente do observado em pacientes tratados com as outras classes de vasodilatadores. Embora os resultados tenham chamado a atenção dos pesquisadores, as razões pelas quais o uso de inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona melhoravam o prognóstico de portadores de insuficiência cardíaca não foram estudadas a fundo na época (EFFECTS...1987; PFEFFER, BRAUNWALD, MOYE, BASTA, BROWN JUNIOR, CUDDY, DAVIS, GELTMAN, GOLDMAN, FLAKER, et al., 1992). No entanto, essa dicotomia na ação dos vasodilatadores no tratamento da insuficiência cardíaca foi o primeiro desafio à visão da insuficiência cardíaca exclusivamente como um distúrbio de natureza hemodinâmica. Mesmo assim, a visão hemodinâmica da síndrome ainda prevaleceu até o início da década de 90.

Por fim, ainda tentando reverter um possível distúrbio hemodinâmico, os agentes inotrópicos positivos foram utilizados tentando compensar o baixo poder inotrópico de um coração insuficiente e com conseqüente baixo débito cardíaco. Entretanto, tal medicação, além de não promover melhora no prognóstico dos pacientes assim medicados, provocava sensível diminuição na expectativa de vida desses pacientes (XAMOTEROL..., 1990). Essa resposta era observada, porque as doses de agonista β -adrenérgicos utilizadas eram muito elevadas.

Os consecutivos insucessos no tratamento da insuficiência cardíaca com os diuréticos, vasodilatadores e agentes inotrópicos positivos, somados aos avanços tecnológicos que permitiram o desenvolvimento de novos equipamentos, tiveram grande importância e contribuíram para que no início da década de 90 houvesse uma mudança de paradigma ao se conceituar a insuficiência cardíaca. Em paralelo, evidências acumuladas ao longo dos anos mostravam que o distúrbio hemodinâmico na síndrome era acompanhado por hiperativação de sistemas neuro-humorais. Embora já se soubesse que havia hiperatividade dos nervos simpáticos na insuficiência cardíaca, somente na década de 80 (COHN, LEVINE, OLIVARI,

GARBERG, LURA, FRANCIS, SIMON & RECTOR, 1984) demonstrou-se que essa hiperatividade simpática estava associada a um mau prognóstico em portadores de insuficiência cardíaca. Com isso, os pesquisadores passaram a atribuir maior participação dos sistemas neuro-humorais no desenvolvimento da síndrome. Dessa maneira, a insuficiência cardíaca passou a ser conceituada de forma mais ampla como um distúrbio neuro-humoral o que acarretou mudanças importantes na abordagem terapêutica da síndrome.

Sendo assim medicamentos que atuassem diretamente na modulação dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e nervoso simpático passaram a ser protagonistas no tratamento da insuficiência cardíaca. Dentre os bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona duas classes importantes do medicamento passaram a ser utilizadas. A primeira delas constituiu-se nos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ex. enalapril e captopril). Posteriormente, na década de 90, os bloqueadores dos receptores AT_1 da angiotensina II (ex. losartan) também ganharam importância no tratamento da insuficiência cardíaca. Tanto os inibidores da enzima conversora da angiotensina como os antagonistas dos receptores AT_1 da angiotensina II promovem remodelamento reverso cardíaco com redução de colágeno. A modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona também tem importância grande na medida em que sua ativação ou bloqueio tem participação direta na regulação da ação do sistema nervoso simpático (HARRINGTON, LUTREL & ROCKMAN, 2003).

Os antagonistas β -adrenérgicos proscritos para o tratamento da insuficiência cardíaca até o início da década de 90, por se acreditar que os efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos gerados por esse tipo de droga seriam maléficis para o tratamento da doença, passaram a ser, juntamente com os inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos receptores AT_1 da angiotensina II, uma das principais formas de tratamento da insuficiência cardíaca.

Já na década de 90 começaram a surgir as primeiras evidências de que a terapia com o uso de antagonistas β -adrenérgicos seria benéfica ao paciente com insuficiência cardíaca (TIMERMAN & PEREIRA, 2000). Com os avanços nos

estudos nessa área, pôde-se observar que, na insuficiência cardíaca, o coração era constantemente exposto a hiperatividade do sistema nervoso simpático. Esta exarcebação simpática provocava taquicardia, aumento do consumo de oxigênio do miocárdio e do potencial de arritmias ventriculares, além de contribuir para a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, provocando morte dos cardiomiócitos e, conseqüentemente, agravando o quadro da insuficiência cardíaca. Por essa razão, o tratamento da doença com o uso de antagonistas β -adrenérgicos passou a ser prescrito, e ensaios clínicos começaram a ser conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito do uso de antagonistas β -adrenérgicos no tratamento da insuficiência cardíaca (EFFECTS....., 1999; POOLE-WILSON et al., 2003). Estes estudos mostraram que o tratamento da insuficiência cardíaca com o uso de antagonistas β -adrenérgicos era altamente recomendado pois, preveniam o coração da ação deletéria associada ao excesso de catecolaminas.

Vários estudos têm mostrado os benefícios do uso de antagonistas β -adrenérgicos após um período que varia em média de quatro a oito semanas para portadores de insuficiência cardíaca (ARONOW, 1997; GOTTLIEB & MCCARTER, 2001; PACKER et al., 2001). Esses benefícios podem ser explicados por uma série de mecanismos que atuam a partir do bloqueio dos receptores β -adrenérgicos cardíacos: 1- Redução dos níveis de noradrenalina plasmática e tecidual em conseqüência da diminuição da atividade do sistema nervoso simpático e bloqueio dos efeitos tóxicos das catecolaminas sobre os cardiomiócitos com redução de apoptose e necrose celular. 2- Restabelecimento da densidade dos receptores β_1 -adrenérgicos, outrora alterada em decorrência da doença. 3- Aumento dos níveis de proteína $G_{\alpha s}$, com maior atividade da adenilciclase, maior produção de energia e maior eficácia das unidades contráteis. 4- Redução dos níveis de secreção de renina pelo bloqueio simpático, mimetizando a ação dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina e prevenindo o escape da supressão de angiotensina II pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina. 5- Melhora da função barorreflexa, redução da pós-carga e melhora da eficiência circulatória. 6- Redução da falência cardíaca, com menor consumo de oxigênio pelo miocárdio, melhora da função diastólica, aumento de fluxo coronariano, e redução de isquemia, arritmias

ventriculares e morte súbita (ALMEIDA, DINIZ, VIEGAS, SILVA & CARVALHO, 2000).

Portanto, o estudo do efeito do uso de diferentes tipos de antagonistas β -adrenérgicos na terapêutica da insuficiência cardíaca é importante, para que as ações específicas de cada antagonista β -adrenérgico sejam melhor entendidas.

2.3 Receptores β -adrenérgicos e suas funções na insuficiência cardíaca

Os receptores β -adrenérgicos pertencem a uma família de receptores caracterizados por possuírem sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G. Quando o primeiro mensageiro (noradrenalina) se liga aos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos, ocorre uma mudança conformacional do receptor que se acopla à proteína estimulatória $G_{\alpha s}$ que tem três subunidades, α , β e γ . Em seguida, a subunidade α se desacopla das demais subunidades e estimula a enzima adenil ciclase. Com isso, há aumento das concentrações de AMP-cíclico intracelular (segundo mensageiro). O aumento das concentrações de AMP-cíclico faz com que os mesmos ativem a proteína quinase-A (PKA). As subunidades catalíticas da PKA fosforilam inúmeras proteínas intracelulares, principalmente as proteínas que regulam as concentrações de cálcio no citosol, regulando assim, todo o processo de contração e relaxamento miocárdico.

No coração, a via β -adrenérgica exerce papel fundamental, tendo em vista que os receptores α -adrenérgicos estão em menor quantidade no miocárdio. Em relação aos subtipos de receptores β -adrenérgicos cardíacos, os receptores β_1 -adrenérgicos estão expressos em maior quantidade quando comparados aos receptores β_2 -adrenérgicos (80: 20 %, respectivamente) prevalecendo, dessa forma, a ação dos receptores β_1 -adrenérgicos. Na insuficiência cardíaca a relação β_1 : β_2 modifica-se, pois ocorre “downregulation” dos receptores β_1 -adrenérgicos na membrana, fazendo com que a razão β_1 : β_2 chegue a valores de aproximadamente 60: 40% (BRISTOW, 1993). O processo de “downregulation” consiste na internalização dos receptores de membrana e posterior degradação dos mesmos.

Como os receptores β_2 -adrenérgicos têm menor ação inotrópica positiva, pois se acoplam tanto a proteína Gs como a proteína Gi (BRISTOW, GINSBURG, UMANS, FOWLER, MINOBE, RASMUSSEN, ZERA, MENLOVE, SHAH & JAMIESON, 1986), há uma diminuição da função contrátil cardíaca. Portanto, a diminuição na densidade de receptores β_1 -adrenérgicos de membrana associa-se a reduções da resposta inotrópica e cronotrópica ao exercício físico e a uma conseqüente diminuição de tolerância à realização de esforço físico.

2.4 β -bloqueadores de diferentes gerações

Atualmente, na prática clínica, o uso de antagonistas β -adrenérgicos constitui-se em um dos principais tratamentos da síndrome da insuficiência cardíaca. Entretanto, o mercado tem oferecido uma variedade de antagonistas β -adrenérgicos com diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, classificados em três diferentes gerações (TABELA 1). Dentre os antagonistas β -adrenérgicos de primeira geração, o propranolol foi o mais utilizado para o tratamento pós-infarto e o tratamento da insuficiência cardíaca (ARONOW, 1997; GOTTLIEB & MCCARTER, 2001). Os antagonistas β -adrenérgicos de primeira geração apresentam a característica de serem antagonistas não-seletivos para receptores β -adrenérgicos, ou seja, exercendo sua ação sobre os subtipos β_1 e β_2 -adrenérgicos. Os antagonistas β -adrenérgicos de segunda geração são seletivos para receptores β_1 -adrenérgicos, usados primariamente no tratamento da hipertensão arterial (ALMEIDA et al, 2000). Como exemplos dessa classe de antagonistas β -adrenérgicos, podemos citar o bisoprolol e metoprolol. Não são raros na literatura estudos utilizando essas drogas, porém são mais freqüentes estudos utilizando o metoprolol (CLEMETS & MILLER, 2001; PACKER et al., 2001; RAJPUT, GNANASEKERAM, SATWANI, DAVENPORT, GRACEY, GOPALAN & NARULA, 2003). A terceira geração de antagonistas β -adrenérgicos tem a característica de não serem seletivos exercendo sua ação sobre ambos os subtipos de receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos. Além dessa característica semelhante aos antagonistas β -adrenérgicos de primeira geração, essa família de

antagonistas β -adrenérgicos apresenta outras ações auxiliares, tais como, vasodilatadora e antioxidante. Como exemplo de antagonistas β -adrenérgicos de terceira geração, podemos citar o carvedilol e bucindolol (bucindolol parece não ser tão eficaz quanto o carvedilol, pois parece ser um agonista parcial, o que na clínica é chamado como atividade simpatomimética intrínseca). Estudos com o carvedilol são encontrados com freqüência na literatura recente (AL-NASSER, YOUSUFUDDIN, AL-NOZHA, ANKER, COATS, PIEPOLI & PONIKOWSKI, 2003; DE MATOS, GARDENGHI, RONDON, SOUFEN, TIRONE, BARRETTO, BRUM, MIDDLEKAUFF & NEGRÃO, 2004; PACKER et al., 2001; RAJPUT et al., 2003), demonstrando a importância que tal medicação tem tido no tratamento da insuficiência cardíaca.

TABELA 1- Geração e ação dos diferentes tipos de antagonistas β -adrenérgicos

Geração	antagonistas β -adrenérgicos	Ação
1ª geração	Propranolol	antagonistas β -adrenérgicos não-seletivos
2ª geração	Bisoprolol Metoprolol	antagonistas β -adrenérgicos seletivos para receptores adrenérgicos do subtipo β_1
3ª geração	Carvedilol Bucindolol	antagonistas β -adrenérgicos não seletivos e com ação vasodilatadora e antioxidante

Apesar de os estudos com diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos existirem em grande número, parece não haver um consenso sobre qual seria a melhor geração de antagonista β -adrenérgico a ser utilizada na clínica da insuficiência cardíaca. Além disso, há carência de estudos mais aprofundados sobre

o efeito de tal tratamento na função cardíaca, no remodelamento cardíaco e nos mecanismos envolvidos nessa melhora.

A literatura e a prática clínica, de maneira geral, demonstram particular interesse em entender os efeitos do metoprolol e carvedilol no tratamento da insuficiência cardíaca.

