

Mensuração da pressão arterial antes e após administração de um novo protótipo a fármaco cardiotônico (LASSBio294) em cães

Moisés Caetano e Souza¹, Patrícia Nunes de Oliveira², Renata Carolina de Oliveira Lopes Brasil³, Rodrigo Vieira Muniz⁴, Andréa Cintra Bastos Tôrres⁵, Rosângela de Oliveira Alves Carvalho⁶

Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil

E-mail: moises-vet@hotmail.com ; rosangela2210@gmail.com

Palavras-chave: cardiologia, vasodilatador, inotrópico positivo, cão

1- INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca hoje é reconhecida como um problema importante e crescente de saúde pública (ROSSI NETO, 2004). Da mesma forma, a prevalência das cardiopatias nos pequenos animais também está crescendo, principalmente porque a expectativa de vida dos animais de companhia aumenta a cada ano (SOARES & LARSSON, 2003). O tratamento da insuficiência cardíaca auxilia a aliviar os sintomas da insuficiência e disfunção cardíaca, já que na maioria dos casos, a doença cardíaca é incurável, além de visar aumento no tempo de sobrevivência do paciente (TILLEY & GOODWIN, 2002).

¹ Orientando

² Graduanda em Medicina Veterinária - PIBIC

³ Graduanda em Medicina Veterinária - PIVIC

⁴ Médico Veterinário Autônomo - PROVEC

⁵ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

⁶ Orientador

Revisado pelo Orientador

A terapia normalmente empregada no tratamento dos sinais de insuficiência cardíaca inclui o uso de fármacos com efeitos inotrópicos positivos como glicosídeos cardíacos, combinados com diuréticos, porém o uso dos glicosídeos cardiotônicos tem sido restrito, em função de seus efeitos pró-arritmogênicos e do reduzido índice terapêutico que possuem (BARREIRO, 2002).

Como alternativa para o tratamento da insuficiência cardíaca surgiu o LASSBio294. O LASSBio294 é um novo protótipo a fármaco cardiotônico desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em 1999, sendo a primeira patente obtida pelo laboratório (BARREIRO, 1999). O protótipo é um derivado *N*-acilidrazônico (NAH), embora seja fruto da modelagem molecular, foi elaborado à partir do substrato de safrol, um composto extraído do óleo de sassafrás, encontrado em plantas como a *Ocotea pretiosa* (canela-branca) e *Piper hispidinervum* (LIMA et al., 2000; SUDO et al., 2001; BARREIRO et al., 2002).

O protótipo é ativo por via oral, tem como vantagem efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos, aliado a ausência de toxicidade aguda (BARREIRO, 2002; KÜMMERLE, 2006), além de ser ativo quando administrado pela via oral, ainda acredita-se que o mecanismo de ação do LASSBio294 seja por meio da inibição das fosfodiesterases, assim como ocorre com o Pimobendan (BARREIRO, 2002; SILVA et al., 2002). BARREIRO (2002) relata que a atuação do LASSBio294 acontece por meio da regulação do íon cálcio (Ca^{+2}) em fibras cardíacas desnudas, diferentemente dos mecanismos apresentados pelos glicosídeos cardíacos e β -adrenérgicos.

Para descobertas destes novos compostos-protótipos, tais como o LASSBio294, estes devem ser submetidos a testes *in vitro* para identificar um novo “hit” ou ligante do biorreceptor (futuro alvo terapêutico), a próxima etapa do processo é a elucidação da natureza da afinidade do biorreceptor por meio de ensaios que explicitem a atividade desejada, antagonista/agonista do biorreceptor (BARREIRO, 2009).

Comprovada a natureza da afinidade, a etapa seguinte compreende o emprego de bioensaios farmacológicos *in vivo*, visando, por um lado, validar o conceito terapêutico para o alvo eleito, por exemplo as propriedades farmacodinâmicas, e por outro, permitir avaliar as propriedades farmacocinéticas do ligante, sendo indispensáveis para poder classificar a substância em estudo como um autêntico composto-protótipo (BARREIRO, 2009), sendo esta a fase atual de estudo do protótipo.