O fato de o metoprolol ser um antagonista β -adrenérgico específico para receptores β_1 -adrenérgicos (TABELA 1) parece ser um ponto positivo, na medida em que, atualmente, vem se entendendo melhor o papel das vias intracelulares β -adrenérgicas. Vários estudos (CHESLEY, LUNDBERG, ASAI, XIAO, OHTANI, LAKATTA & CROW, 2000; COMMUNAL, SINGH, SAWYER & COLUCCI, 1999; ZHU, ZHU, LU, WANG, WANG & YAO, 2003) demonstraram os diferentes papéis das vias β_1 e β_2 -adrenérgicas na regulação da apoptose celular do tecido cardíaco. Sabe-se que a ativação da via β_2 -adrenérgica na insuficiência cardíaca tem um efeito anti-apoptótico importante modulado pela ligação da proteína G_{α_i} à fosfadilinositol 3-quinase (PI-3K). Na insuficiência cardíaca o processo de morte celular programada é um dos principais fatores de remodelamento cardíaco e perda de função cardíaca, portanto, não se sabe ao certo até que ponto bloquear os receptores β_2 -adrenérgicos é desejável.

Os antagonistas β -adrenérgicos de 1ª e 3ª gerações são conhecidos (TABELA 1) por serem inespecíficos, ou seja, exercem sua ação antagonista tanto para receptores β_1 -adrenérgicos quanto receptores β_2 -adrenérgicos. Tanto na prática clínica quanto na literatura, o carvedilol vem sendo o antagonista β -adrenérgicos mais utilizado. Esta preferência deve-se principalmente à sua ação vasodilatadora (bloqueio dos receptores α_1 - adrenérgicos). Entretanto, parece que o efeito vasodilatador do carvedilol é perdido com o passar do tempo (KUBO, AZEVEDO, NEWTON, PACKER & FLORAS, 2001). Outra importante propriedade do carvedilol é a sua ação antioxidante. Demonstrou-se que em ratos enfartados, que o tratamento de dois meses com carvedilol foi suficiente para gerar efeitos antioxidante no tecido cardíaco. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que o metoprolol também tem um

efeito antioxidante associado, porém de menor magnitude (KAWAI, QUIN, SHITE, MAO, FUKUOKA & LIANG, 2004)

Os estudos sobre o tratamento da insuficiência cardíaca com os antagonistas β -adrenérgicos ainda necessitam de maiores esclarecimentos quanto às implicações que as diferentes propriedades dessas drogas podem proporcionar. Dessa maneira, o presente projeto, valendo-se de um modelo experimental com animais geneticamente modificados que desenvolvem cardiomiopatia por hiperatividade simpática, aborda questões a respeito da ação dos antagonistas β -adrenérgicos sobre a resposta da frequência cardíaca, pressão arterial, remodelamento cardíaco e função ventricular. Espera-se com isso ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos celulares envolvidos na melhora da função cardíaca em portadores de insuficiência cardíaca sob o uso de antagonistas β -adrenérgicos.

2.5 Modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática

Os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos são responsáveis pela regulação da ação do sistema nervoso simpático no coração. Centralmente, no bulbo rosto ventro lateral, os receptores α_{2A} -adrenérgicos são pós-sinápticos e modulam negativamente o tônus simpático (ALTMAN, TRENDELENBURG, MACMILLAN, BERNSTEIN, LIMBIRD, STARKE, KOBILKA & HEIN, 1999) Nos terminais nervosos, os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos são pré-sinápticos e regulam negativamente a liberação de noradrenalina para o coração. Portanto a ausência de receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos leva a um aumento crônico da atividade nervosa simpática em camundongos (HEIN, ALTMAN & KOBILKA, 1999). Com estes conhecimentos prévios, e estudando camundongos KO, foi demonstrado que aos quatro meses de idade esses animais apresentavam comprometimento da função cardíaca, com evidências de lesões dos cardiomiócitos, intolerância ao esforço e redução do consumo pico de oxigênio (BRUM et al., 2002). Esses resultados sugeriram, portanto, que o aumento crônico da atividade nervosa simpática estava associado à

progressão da cardiomiopatia em camundongos. De fato, aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentam insuficiência cardíaca com aumento do teor de água nos pulmões.

Dessa forma, esses animais geneticamente modificados se constituem em um interessante modelo experimental para estudar o tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca por hiperatividade simpática.

Considerando-se que os camundongos KO apresentam hiperatividade simpática e mortalidade de aproximadamente 50% aos sete meses de idade (BRUM, et al., 2002) nos propusemos, no presente estudo, a investigar o efeito da terapia com antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações sobre a função e ultraestrutura cardíacas em camundongos KO na faixa etária de cinco a sete meses, quando a cardiomiopatia é grave e associada a insuficiência cardíaca.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito das três diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos (propranolol, metoprolol e carvedilol) no tratamento da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, em camundongos KO na faixa etária de cinco a sete meses.

3.2 Objetivos específicos

Estudar em camundongos KO o efeito do tratamento com propranolol, metoprolol e carvedilol na:

- Tolerância ao exercício físico;
- Pressão arterial e frequência cardíaca no repouso;
- Função ventricular;
- Peso da gordura corporal (retroperitoneal e epididimal);

- Morfometria cardíaca, analisando-se, o diâmetro de miócitos e a fração de colágeno;
- Mortalidade ao longo do estudo.

Temos como hipótese que o uso de antagonistas β -adrenérgicos de segunda e terceira geração serão mais eficazes no tratamento da insuficiência cardíaca em função de suas propriedades auxiliares e de sua melhor tolerabilidade.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Amostra

Para a realização do presente projeto foi utilizado camundongos machos controle e KO, da cepa C57/BL6, com 20 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Os camundongos utilizados neste estudo foram mantidos em biotério, com temperatura controlada entre 22 e 25°C e ciclo claro-escuro (12 horas) invertido.

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br). O presente projeto de pesquisa integra o projeto de jovem pesquisador intitulado “Efeito do treinamento físico na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática”, aprovado pelo Comitê de Ética da EEFÉ-USP (parecer CEP nº 004)

4.2 Identificação dos animais e genotipagem

4.2.1 Identificação dos animais

Os animais foram identificados com um dispositivo introduzido subcutâneamente no dorso, após anestesia com éter. Cada dispositivo continha um código com letras e números, o qual foi identificado por aparelho eletrônico capaz ler o dispositivo utilizado.

4.2.2 Genotipagem

Para a genotipagem dos camundongos KO foi extraído DNA genômico por biopsia realizada na orelha esquerda dos animais. A genotipagem foi realizada por reação de polimerização em cadeia (PCR -polymerase chain reaction) em termociclador utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a detecção dos genes intactos e com ruptura dos genes dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos.

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2A} -adrenérgicos:

WTA sense: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG3'

WTA antisense: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT3'

Neo/sense: 5' CGA GAT CCA CTA GTT CTA GCC TCG3'

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2C} -adrenérgicos:

WTC sense: 5' CAT CTT GTC CTC CTG CAT AGG CTC3'

WTC antisense: 5' TCT CAT CCG GCT CCA CTT CAG TG3'

Neo/sense: 5' GGG AGG ACA ATA GCA GGC ATG CTG3'

4.3 Pesagem corporal

A evolução do peso corporal de todos os animais foi acompanhada semanalmente, antes e durante o período de treinamento físico até o sacrifício, por balança semi-analítica (Gehaka, modelo AG 200).

4.4 Administração dos antagonistas β -adrenérgicos

A administração dos antagonistas β -adrenérgicos foi feita via gavagem em dose estabelecida no estudo-piloto. O tratamento com todos os antagonistas β -adrenérgicos teve duração de oito semanas, com início na 20ª semana de vida desses animais. Os animais receberam o medicamento durante o período de

tratamento sempre no período da manhã. Foram utilizados os seguintes antagonistas β -adrenérgicos:

Propranolol (Sigma, EUA) 1^a geração, antagonistas β -adrenérgicos não-seletivo, ou seja, que exerce sua ação sobre os receptores β_1 quanto β_2 -adrenérgicos (20 mg/kg).

Metoprolol (Sigma, EUA) 2^a geração, antagonistas β -adrenérgicos seletivo para receptores do subtipo β_1 -adrenérgico (165 mg/kg).

Carvedilol (Baldacci, Br)² 3^a geração, antagonista β -adrenérgico não-seletivo e vasodilatador (antagonista receptores α_1 -adrenérgicos) e com ação anti-oxidante (38 mg/kg).

4.5 Avaliação da capacidade funcional

A tolerância ao exercício físico foi estimada através de um teste progressivo até a exaustão, em esteira rolante, em camundongos com cinco e sete meses de idade.

O teste progressivo até a exaustão consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado, em que a velocidade inicial era de 6m/min com incrementos de 3m/min a cada três minutos até a exaustão do animal (FERREIRA, ROLIN, GRANÁ, BARTHOLOMEU & BRUM, 2004). A exaustão foi identificada no momento em que o animal não conseguia mais manter o padrão de corrida. As variáveis analisadas foram o tempo e a distância percorrida durante o teste máximo.

2 O Carvedilol foi gentilmente cedido pela Companhia farmacêutica Baldacci que apóia esse estudo.

4.6 Avaliação cardiovascular

4.6.1 Avaliação ecocardiográfica

As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN, DEMARIA, KISSLO & WEYMAN, 1978).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado antes e após o período de tratamento farmacológico, quando os animais estivessem com cinco e sete meses de idade, respectivamente. Os exames foram realizados por um único observador que estava cego tanto para o genótipo quanto para o tipo de tratamento realizado. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados pelo anestésico volátil halotano, sendo mantido um fluxo constante de O₂ misturado ao anestésico. Este animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 14 MHz. As imagens foram feitas com uma frequência de 14 MHz, para a otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL. Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD), em discos ópticos (Sony 128Mb) e em papel fotográfico (Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDFVE) e sistólico (DSFVE) do ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole e diástole. Após a realização das medidas foi calculada a massa do ventrículo esquerdo, segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a massa do ventrículo esquerdo pela utilização da seguinte fórmula matemática: $LVM = [(DDFVE+SIV+PP)^3 - (DDFVE)^3] \times$

1,047, onde 1,047 (mg/mm^3). Além da massa do ventrículo esquerdo, foi calculada a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ($\text{Fen}\% = [\text{DDFVE} - \text{DSFVE}]/\text{DDFVE}] \times (100)$).

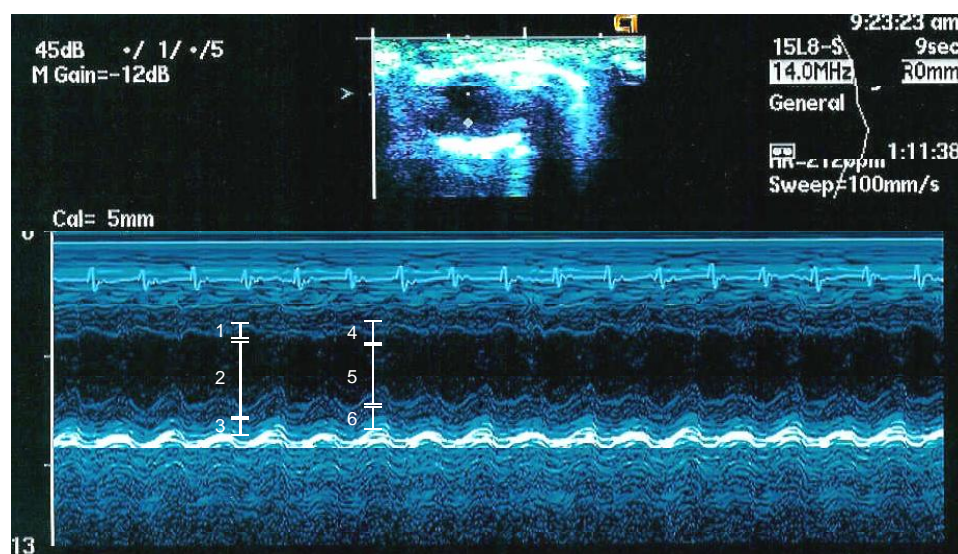


FIGURA 1- Análise ecocardiográfica em modo monodimensional realizada em camundongos. Onde: 1; espessura do septo interventricular na diástole; 2; diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; 3; espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 4; espessura do septo interventricular na sístole; 5; diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; 6; espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole.

4.6.2 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A medida indireta da pressão arterial caudal foi realizada pelo método de pletismografia de cauda. O camundongo foi colocado numa caixa restritora com a superfície aquecida o suficiente para vasodilatar a artéria caudal. Em seguida, um esfigmomanômetro (adaptado para camundongos) foi colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal. Em seguida,

a pressão do aparelho foi diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica. A pressão arterial foi captada por um transdutor eletromagnético (Kent Scientific) localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.). O sinal era repassado para um conversor de sinal analógico da pressão arterial para digital (Stemtech, Inc) e registrado em tempo real no microcomputador (Gateway 2000, 4DX2, 66V), sendo analisado pelo programa AT/CODAS com uma frequência de amostragem de 1000Hz por canal.

Esse método visava avaliar a frequência cardíaca e da pressão arterial caudal ao longo do período de tratamento.

4.7 Sacrifício e coleta de tecidos

Vinte e quatro horas após a realização do teste de capacidade funcional, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Após o sacrifício dos camundongos, foi realizada excisão do coração para ulterior pesagem. Além disso, as gorduras retroperitoneal e epididimal (que auxiliaram na estimação da gordura corporal) foram pesadas e comparadas entre os grupos.

O sangue será centrifugado para separação do plasma e guardados em freezer -80°C.

Os corações foram submetidos à separação das câmaras em átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo, sendo que o septo ventricular em sua totalidade fez parte do ventrículo esquerdo. Em seguida, as câmaras foram pesadas separadamente. Apenas os átrios foram pesados conjuntamente. Os ventrículos esquerdos foram rapidamente imersos em formalina tamponada 4% por 48 horas, para ulterior processamento histológico.

4.8 Análise morfométrica cardíaca

Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual, com cortes de quatro micra e coloração por hematoxilina-eosina ou picrossírius. A análise morfométrica cardíaca foi realizada pela medida do diâmetro transverso dos cardiomiócitos e da avaliação do grau de fibrose do miocárdio. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger (InCor-FMUSP).

A medida do diâmetro transverso dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500), com aumento de 400x. Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O critério de escolha foi a integridade do cardiomiócito e a localização central do núcleo. O diâmetro dos cardiomiócitos foi considerado a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal.

Uma outra parte dos ventrículos esquerdos foram armazenados em formalina 4% foram destinados à análise quantitativa de colágeno. Os ventrículos esquerdos foram cortados em quatro níveis equidistantes em anéis de 5 µm ao longo de seu maior eixo. Os anéis foram embebidos em parafina e corados com Picrossírius. A seguir, o grau de fibrose do miocárdio foi avaliado pelo método de volumetria de pontos através de microscópio óptico. O volume relativo ocupado por tecido conjuntivo nos ventrículos foi medido aleatoriamente com uma ocular especial contendo um retículo de integração de 25 pontos (cinco linhas paralelas com cinco pontos cada). Foi avaliado o número de vezes em que os pontos caem sobre tecido conjuntivo em 25 campos microscópicos. A fração de volume ocupada por tecido conjuntivo (Ppi) foi calculada através da fórmula:

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

Onde, p é a soma do número de pontos que caem sobre áreas preenchidas com tecido conjuntivo, P é o número total de pontos que caem no

campo total da lâmina. Esta análise teve como objetivo identificar possíveis alterações histopatológicas decorrentes da miocardiopatia tóxica desenvolvida pelos camundongos KO e o possível remodelamento cardíaco após o período de tratamento farmacológico.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. A porcentagem de sobrevivência foi analisada pelo teste Mantel-Haenszel logrank e modelo de regressão de Cox.

As variáveis peso corporal, pressão arterial caudal, frequência cardíaca, tolerância ao esforço e ecocardiograma, foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas. O peso das gorduras, diâmetro de miócitos e fração de colágeno pela análise de variância de um caminho.

Em caso de significância foi utilizado *post-hoc* de Tukey. Para todas as análises, foram adotados como nível de significância valores com $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Apresentaremos na presente seção os resultados do estudo realizado com camundongos controle e camundongos KO, subdivididos de acordo com a TABELA 2.

TABELA 2- Amostra utilizada e distribuição entre os grupos controle (CO)
e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO)

Grupo controle	Grupo KO			
Salina	Salina	Propranolol	Metoprolol	Carvedilol
22	22	22	30	20

5.1 Teste de tolerância ao esforço

Antes e após o período de tratamento dos animais foram realizados testes de exercício progressivo escalonado até a exaustão, em esteira rolante, com o intuito de verificar a tolerância ao esforço nos camundongos controle e com cardiomiopatia.

Observamos que os animais KO apresentaram intolerância ao esforço aos cinco meses de idade quando comparados aos camundongos controle de mesma faixa etária (FIGURA 2). Essa resposta se manteve aos sete meses de idade. Interessante nos camundongos KO, o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos não modificou a tolerância ao esforço.

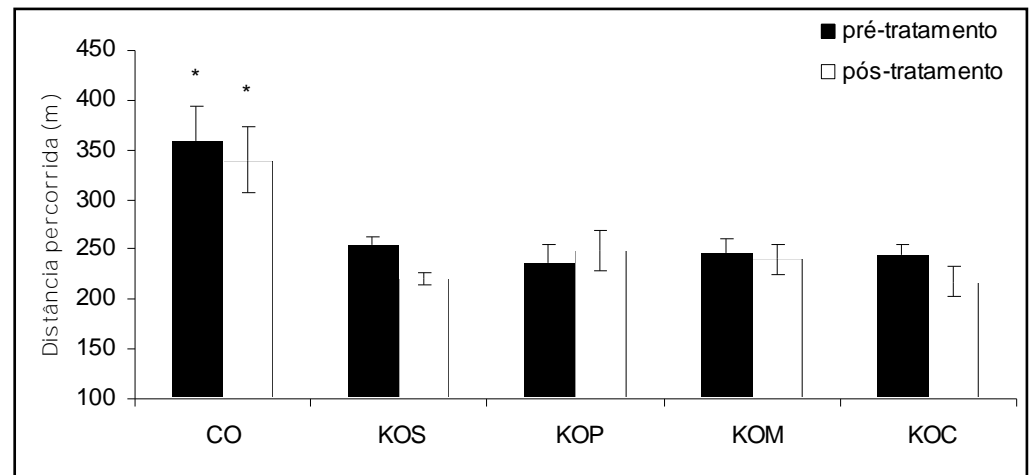


FIGURA 2- Distância percorrida no teste de esforço antes e após período de experimento em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* Diferença significativa vs KO

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. ($p \leq 0.05$)

5.2 Medidas cardiovasculares

5.2.1 Evolução da pressão arterial caudal e frequência cardíaca

Na FIGURA 3 observamos que o comportamento da pressão arterial caudal medida nos grupos estudados ao longo de oito semanas de experimento. Conforme observado, não encontramos alteração da PA caudal em nenhum dos grupos estudados. A não modificação da pressão arterial nesse modelo genético de

cardiomiopatia por hiperatividade simpática já era esperada e foi demonstrada anteriormente em nosso laboratório.

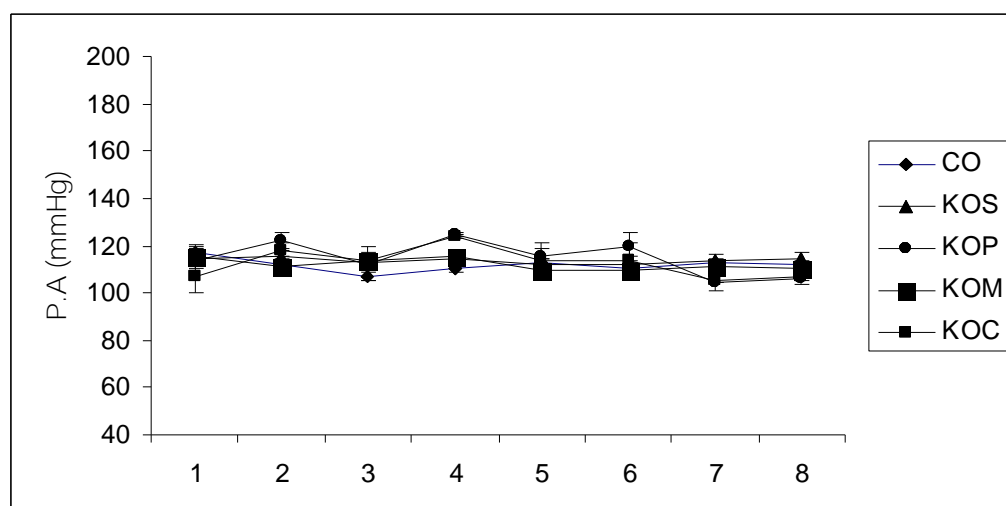


FIGURA 3- Resposta da pressão arterial ao longo do período de experimento em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

Na FIGURA 4 observamos que a freqüência cardíaca durante o período de tratamento. Nos camundongos KO tratados com salina observamos taquicardia basal típica desse modelo de cardiomiopatia. Esses resultados de freqüência cardíaca demonstram que as doses dos antagonistas β -adrenérgicos utilizados no projeto de pesquisa são de fato equipotentes em reduzir a freqüência cardíaca, o que facilitou a comparação intergrupos. Além disso, a redução da freqüência cardíaca parece estar associada à melhora na função sistólica, representada pela fração de encurtamento como pode ser observado na FIGURA 5.

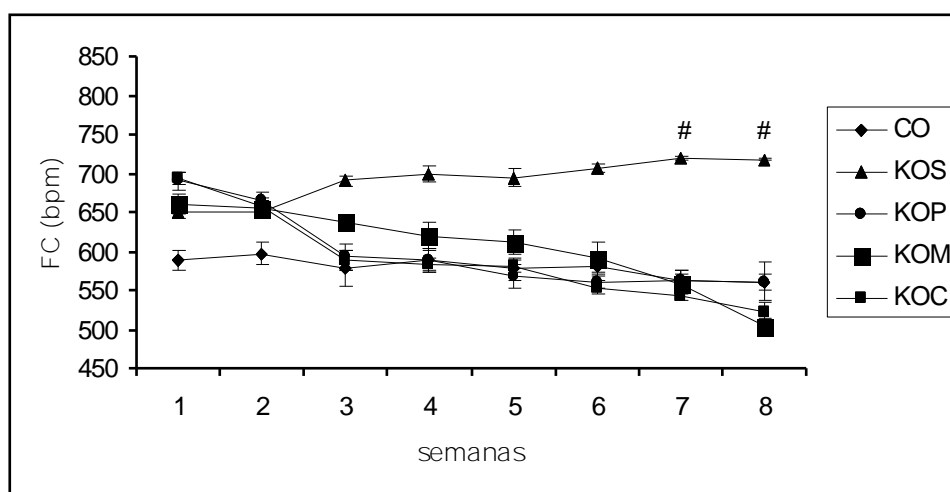


FIGURA 4- Resposta da freqüência cardíaca durante o período de experimento em camundongos controle (CO) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M) e carvedilol (C)

Diferença significativa vs CO, KOP, KOM e KOC

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. ($p \leq 0.05$)

5.3 Avaliação da função ventricular

Observamos na FIGURA 5 a realização do exame ecocardiográfico em camundongos. Portanto, a seguir, apresentaremos os dados de fração de encurtamento (índice de função sistólica) obtidos antes e após o período de dois meses de tratamento com antagonistas β -adrenérgicos, com o intuito de verificar o efeito respectivo dos antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações sobre a função sistólica. Os camundongos KO tratados com salina apresentaram redução de fração de encurtamento quando comparados aos camundongos controle de mesma faixa etária, (15% vs 21% respectivamente $p \leq 0,05$). Interessante, o tratamento com

antagonistas β -adrenérgicos, independente da geração utilizada, restaurou a fração de encurtamento nos camundongos KO.

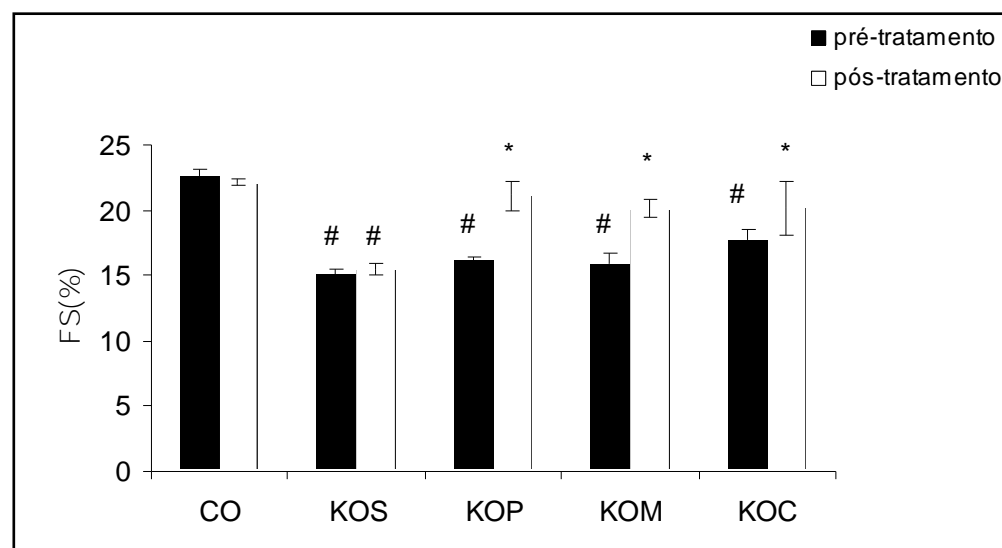


FIGURA 5- Fração de encurtamento (FS) antes e após período de experimento em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* Diferença significativa para pré-tratamento ($p \leq 0.05$)

Diferença significativa para CO e pós-tratamento ($p \leq 0.05$)

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

Na TABELA 3 observamos os dados de diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole e durante a diástole obtidos no exame ecocardiográfico. Além disso, podemos observar a frequência cardíaca durante o exame.

Embora não tenhamos observado diferença significativa no diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo dos camundongos KO quando comparados aos camundongos do grupo controle, o diâmetro sistólico final estava significativamente aumentado nos camundongos KO tratados com salina em relação aos demais grupos estudados. Esses dados sugerem que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos reverte a dilatação do ventrículo esquerdo em sístole nos camundongos com cardiomiopatia. Interessante, durante o exame a frequência cardíaca entre os grupos estudados foi mantida semelhante para que evitássemos sua influencia sobre a contratilidade, já que o aumento da frequência cardíaca aumenta a contratilidade cardíaca.

TABELA 3- Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSFVE) diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDFVE) e frequência cardíaca (FC) durante exame ecocardiográfico em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C).

	DSFVE pré (mm)	DSFVE pós (mm)	DDFVE pré (mm)	DDFVE pós (mm)	FC pré (bpm)	FC pós (bpm)
CO	3,01 ± 0,08	2,99 ± 0,08	3,86 ± 0,09	3,85 ± 0,09	433 ± 31	448 ± 38
KOS	3,35 ± 0,02	3,36 ± 0,07*	3,96 ± 0,02	3,97 ± 0,09	451 ± 42	437 ± 45
KOP	3,38 ± 0,07	3,16 ± 0,05	4,04 ± 0,07	4,01 ± 0,05	435 ± 31	440 ± 35
KOM	3,40 ± 0,05	3,10 ± 0,03	4,05 ± 0,06	4,02 ± 0,09	455 ± 37	464 ± 44
KOC	3,25 ± 0,04	3,03 ± 0,06	3,94 ± 0,06	3,96 ± 0,08	461 ± 44	457 ± 35

*Diferença significativa para CO pré CO pós, KOP pós, KOM pós e KOC pós ($p \leq 0.05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

5.4 Avaliação da massa corporal ao longo do período de tratamento

A evolução do peso corporal dos animais utilizados no experimento foi acompanhada durante as oito semanas de tratamento, e, como se observa na FIGURA 7, não houve diferença significativa no peso dos camundongos durante tal período.

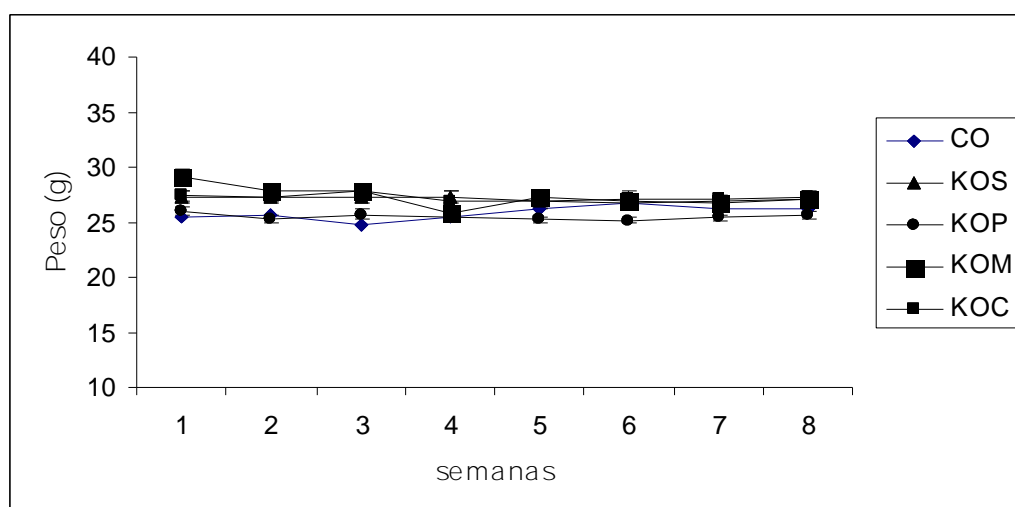


FIGURA 6- Evolução do peso corporal (PC) ao longo do período de experimento nos grupos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

Observamos na FIGURA 7 o peso das gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) corrigido pelo comprimento da tíbia após o período experimental nos grupos estudados. Apesar de uma haver tendência de queda nos camundongos KO tratados com salina ($p = 0,095$), não observamos diferença significativa do peso da gordura retroperitoneal entre os grupos estudados. Entretanto, quando analisamos o peso da gordura epididimal observamos que os camundongos KO tratados com salina apresentaram valores significativamente menores quando comparado com os demais grupos estudados.

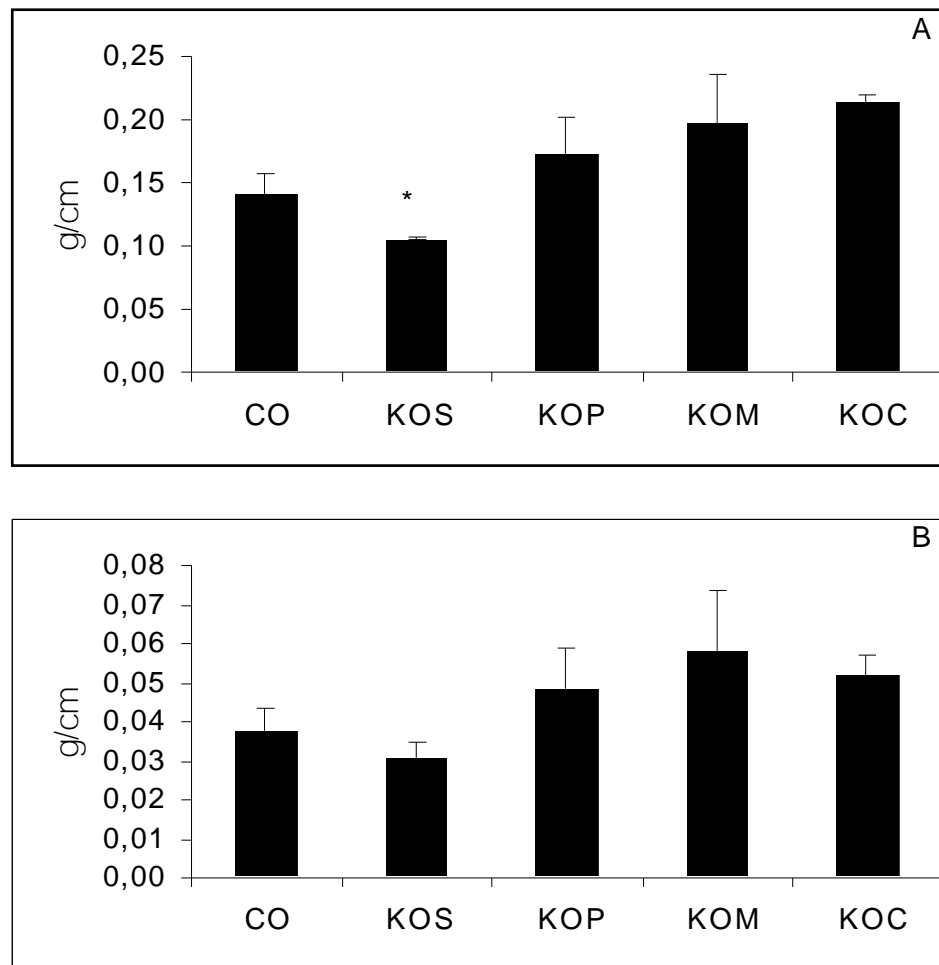


FIGURA 7- Peso das gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) após período de experimento em camundongos controle (CO) com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* Diferença significativa para CO, KOP, KOM, KOC ($p \leq 0.05$)

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey

5.5 Análises morfológicas e morfométricas cardíacas

5.5.1 Peso das câmaras cardíacas, diâmetro dos cardiomiócitos cardíacos e fração de colágeno cardíaco

Na FIGURA 8 observamos que o peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia dos animais KO apresentaram um aumento significativo quando comparados aos animais controle e KO tratados com antagonistas β -adrenérgicos.

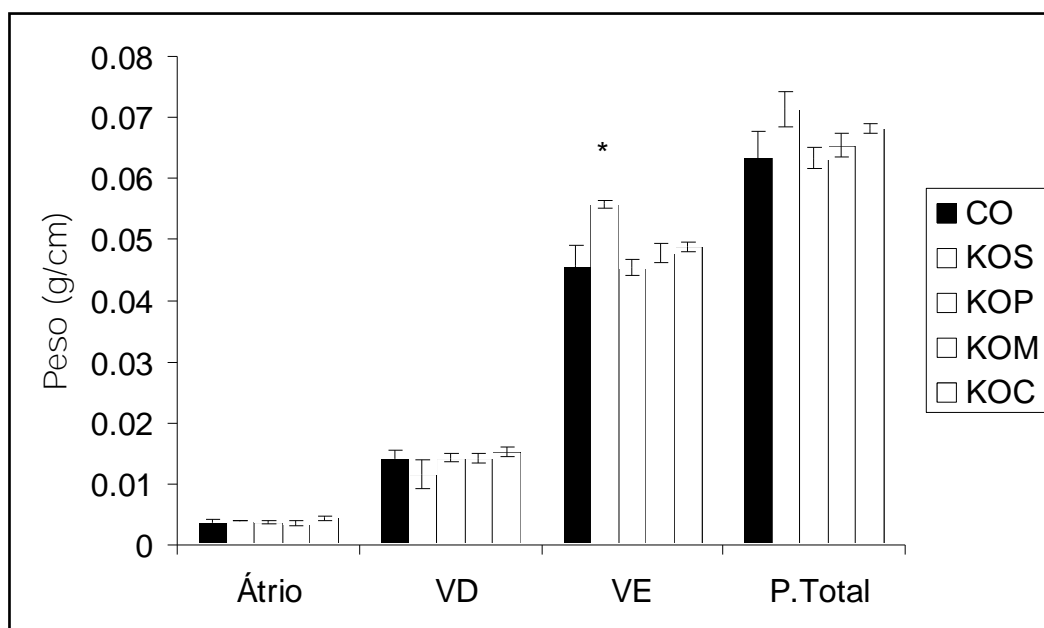


FIGURA 8- Peso das câmaras cardíacas corrigido pelo comprimento da tíbia ao término do período de experimento em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* diferença significativa vs KOP, KOM e KOC

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. ($p \leq 0.05$)

O diâmetro dos cardiomiócitos de camundongos controle e KO está apresentado na FIGURA 9. Os camundongos KO tratados com salina apresentaram aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados com os camundongos controle e KO tratados com antagonistas β - adrenérgicos. No entanto, vale a pena ressaltar que enquanto o tratamento dos camundongos KO com propranolol e carvedilol reduziram parcialmente o diâmetro dos cardiomiócitos, o tratamento desses animais com metoprolol restabeleceu as dimensões dos cardiomiócitos que passaram a ser semelhantes as dos camundongos controle.

Na FIGURA 10 observamos a fração de colágeno em camundongos controle e camundongos KO. Os camundongos KO tratados com salina apresentaram a fração de colágeno significativamente aumentada (3x) em relação aos camundongos controle. Interessante notar que somente os camundongos KO tratados com metoprolol apresentaram uma redução parcial e significativa da fração de colágeno cardíaco, o mesmo não acontecendo com os camundongos KO tratados com propranolol e carvedilol.

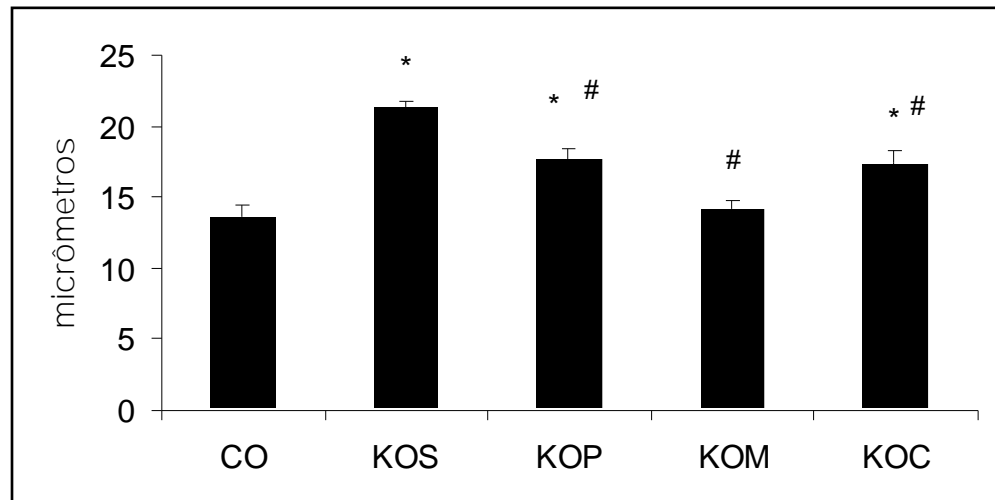


FIGURA 9- Diâmetro dos cardiomiócitos após o período de experimento nos grupos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* diferença significativa vs Grupo CO salina ($p < 0,05$).

diferença significativa vs KOS e KOC ($p < 0,05$).

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey.

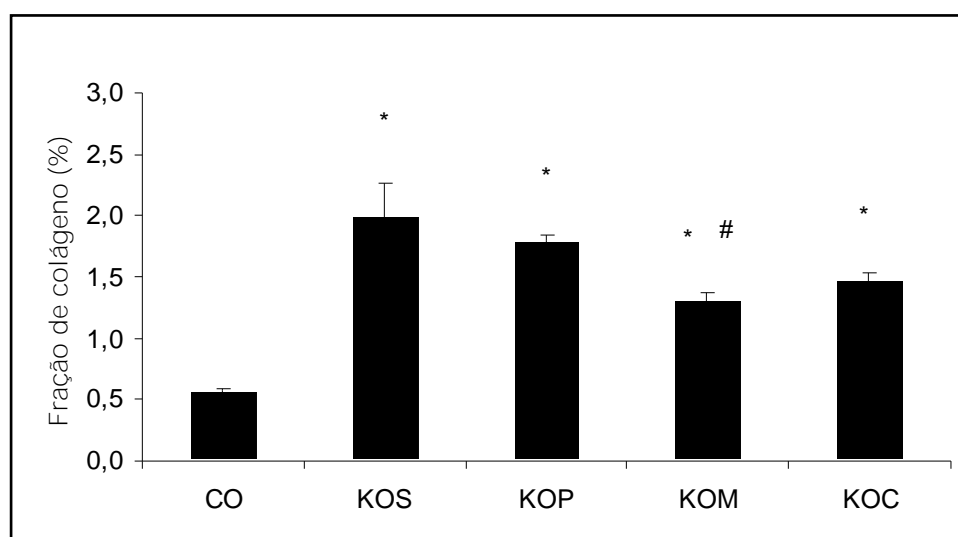


FIGURA 10- Fração de colágeno após o período de experimento nos grupos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C)

* diferença significante vs CO salina ($p < 0,05$).

diferença significante vs KOS e KOC ($p < 0,05$).

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey.

5.6 Mortalidade ao longo do estudo

Ao longo do protocolo experimental, obtivemos uma alta taxa de mortalidade dos camundongos KO em função do agravamento da cardiomiopatia.

Os camundongos KO tratados com salina apresentaram uma mortalidade de 50% ao longo dos 2 meses de estudo. Os camundongos KO tratados com propranolol apresentaram uma redução da taxa de mortalidade (24%) que foi inferior à redução observada pelo tratamento com metoprolol e carvedilol (31%).

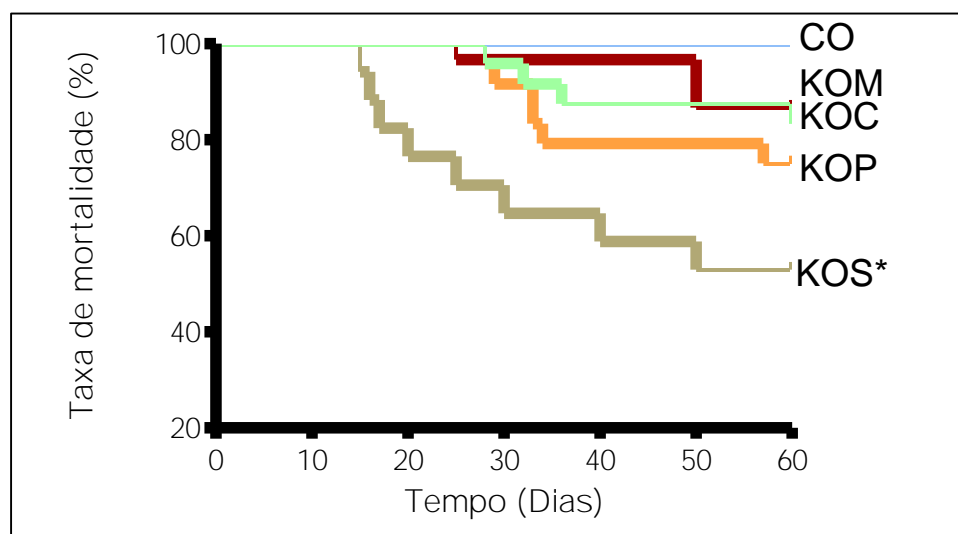


FIGURA 11- Curva de mortalidade durante o período de experimento nos grupos controle (CO) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) tratados com salina (S), propranolol (P), metoprolol (M), e carvedilol (C).

* Diferença significativa vs CO e KOP, KOM e KOC

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de Haenszel logrank e modelo de regressão de Cox (p 0.05)

6 DISCUSSÃO

Em sumário, o tratamento com antagonistas dos receptores β -adrenérgicos em camundongos KO:

- 1- Não modificou a tolerância ao esforço, ou seja, os camundongos KO permaneceram intolerantes ao esforço quando comparados aos camundongos controle.

- 2- Reduziu a frequência cardíaca de repouso em níveis semelhantes aos dos camundongos controle, de maneira equipotente entre as gerações utilizadas no estudo.
- 3- Não modificou a pressão arterial
- 4- Restaurou a função sistólica estimada a partir da fração de encurtamento e restabeleceu a dimensão do ventrículo esquerdo em sístole.
- 5- Reduziu o peso do ventrículo esquerdo que tornou-se então semelhante ao do grupo controle.
- 6- Teve efeito diferenciado sobre o diâmetro dos cardiomiócitos. Enquanto propranolol e carvedilol reduziram parcialmente o diâmetro dos cardiomiócitos, o metoprolol restabeleceu as dimensões dos cardiomiócitos dos camundongos KO que passaram a ser semelhantes aos dos camundongos controle.
- 7- Teve efeito diferenciado sobre a fração de colágeno. Somente o metoprolol foi capaz de reduzir, mesmo que parcialmente, a fração de colágeno cardíaco nos camundongos KO.
- 8- Teve efeito diferenciado sobre a mortalidade. Enquanto que o metoprolol e carvedilol reduziram a alta taxa de mortalidade dos camundongos KO (50%) em 31 %, o propranolol reduziu-a em apenas 24 %.

6.1 Tolerância ao esforço

Uma das principais características dos pacientes portadores de insuficiência cardíaca é a reduzida capacidade de realização de esforço físico (RUBIM, NETO, ROMEO & MONTERA, 2006). Por essa razão, a capacidade de realização de esforço vem sendo utilizada como um índice importante para diagnosticar a gravidade da doença e referir o paciente para cirurgia de transplante cardíaco (GRIGIONE, RUSSO, POTENA, IELASI, FABBRI, BACHI-REGGIANI, CARIGI, MASURACA, BIGLIARDDI, COCCOLO, MAGNARI, SPECCHIA, MAGELLI & BRANZI, 2006). Em adição, o teste de tolerância ao esforço é também utilizado para testar a eficácia do medicamento utilizado no tratamento de portadores de insuficiência cardíaca (RUBIM et al., 2006).

A intolerância ao esforço físico está associada a um consumo de oxigênio reduzido. Segundo a Lei de Fick ³, o consumo de oxigênio é influenciado tanto pelo débito cardíaco quanto pela diferença arterio-venosa de oxigênio. Dessa maneira o consumo de oxigênio representa a capacidade do coração em ofertar oxigênio para os tecidos, além da capacidade de determinado tecido (músculo esquelético em caso de exercício) em utilizar o oxigênio que está sendo ofertado. Com isso, podemos dizer de maneira simplificada, que o consumo de oxigênio está relacionado a fatores centrais (coração) e fatores periféricos (músculo esquelético).

Nós observamos que nenhum dos antagonistas β -adrenérgicos melhorou a tolerância ao esforço após dois meses de tratamento. A limitação na tolerância ao esforço apresentada em pacientes com insuficiência cardíaca, mesmo após a terapia com antagonistas β -adrenérgicos, está associada a uma limitada capacidade de aumento do consumo máximo de oxigênio (DE MATOS et al., 2004; FOLEY, BRUBAKER, MATRAZZO, BERRY, PRIBANICH & MILLER, 1997; WHITTE, THACKRAY, NIKITIN, CLELAND & CLARK, 2005). De fato, como esse tipo de medicamento restringe a resposta da frequência cardíaca ao exercício, acabará reduzindo o débito cardíaco e por fim o consumo de oxigênio nos portadores de insuficiência cardíaca em exercícios de intensidades mais altas. Além disso, os antagonistas β -adrenérgicos têm muito pouco efeito sobre a musculatura esquelética, outro fator que poderia afetar a resposta do consumo de oxigênio ao exercício físico. Em trabalho prévio de nosso grupo observamos que o tratamento de portadores de insuficiência cardíaca com carvedilol por seis meses não alterou a resposta do fluxo sanguíneo e resistência vascular periférica tanto em repouso quanto durante a execução de exercício de preensão de mãos (DE MATOS et al., 2004). Esses dados corroboram os achados de HRYNIEWICZ, ANDRONE, HUDAIHED e KATZ (2003) que também não observaram alterações nas respostas de resistência vascular periférica e fluxo sanguíneo em portadores de insuficiência cardíaca. Apesar da conhecida propriedade vasodilatadora do carvedilol (antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos), tal propriedade parece exercer pouco efeito sobre o aporte sanguíneo ofertado para o músculo em exercício.

3-Adolph Fick, médico alemão que viveu entre os anos de 1829 e 1901 e propôs a Lei de Fick que relaciona o consumo de oxigênio com fluxo sanguíneo e a diferença artério-venosa.

Essa resposta muito provavelmente se deve a dessensibilização desses receptores a ação dos antagonistas α_1 -adrenérgicos em longo prazo. Outra possível limitação da terapia com antagonistas β -adrenérgicos sobre a oferta de oxigênio para o músculo esquelético diz respeito a sua ação sobre os receptores β_2 -adrenérgicos no músculo liso, que têm a função de relaxar o músculo liso e conseqüentemente promover vasodilatação. Com isso a ação de antagonistas β -adrenérgicos não seletivos pode promover queda do aporte sanguíneo para a musculatura esquelética limitando assim a capacidade de realizar esforço físico.

Vale a pena ressaltar que os estudos vêm demonstrando que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos não proporciona aumento na capacidade máxima de realização de esforço físico tiveram a duração de no máximo seis meses (GULLESTAD, DOLVA, SOYLAND & KJEKSHUS, 1988; KONHO, YOSHIKAWA, YOSHIKAWA, NAKAMURA, ANZAI, SATOH & OGAWA, 2005; WHITTE, et al., 2005). Entretanto, em recente estudo que avaliou a tolerância ao esforço ao longo de 12 meses (PATRIANAKOS, PARTHENAKIS, MAVRAKIS, DIAKAKIS, CHLOUVERAKIS & VARDAS, 2005), os autores observaram que após esse período de tratamento com carvedilol e nebulolol havia um aumento na tolerância ao esforço. Interessante citar que no mesmo estudo não observava-se aumento na tolerância ao esforço em avaliação feita no terceiro mês de tratamento. Portanto, esses dados sugerem que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos pode causar algum tipo de adaptação que repercute em aumento na tolerância ao esforço em tratamentos com maior duração.

Uma das limitações de nosso estudo foi não avaliar a capacidade de realização de esforço em intensidades submáximas, pois parece ser consenso que em intensidades submáximas de esforço físico o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos é efetivo (DEMERS, Mc KELVIE, NEGASSA & YUSUF, 2001; GULLESTAD, et al., 1988; POELZL, FRICK, LACKNER, HUEGEL, ALBER, MAIR, HEROLD, SCHWARZACHER, PACHINGER, & WEIDINGER, 2006). Testes de esforço submáximos vêm sendo utilizados com freqüência no diagnóstico da insuficiência cardíaca, pois não exigem um grande aumento da freqüência cardíaca. Essa característica é importante na medida em que o bloqueio dos receptores

adrenérgicos não interfere no resultado e conseqüentemente na interpretação dos resultados obtidos durante o teste. Por essa razão um dos testes diagnósticos usados no diagnóstico da insuficiência cardíaca é o teste de seis minutos (DEMERS et al., 2001) aonde o paciente tem que executar uma caminhada durante seis minutos. Futuramente pretendemos avaliar o consumo de oxigênio em teste de esforço submáximo nesses animais KO para verificar se o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos pode ter alguma repercussão na realização de esforço numa condição de menor solicitação de aumento do débito cardíaco.

6.2 Medidas cardiovasculares

Não observamos alteração na pressão arterial dos camundongos KO. Poderia-se especular sobre o aumento da pressão arterial em função desses animais apresentarem hiperatividade simpática. No entanto, como esses animais apresentam uma redução importante da fração de encurtamento (FIGURA 5) e provavelmente do débito cardíaco, isso poderia se contrapor ao aumento da resistência vascular periférica e conseqüentemente a pressão arterial não se alteraria. Ainda quanto à resposta da pressão arterial ao tratamento, esperávamos que a propriedade vasodilatadora do carvedilol pudesse repercutir em queda da pressão arterial, porém tal resposta não foi observada. No entanto, o uso crônico de carvedilol leva a dessensibilização de receptores α_1 -adrenérgicos (KUBO et al., 2001) o que minimizaria a ação vasodilatadora desse antagonista β -adrenérgico.

Quanto à resposta da freqüência cardíaca ao longo do estudo, observamos que os animais KO tratados com salina apresentaram taquicardia característica do modelo. O tratamento com propranolol, metoprolol e carvedilol proporcionou uma queda na freqüência cardíaca de igual magnitude (FIGURA 4) e a freqüência cardíaca passou a ser semelhante a dos camundongos controle. Esse resultado nos deu segurança para realizar comparações entre as respostas ao uso desses medicamentos, uma vez que tem sido preconizado que somente doses equipotentes de antagonistas β -adrenérgicos podem ter seus efeitos comparados (TALBERT, 2004). Alternativa que poderíamos ter adotado para equiparar as doses dos antagonistas β -adrenérgicos utilizadas no experimento seria utilizar doses

equimolares de propranolol, metoprolol e carvedilol. No entanto, preferimos utilizar a frequência cardíaca como indicador do efeito do bloqueio β -adrenérgico, por ter mais proximidade ao que é realizado em estudos clínicos.

O uso de antagonistas β -adrenérgicos leva a uma queda importante no trabalho cardíaco. O trabalho cardíaco além de ser influenciado pela frequência cardíaca, está relacionado com a força de contração do miocárdio. A diminuição do trabalho cardíaco leva a uma menor demanda energética e menor produção de metabólitos provenientes da contração cardíaca. A diminuição da força de contração do músculo cardíaco tem importante repercussão no aumento do aporte sanguíneo do miocárdio, na medida em que diminui da pressão intra-ventricular ao longo do ciclo cardíaco (FOX & MATHEWS, 1983). Essa menor pressão dentro das cavidades cardíacas facilita a circulação de sangue nas artérias coronárias aumentando a oferta de oxigênio e remoção de metabólitos. A oferta de oxigênio para o miocárdio melhora em função da redução do trabalho cardíaco e contribui para a manutenção dos estoques de ATP e pH intracelular. De fato, recentemente foi demonstrado que o aumento das concentrações de adenosina em função da hidrólise do ATP está relacionado com a gravidade da insuficiência cardíaca (CHIDA, OTANI, KOHZUKI, KAGAYA, TAKAI, TAKAHASHI, YAMADA & ZUGUCHI, 2006). O aumento da demanda energética em função do aumento do trabalho cardíaco, além de gerar aumento nas concentrações de adenosina também gera aumento de metabólitos que alteram o pH intracelular e aumenta a produção fosfato inorgânico (P_i) que tem ação direta sobre a força de contração reduzindo-a. O aumento na concentração de P_i intracelular interfere na função de inúmeras enzimas envolvidas na produção de energia, assim como na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (LIOU & CHANG, 2004).

6.3 Avaliação da função sistólica

Os parâmetros de função sistólica como a fração de ejeção e a fração de encurtamento são normalmente utilizados para fins de prognóstico e como indicadores da progressão da insuficiência cardíaca (FRIGERIO & ROUBINA, 2005). Atualmente é consenso na literatura que o tratamento da insuficiência cardíaca com

antagonistas β -adrenérgicos de primeira geração (KAUL, VERMA & GARG, 1988), segunda geração (KOBAYASHI, MACHIDA, MITSUISHI & YAMANE, 2004) e terceira geração (PATRIANAKOS, et al., 2005) melhoram os índices de função sistólica. Apesar de se observar que a terapia com antagonistas β -adrenérgicos, independente da geração utilizada, tem repercussão positiva sobre a função sistólica, estudos comparando o efeito de antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações sobre a função sistólica não demonstraram existir supremacia de uma geração de antagonistas β -adrenérgicos sobre outras (KHONO et al., 2005). Esses dados nos levam a supor que as propriedades farmacodinâmicas dos antagonistas β -adrenérgicos isoladamente não têm repercussão sobre a fração de encurtamento.

Analisando a fração de ejeção de pacientes com cardiomiopatia dilatada, YASUMURA, TAKEMURA, SAKAMOTO, KITAKAZE e MIYATAKE (2003) observaram que quatro meses de tratamento com bisoprolol e carvedilol aumentava a fração de encurtamento. Associado a melhora na função sistólica desses pacientes, foi observado que importantes proteínas envolvidas na regulação do transiente de cálcio intracelular tiveram suas expressões restabelecidas. As reduções nos transientes de cálcio intracelular estão relacionadas com a redução na função do coração. Portanto, o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos tem grande importância na manutenção ou ganho de função cardíaca por agir diretamente sobre a expressão de proteínas como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), a proteína reguladora de sua atividade (fosfolambam) e o trocador sódio-cálcio.

Em nosso estudo utilizamos camundongos KO que desenvolvem cardiomiopatia em função de uma hiperatividade simpática. Aos cinco meses de idade esses animais KO apresentam fração de encurtamento diminuída quando comparada a de camundongos controle da mesma idade. Além disso, pôde-se observar que o tratamento de dois meses com os antagonistas β -adrenérgicos restaurou a fração de encurtamento desses animais independente da geração de antagonistas β -adrenérgicos utilizada (FIGURA 5). Porém é importante ressaltar que a tolerabilidade aos antagonistas β -adrenérgicos utilizados foi diferente sendo que o

propranolol foi menos tolerado e o que reduziu em menor taxa a mortalidade dos camundongos tratados (FIGURA 11).

Nosso estudo apresentou como principal limitação a impossibilidade da análise da função diastólica por meio do cálculo do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), e da razão entre as ondas E (enchimento rápido do ventrículo) e A (enchimento lento do ventrículo). Essa análise não foi feita, pois em camundongos há a sobreposição das ondas E e A devido a alta frequência cardíaca desses animais, mesmo anestesiados.

6.4 Peso das câmaras, diâmetro de cardiomiócitos e síntese de colágeno

O sucesso no uso de antagonistas β -adrenérgicos no tratamento da insuficiência cardíaca também se deve ao seu efeito sobre o remodelamento cardíaco que na insuficiência cardíaca está relacionado ao processo de morte celular programada (apoptose), hipertrofia de cardiomiócitos remanescentes e síntese de colágeno. Esse conjunto de alterações estruturais diminui a eficiência do coração em atender as demandas fisiológicas do organismo, levando o paciente à morte. Portanto, o uso de antagonistas β -adrenérgicos no tratamento da insuficiência cardíaca tem repercussão direta sobre o remodelamento cardíaco por evitar que os altos níveis de catecolaminas, característicos na insuficiência cardíaca, exerçam efeitos deletérios no tecido cardíaco. O remodelamento reverso associado ao uso de antagonistas β -adrenérgicos reverte os efeitos da hiperatividade simpática sobre o tecido cardíaco, reduzindo assim o processo de apoptose, hipertrofia de cardiomiócitos (KAWAI, et al., 2004) e síntese de colágeno (SHIGEYAMA, YASUMURA, SAKAMOTO, ISHIDA, FUKUTOMI, ITHO, MIYATAKE & KITAZAKE, 2005). Sabe-se também que os antagonistas β -adrenérgicos reduzem as concentrações de angiotensina II no tecido cardíaco, que é um potente promotor de hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose (HARRINGTON, LUTRELL & ROCKMAN, 2003). Por essa razão, o remodelamento reverso é uma das mais importantes ações dos antagonistas β -adrenérgicos, pois tem repercussão direta no prognóstico, aumentando a expectativa de vida do paciente (POOLE-WILSON et al., 2003).

Em nosso estudo observamos que os animais KO que possuem hiperatividade simpática apresentaram um aumento da massa do ventrículo esquerdo que foi acompanhada de um maior diâmetro transverso dos cardiomiócitos (FIGURAS 8 e 9) quando comparados aos animais controle e os KO tratados com antagonistas β -adrenérgicos. Apesar de todos os antagonistas β -adrenérgicos terem reduzido o peso do ventrículo esquerdo e diâmetro dos cardiomiócitos, o metoprolol foi mais eficaz em reduzir o diâmetro dos cardiomiócitos. Esse resultado está provavelmente relacionado a seletividade do bloqueio β -adrenérgico do metoprolol. O metoprolol (antagonista β -adrenérgico de segunda geração) é seletivo para o subtipo β_1 -adrenérgico. Já está descrito que na insuficiência cardíaca os receptores β_2 -adrenérgicos quando estimulados ativam vias de sinalização diferentes daquelas pós-estímulo de receptores β_1 -adrenérgicos (XIAO, CHENG, ZHOU, KUSCHEL & LAKATTA, 1999). Com isso, a partir da sinalização da subunidade inibitória da proteína G($G_{\alpha i}$), que acopla-se somente a receptores β_2 -adrenérgicos, observamos estímulos antiapoptóticos que preservam o tecido cardíaco dos efeitos da hiperatividade simpática e conseqüentemente evitam o remodelamento cardíaco maléfico (COMMUNAL et al., 1999). Dessa maneira, acreditamos que a capacidade do metoprolol de bloquear somente os receptores β_1 -adrenérgicos seja uma importante propriedade farmacodinâmica, na medida em que permite o controle da morte celular programada do tecido cardíaco pelos receptores β_2 -adrenérgicos. Outra propriedade farmacodinâmica importante do metoprolol que possivelmente está envolvida no controle do remodelamento cardíaco maléfico é sua capacidade de antagonizar a atividade intrínseca do receptor. Essa resposta tem sido atribuída à capacidade de um antagonista β -adrenérgico inativar um receptor mesmo sem a presença do ligante (MAACK, CREMERS, FLESH, HOPER, SUDKAMP & BOHM, 2000). Já está descrito na literatura que o metoprolol exerce importante ação na modulação da atividade intrínseca do receptor β -adrenérgico no coração de pacientes com insuficiência cardíaca transplantados (MAACK et al., 2000). Nesse estudo os autores demonstraram que o metoprolol é capaz de diminuir a força de contração das células cardíacas mesmo em presença de forskolina (aumenta a interação entre a subunidade α_s da proteína G com a unidade catalítica da adenil

ciclase) indicando a capacidade de ação intrínseca da droga. Interessante citar que os mesmos experimentos foram realizados com carvedilol e não foram observados resultados semelhantes. Dessa forma, o metoprolol pode exercer um papel importante sobre o remodelamento cardíaco na medida em que evita que a atividade basal do receptor exerça papel no processo de remodelamento cardíaco. O metoprolol também tem a capacidade de aumentar a densidade de receptores β_1 -adrenérgicos na membrana celular (FLESH, ETTTELBRUCK, ROSENKRANS, MAACK, CREMERS, SCHULTER, ZOLK & BOHM, 2001). De fato, NETTE, ABRAHAM, UNGEMACH, OERTEL, KIRCH, LEINEWEBER, MOHR e DHEIN (2005) demonstraram recentemente que o tratamento com metoprolol, em pacientes indicados para cirurgia cardíaca, aumentava a densidade de receptores β_1 -adrenérgicos na membrana celular de células cardíacas. A diminuição da expressão de receptores β_1 -adrenérgicos pode ser entendida como um efeito deletério da hiperatividade simpática, que acarretaria em diminuição da função cardíaca e aumento reflexo da atividade nervosa simpática. Com isso, o aumento da densidade de receptores β_1 -adrenérgicos, embora pareça um contra-senso, faz com que a função cardíaca seja mantida sem aumento da atividade nervosa simpática. Além das propriedades farmacodinâmicas particulares aos antagonistas β -adrenérgicos de segunda geração, é conhecido que o metoprolol apresenta importante ação antioxidante (KAWAI et al., 2004) ação que "a priori" era atribuída somente aos antagonistas β -adrenérgicos de terceira geração. Essa ação pode também ter contribuído para a redução do diâmetro dos cardiomiócitos, na medida em que o controle de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco tem importante papel na regulação do processo de apoptose. A hipertrofia de cardiomiócitos é um mecanismo que visa compensar a perda de cardiomiócitos e manter a função dos remanescentes. Portanto, a preservação do tecido cardíaco em virtude da redução do estresse oxidativo do tecido cardíaco auxilia no remodelamento reverso.

Na insuficiência cardíaca o remodelamento cardíaco além de causar morte dos cardiomiócitos, aumenta a fração de colágeno e fibrose (SHIGEYAMA et al., 2005). Essa resposta tem como principal consequência o aumento do peso das câmaras cardíacas e redução da complacência das câmaras cardíacas que acaba

por afetar a função contrátil do coração reduzindo sua capacidade de atender as demandas metabólicas do organismo. O tratamento com antagonistas β -adrenérgicos também influenciam a síntese de colágeno, na medida em que essa síntese está relacionada com a liberação de fatores neuro-humorais como angiotensina II, fator de crescimento- β_1 (TGF- β_1), endotelina e catecolaminas (MANABE, SHINDO & NAGAI, 2002). O uso de antagonistas β -adrenérgicos previne o coração da ação deletéria das catecolaminas e está associado a diminuição das concentrações circulantes de TGF- β_1 . A menor exposição do tecido cardíaco a esses fatores neuro-humorais é o principal mecanismo pelo qual a terapia com antagonistas β -adrenérgicos preserva o coração do aumento da síntese de colágeno. Em nosso estudo observamos que os camundongos KO apresentaram aumento na fração de colágeno quando comparados com os camundongos controle e os camundongos KO tratados com metoprolol. Entretanto, os camundongos KO tratados com propranolol e carvedilol não apresentaram redução significativa da fração de colágeno (FIGURA 10). Novamente o fato de o metoprolol ter demonstrado ser mais efetivo no remodelamento reverso está, provavelmente, relacionado a sua propriedade de bloqueio seletivo e sua ação anti-oxidante. Interessante citar que dados de nosso laboratório demonstram que treinamento físico não é capaz de reverter mesmo parcialmente, o aumento da síntese de colágeno nos camundongos KO (ROLIM, N.L. dados não publicados). Esses dados sugerem que os mecanismos pelos quais o treinamento físico e os antagonistas β -adrenérgicos melhoram a função sistólica são diferentes. Por fim, uma das limitações de nosso estudo foi realizar a análise do colágeno cardíaco por microscopia óptica. A utilização dessa técnica não nos permitiu diferenciar o tipo de colágeno no coração. Sabe-se que o colágeno do tipo 1 apresenta maior rigidez que o colágeno tipo 3 e essa diferenciação é importante para se saber até que ponto a terapia com β -adrenérgicos pode ter convertido o colágeno tipo 1 em colágeno tipo 3 além de ter diminuído a síntese do colágeno total.

6.5 Mortalidade ao longo do estudo

Inúmeros ensaios clínicos analisaram o efeito da terapia com antagonistas β -adrenérgicos sobre a morbidade e mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca (EFFECTS...., 1999; POOLE-WILSON et al., 2003). Apesar de ser consenso na literatura que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos melhora a qualidade de vida e reduz a mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca, os ensaios clínicos indicam que os antagonistas β -adrenérgicos de diferentes gerações podem agir de forma diferenciada sobre o prognóstico de portadores de insuficiência cardíaca (POOLE-WILSON et al., 2003; SORIANO, HOES, MEEMS & GROBBEE, 1997). Nos últimos anos, esses ensaios clínicos se dedicaram a comparar o efeito dos antagonistas β -adrenérgicos de segunda e terceira geração sobre a mortalidade do portador de insuficiência cardíaca (POOLE-WILSON et al., 2003). Embora essa comparação seja necessária e imprescindível, observa-se pouco cuidado com a padronização das doses e titulação das drogas ao longo dos ensaios clínicos. A padronização das doses é importante para que os efeitos das mesmas sejam comparáveis.

A mortalidade dos animais KO tratados com salina foi de 50% aos sete meses de idade, indicando a gravidade da cardiomiopatia nessa faixa etária. Esses dados corroboram os dados encontrados na literatura (BRUM et al., 2002). Observamos que o tratamento com metoprolol e carvedilol promoveram a mesma queda na taxa de mortalidade quando comparados aos KO tratados com salina. Entretanto tivemos o cuidado de utilizar doses de antagonistas β -adrenérgicos equipotentes em reduzir a frequência cardíaca dos animais KO (FIGURA 4). Apesar de termos observado queda similar na taxa de mortalidade nos camundongos KO tratados com metoprolol e carvedilol, os camundongos KO tratados com propranolol tiveram menor redução na taxa de mortalidade que parece estar relacionada à intolerância a esse medicamento (STEPHEN, 1966; TALWAR, BHARGAVA, UPASANI, VERMA, KAMLAKAR & CHOPRA, 1996). Em humanos, como os efeitos da intolerância ao propranolol, observa-se espasmos, tonturas, náuseas e vômitos. A intolerância ao propranolol deve-se ao fato de que essa droga tem uma alta afinidade pelos receptores β -adrenérgicos independentemente subtipo (propranolol é um

antagonista β -adrenérgico não-seletivo de primeira geração). Com isso observamos uma queda abrupta da frequência cardíaca e força de contração do coração e a conseqüente incapacidade de se suprir a demanda fisiológica do organismo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que antagonistas β -adrenérgicos de segunda e terceira geração são igualmente eficazes em restaurar a função sistólica dos camundongos KO e em reduzir a mortalidade nesses animais. Entretanto os resultados obtidos referentes ao remodelamento cardíaco sugerem que o tratamento com metoprolol foi mais eficaz em preservar a estrutura cardíaca. A repercussão em longo prazo dessa resposta ainda precisa ser avaliada e pretendemos dar continuidade ao estudo investigando os efeitos dos antagonistas β -adrenérgicos de segunda e terceira geração no controle de vias intracelulares envolvidas no controle da morte celular programada.

REFERÊNCIAS

ALBANESI, F. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v.85, n. 3. p. 155-56, 2005.

ALMEIDA, D. R.; DINIZ, R. V. Z.; VIEGAS R. F. M. ; SILVA, A. C.; CARVALHO A. C. C. Betabloqueadores na insuficiência cardíaca. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, v.10, n. 1, p. 35-39, 2000.

AL-NASSER, F.; YOUSUFUDDIN, M.; AL-NOZHA, F.; ANKER, S. D.; COATS, A. J.; PIEPOLI, M. F.; PONIKOWSKI, P. P. Effect of carvedilol on exercise tolerance in patients with chronic heart failure and a restrictive left ventricular filling pattern. American Journal of Cardiology, New York, v. 91, n.10, p.1281-3, 2003.

ALTMAN, J. D.; TRENDELENBURG, A. U.; MACMILLAN, L.; BERNSTEIN, D.; LIMBIRD, L.; STARKE, K.; KOBILKA, B. K.; HEIN, L. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A- adrenergic receptor knockout mice. Molecular Pharmacology, v. 56, n.1, p.154-61., 1999.

ARONOW, W. S., Postinfarction use of beta-blockers in elderly patients. Drugs Aging, Cleveland, v. 11 n. 6 p. 424- 432. 1997.

BRISTOW, M. R. Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. Journal of American college of Cardiology, Bethesda, v. 22 n. 4, Supplement A. p. 61-71, 1993.

BRISTOW, M. R.; GINSBURG, R.; UMANS, V.; FOWLER, M.; MINOBE, W. ; RASMUSSEN, R.; ZERA, P.; MENLOVE, R.; SHAH, P.; JAMIESON, S. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down- regulation in heart failure. Circulation Research, Dallas, v. 59, n.3, p.297-309., 1986.

BRUM, P. C.; KOSEK, J.; PATTERSON, A.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology, Bethesda, v. 283, n.5, p.H1838-45, 2002.

CHESLEY, A.; LUNDBERG, M. S.; ASAI, T.; XIAO, R. P.; OHTANI, S.; LAKATTA, E. G.; CROW, M. T. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. Circulation Research, Dallas, v. 87, n.12, p.1172-9., 2000.

CHIDA, K.; OTANI, H.; KOHZUKI, M.; SAITO, H.; KAGAYA, Y.; TAKAI, Y.; TAKAHASHI, S. ; YAMADA, S.; ZUGUCHI, M. The Relationship between Plasma BNP Level and the Myocardial Phosphocreatine/Adenosine Triphosphate Ratio Determined by Phosphorus-31 Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients with Dilated Cardiomyopathy. Cardiology, New York, v. 106, n. 3, p. 132-6, 2006

CLEMENTS I. P.; MILLER, W. L. Effect of metoprolol or carvedilol on rest and exercise left ventricular systolic and diastolic function in idiopathic dilated cardiomyopathy. American Heart Journal, Bethesda, v. 141 n. 2 p. 259. 2001.

COHN, J. N. The Vasodilator-Heart Failure Trials (V-HeFT). Mechanistic data from the VA Cooperative Studies: Introduction. Circulation, Dallas, v. 87, n.6 Supplement, p.VI1-4, 1993.

COHN, J. N. ; ARCHIBALD, D. G. ; ZIESCHE, S. ; FRANCIOSA, J. A. ; HARSTON, W. E. ; TRISTANI, F. E. ; DUNKMAN, W. B. ; JACOBS, W. ; FRANCIS, G. S. ; FLOHR, K. H.; et al. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. New England Journal of Medicine, London, v. 314, n.24, p.1547-52, 1986.

COHN, J. N. ; LEVINE, T. B. ; OLIVARI, M. T. ; GARBERG, V. ; LURA, D. ; FRANCIS, G. S. ; SIMON, A. B.; RECTOR, T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. New England Journal of Medicine, London, v. 311, n.13, p.819-23, 1984.

COMMUNAL, C. ; SINGH, K. ; SAWYER, D. B.; COLUCCI, W. S. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. Circulation, Dallas, v. 100, n.22, p.2210-2, 1999.

DE MATOS, L. D.; GARDENGHI, G.; RONDON, M. U.; SOUFEN, H. N.; TIRONE, A. P.; BARRETTO, A. C.; BRUM, P. C.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRAO, C. E. Impact of 6 months of therapy with carvedilol on muscle sympathetic nerve activity in heart failure patients. Journal of Cardiac Failure, New York, v. 10, n.6, p.496-502, 2004.

DEMERS, C.; Mc KELVIE, R.S.; NEGASSA, A.; YUSUF, S RESOLVD Pilot Study Investigators Reliability, validity, and responsiveness of the six-minute walk test in patients with heart failure. American Heart Journal, New York, v.142, n.4, p. 698-703, 2001.

DHALLA, N. S. ; AFZAL, N. ; BEAMISH, R. E. ; NAIMARK, B. ; TAKEDA, N.; NAGANO, M. Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. Canadian Journal of Cardiology, Vancouver, v. 9, n.10, p.873-87, 1993.

DI LENARDA, A. ; SABBADINI, T.; SINAGRA, G. Do pharmacological differences among beta-blockers affect their clinicaledgeficacy in heart failure? Cardiovascular Drugs Therapy, New York, v. 18 n. 2, p. 91- 93. 2004.

EFFECTS of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). Lancet, London, v. 353, n.9169, p.2001-7, 1999.

EFFECTS of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. New England Journal of Medicine, London, v. 316, n.23, p.1429-35, 1987.

FERREIRA, J. C. ; ROLIN, N. ; GRANÁ, O. ; BARTHOLOMEU, J, B.; BRUM, P, C. Padronização da intensidade de treinamento físico aeróbio em esteira para camundongos. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo,v.14, n. 3. p. 74, 2004.

FLESCH, M.; ETTTELBRUCK, S.; ROSENKRANZ, S.; MAACK, C.; CREMERS, B.; SCHLUTER, K.D.; ZOLK, O.; BOHM, M. Differential effects of carvedilol and metoprolol on isoprenaline-induced changes in beta-adrenoceptor density and systolic function in rat cardiac myocytes. Cardiovascular Research, New York, v.49, n.2, p. 371-80, 2001.

FOLEY, K.O.; BRUBAKER, P.H.; MATRAZZO, B.; BERRY, M.J.; PRIBANICH, S.; MILLER, H.S. Effects of cardioselective beta blockers on ventilation and gas exchange in patients with heart disease during ramp treadmill testing. American Journal of Cardiology, New York, v.80, n.9, p. 1215-6, 1997.

FOX, E.; MATHEWS, D, Bases fisiológicas da educação física e dos desportos, 2. ed., Rio de Janeiro: Interamericana, 1983.

FRIGERIO, M.; ROUBINA, E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. American Journal of Cardiology, New York, v. 96, n.12A, p.10L-18L, 2005.

GOTTLIEB, S. S.; MCCARTER, R. J. Comparative effects of three beta blockers (atenolol, metoprolol, and propranolol) on survival after acute myocardial infarction. American Journal Cardiology, New York, v. 87, n.7, p.823-6, 2001.

GREENBERG, B. Nonselective versus selective beta-blockers in the management of chronic heart failure: Clinical implications of the carvedilol or metoprolol european trial. Reviews in Cardiovascular Medicine, New York, v. 5, n.1 p. 10-17. 2004.

GRIGIONE, F.; RUSSO, A.; POTENA, L.; IELASI, A.; FABBRI, F.; BACHIREGGIANI, L.; CARIGI, S.; MASURACA, A.; BIGLIARDDI, M.; COCCOLO, F.; MAGNARI, G.; SPECCHIA, S.; MAGELLI, C.; BRANZI, A. Static and dynamics predictors of adverse events in patients with cardiopulmonary capacity referred for heart transplant. The Journal of Heart and Lung Transplantation, New York, v. 25, n.1, p. 85-9, 2006.

GULLESTAD, L. ; DOLVA, L. O. ; SOYLAND, E.; KJEKSHUS, J. Difference between beta-1-selective and non-selective beta-blockade during continuous and intermittent exercise. Clinical Physiology, New York, v. 8, n.5, p.487-99, 1988.

HARRINGTON, L. B.; LUTRELL, L. M.; ROCKMAN, H, A. Dual inhibition of beta adrenergic and angiotensin II receptor by a single antagonist. Circulation, Dallas, v. 103 Aug. p. 1611- 1618. 2003.

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature, Basingstoke, v. 402, n.6758, p.181-4., 1999.

HRYNIEWICZ, K. ; ANDRONE, A. ; HUDAIHED, A.; KATZ, S. Comparative effects of carvedilol and metoprolol on regional vascular responses to adrenergic stimuli in normal subjects and patients with chronic heart failure. Circulation, Dallas, v.108, n. 8, p. 971-6, 2003.

KATZ, A. M. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. Cardiovascular Drugs Therapy, New York, v. 16, n.3, p.245-9, 2002.

____. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses, Journal Cell Molecular Medicine, New York, v. 7, n.1, p.1-10, 2003.

KAUL, U.A.; VERMA, R.; GARG, K.C. Early intervention with propranolol after acute myocardial infarction: serial left ventricular function determined by M-mode and cross-sectional echocardiography. International Journal of Cardiology, New York, v.21, n. 3, p.301-10, 1988.

KAWAI K.; QUIN, F.; SHITE, J; MAO, W.; FUKUOKA, S.; LIANG, C. Importance of antioxidant and antiapoptotic effects of beta-receptor blockers in heart failure therapy. American. Journal. Physiology. Circulation, Bethesda, v.287, n.3, p. 1003-1012. 2004.

KOHNO, T.; YOSHIKAWA, T.; YOSHIZAWA, A.; NAKAMURA, I.; ANZAI, T.; SATOH, T.; OGAWA, S. Carvedilol exerts more potent antiadrenergic effect than metoprolol in heart failure. Cardiovascular Drugs Therapy, New York, v.19, n.5, p.347-55, 2005.

KOBAYASHI, M.; MACHIDA, N.; MITSUISHI, M.; YAMANE, Y. Beta-blocker improves survival, left ventricular function, and myocardial remodeling in hypertensive rats with diastolic heart failure. American Journal of Hypertension, New York, v.17, n.12, p.1112-9, 2004

KUBO, T. ; AZEVEDO, E. ; NEWTON, G. ; PACKER, J.; FLORAS, J. ; Lack of evidence for peripheral alpha 1-adrenoreceptor blockade during long-term treatment of heart failure with carvedilol. Journal of American College of Cardiology v. 38, n. 5, p. 1463-9, 2001.

LIOU, Y.; CHANG, C. Differential pH effect on calcium-induced conformational changes of cardiac troponin C complex with cardiac and fast skeletal isoforms of troponin I and troponin T. Journal of Biochemistry. Tokyo, v. 136, n. 5. p. 683-692, 2004.

MAACK, C.; CREMERS, C.; FLESH, M.; HOPER, A.; SUDKAMP, M.; BOHM, M. Different intrinsic activities of bucindolol, carvedilol and metoprolol in human failing myocardium. British Journal of pharmacology. London, v. 130, p. 1131-1139, 2000.

MANABE, I.; SHINDO, T.; NAGAI, R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis. Involvement in cardiac hypertrophy. Circulation Research Dallas, v.13, v. 9, p. 1103-1113, 2002.

MOLAVI, B.; MEHTA, J. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular bases of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. Current Opinion in Cardiology, New York, v.19, n. 5, p. 488-93, 2004.

NERHEIM, P.; BIRGER-BOTKIN, S.; PIRACHA, L.; OLSHANSKY, B. Heart failure and sudden death in patients with tachycardia-induced cardiomyopathy and recurrent tachycardia. Circulation, Dallas, v. 110, n.3, p.247-52, 2004.

NETTE, F.; ABRAHAM, G.; UNGEMACH, F.; OERTEL, R.; KIRCH, W.; LEINEWEBER, K.; MOHR, F.; DHEIN, S. Interaction between simvastatin and metoprolol with respect to cardiac β -adrenoceptor density, catecholamine levels and perioperative catecholamine requirements in cardiac surgery patients. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology, Leipzig, v. 372, n. 2, p. 115-24, 2005.

PACKER, M. Effects of beta-adrenergic blockade on survival of patients with chronic heart failure. American Journal Cardiology, New York, v. 80, n.11A, p.46L-54L, 1997.

PACKER, M.; COATS, A. J.; FOWLER, M. B.; KATUS, H. A.; KRUM, H.; MOHACSI, P.; ROULEAU, J. L.; TENDERA, M.; CASTAIGNE, A.; ROECKER, E. B.; SCHULTZ, M. K.; DEMETS, D. L. Effects of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. New England Journal of Medicine, London, v. 344, n. 22, p. 1651-8, 2001.

PATRIANAKOS, A.P.; PARTHENAKIS, F.I.; MAVRAKIS, H.E.; DIAKAKIS, G.F.; CHLOUVERAKIS, G.I.; VARDAS, P.E. Comparative efficacy of nebivolol versus carvedilol on left ventricular function and exercise capacity in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. A 12-month study. American Heart Journal, New York, v.150, n. 5, p. 985, 2005.

PFEFFER, M. A. ; BRAUNWALD, E. ; MOYE, L. A. ; BASTA, L. ; BROWN, E. J. JUNIOR; CUDDY, T. E. ; DAVIS, B. R. ; GELTMAN, E. M. ; GOLDMAN, S. ; FLAKER, G. C. et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial: The SAVE Investigators. New England Journal of Medicine, London, v. 327, n.10, p.669-77, 1992.

POOLE-WILSON, P. ; SWEDBERG, K. ; CLELAND, J. ; DI LENARDA, A. ; HANRATH, P. ; KOMAJDA, M. ; LUBSEN, J. ; LUTIGER, B. ; METRA, M. ; REMME, W. ; TORP-PEDERSEN, C. ; SCHERHAG, A.; SKENE, A. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the carvedilol or metoprolol european trial (COMET): randomised controlled trial. New England Journal of Medicine, London, v. 362, p. 7-13, 2003.

POOLE-WILSON, P. A Commentary on the carvedilol or metoprolol european trial (COMET). American Journal Cardiology, New York, v. 6, n. 93, (9A), p. 2, 2004.

POELZL, G.; FRICK, M.; LACKNER, B.; HUEGEL, H.; ALBER, H.F.; MAIR, J.; HEROLD, M.; SCHWARZACHER, S.P.; PACHINGER, O. ; WEIDINGER, F. Short-term improvement in submaximal exercise capacity by optimized therapy with ACE inhibitors and beta blockers in heart failure patients is associated with restoration of peripheral. International Journal of Cardiology, New York, v. 108, n.1, p. 48-54, 2006.

RAJPUT, F. S.; GNANASEKERAM, H.; SATWANI, S.; DAVENPORT J, D.; GRACELY E, J.; GOPALAN R. ; NARULA, J. Choosing metoprolol or carvedilol in heart failure (a pré- COMET commentary). American Journal of Cardiology, New York, v.92, n. 2, p. 218 - 221, 2003.

RUBIM, V.; NETO, C.; ROMEO, J.; MONTERA, M. Prognostic value of the six-minute walk test in heart failure. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v.86, n. 2, p. 120-5, 2006.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation, Dallas, v. 58, n.6, p.1072-83, 1978.

SCHOCKEN, D. ;ARRIETA, M. ; LEAVERTON, P.; ROSS, E. Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. Journal of American College Cardiology. Bethesda, v 20, n.2, p.301-6, 1992.

SHIGEYAMA, J. ; YASUMURA, Y. ; SAKAMOTO, A. ; ISHIDA, Y. ; FUKUTOMI T. ; ITHO M. ; MIYATAKE K.; KITAKAZE, M. Increased gene expression of collagen Types I and III is inhibited by β -receptor blockage in patients with dilated cardiomyopathy. European Heart Journal, London, v.26, n. 24, p. 2698-705, 2005.

SORIANO, J.B.; HOES, A.W.; MEEMS, L.; GROBBEE, D.E. Increased survival with beta-blockers: importance of ancillary properties. Progress in Cardiovascular Disease, New York, v.39, n.5, p. 445-56, 1997.

STEPHEN, S. A., Unwanted effects of propranolol. American Journal of Cardiology, New York, v.18, n.3, p. 463-72, 1966.

SUTTON, G. C. Epidemiologic aspects of heart failure, American Heart Journal, New York, v. 120, n.6 Pt 2, p.1538-40, 1990.

TALBERT, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta blockers in heart failure. Heart Failure Reviews, New York, v. 9. p. 131-137. 2004.

TALMAR, K.; BHARGAVA, B.; UPASANI, P.T.; VERMA, S.; KAMLAKAR, T.; CHOPRA, P. Hemodynamic predictors of early intolerance and long-term effects of propranolol in dilated cardiomyopathy. Journal of Cardiac Failure, New York, v.2, n. 4, p. 273-7, 1996.

TIMERMAN A.; PEREIRA M. P.Tratamento atual da insuficiencia cardiaca congestiva. Revista Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, v.1, p. 65-75, 2000.

WHITTE, K.K.; THACKRAY, S.; NIKITIN, N.P.; CLELAND, J.G.; CLARK, A.L. The effects of long-term beta-blockade on the ventilatory responses to exercise in chronic heart failure. European Journal of Heart Failure, London, v.7, n.4, p. 612-7, 2005.

XAMETOROL--more trouble than it's worth?Drugs Therapy Bull, Kentucky, v. 28, n.14, p.53-4, 1990.

XIAO, R.P.; CHENG, H.; ZHOU, Y.Y.; KUSCHEL, M.; LAKATTA, E.G. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. Circulation Research, Dallas, v.85, n.11, p. 1092-100, 1999.

YASUMURA, Y.; TAKEMURA, K.; SAKAMOTO, A.; KITAKAZE, M.; MIYATAKE, K. Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure. Journal of Cardiac Failure, New York, v.9, n. 6, p. 469-74, 2003.

ZHU, Y. C.; ZHU, Y. Z.; LU, N.; WANG, M. J.; WANG, Y. X.; YAO, T. Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. Clinical Experimental Pharmacology Physiology, New York, v. 30, n.12, p.911-8, 2003.