SUDO et al. (2001) comprovaram o efeito inotrópico positivo do LASSBio294 em corações isolados de ratos Wistar, utilizando estimulação elétrica no tecido cardíaco e, ao serem tratados com diferentes doses do protótipo cardioativo, observaram que houve significativo incremento na contratilidade espontânea desses tecidos, sendo este incremento na contratilidade dose-dependente, não sendo observadas alterações de condução nem arritmias. A administração do LASSBio294 não provocou efeitos arritmogênicos, podendo ser vantajoso em relação ao Pimobendan, uma vez que ROSENTHAL et al. (2006) relataram este efeito adverso.

Além disso, SILVA et al. (2002) mostraram que este composto também promoveu relaxamento de aortas isoladas de ratos, por incremento dos níveis intracelulares de GMP cíclico, assim, essas evidências farmacológicas sugerem um novo mecanismo de ação. Recentemente, COSTA et al. (2010) descreveram o LASSBio294 como capaz de evitar o infarto do miocárdio induzido pela disfunção cardíaca, através da melhor regulação intracelular de Ca^{2+} .

PERSIANO & OLIVEIRA ALVES (2010), em estudo piloto utilizando as doses de um e 2mg/Kg do LASSBio294, via oral, em cães da raça Beagle, não observaram alterações no hemograma e bioquímica sérica (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia e creatinina), indicando que o protótipo não promove intoxicação ou alterações nas funções hepática e renal, mostrando segurança para as doses utilizadas. Foram identificados dois metabólitos (LASSBio294 Hidroxilado e LASSBio294 Sulfóxido) (BRAGA et al., 2011), sendo o LASSBio294 Sulfóxido o principal metabólito encontrado no soro de cães (CARNEIRO et al., 2010). As maiores concentrações séricas da molécula foram detectadas após duas horas da sua administração (PERSIANO & OLIVEIRA ALVES, 2010).

Em conjunto, os efeitos vasodilatadores e inotrópicos positivos do protótipo indicam fortemente que ele é um novo candidato a fármaco, eficaz e seguro para tratar condições patológicas, nas quais a fadiga do músculo cardíaco é a desordem debilitante (SUDO et al., 2006).

Segundo DETWEILER (1996), a pressão sanguínea é determinada pela ação bombeadora do coração, resistência periférica, viscosidade do sangue, quantidade de sangue no sistema arterial e elasticidade das paredes arteriais. Esses fatores são controlados por um sistema regulador complexo que, ordinariamente, mantém a pressão arterial dentro de limites estreitos. TILLEY & GOODWIN (2002) classificaram as pressões sanguíneas em quatro

grupos diferentes, estabelecendo, desta forma, parâmetros para sua avaliação clínica, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial sanguínea sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em quatro diferentes grupos, segundo TILLEY & GOODWIN (2002)

| Classificação | PAS (mmHg) | PAD (mmHg) |
|------------------------|--------------|--------------|
| Normal | 110-120 | 70-80 |
| Discretamente elevada | 120-170 | 80-100 |
| Moderadamente elevada | 170-200 | 100-120 |
| Acentuadamente elevada | Acima de 200 | Acima de 120 |

A pressão sanguínea arterial pode ser avaliada tanto por métodos invasivos (diretos), quanto por métodos não-invasivos (indiretos), sendo os métodos não-invasivos fáceis de serem efetuados na prática clínica, sendo de baixo custo e relativa precisão (NELSON & COUTO, 2006). Porém, o método indireto de aferição da pressão arterial apresenta uma desvantagem relacionada a imprecisão relativa aos valores de pressão arterial diastólica (FRIEDMAN et al., 1990).

Ocorrem variações de valores de pressão sanguínea obtidas por diferentes métodos de mensuração, refletindo assim as diferenças existentes entre as populações, entre as técnicas de mensuração e o manejo dos animais (SCHLOTZHAUER & LITTEL, 1997). JEPSON et al. (2005) utilizando o método Doppler em gatos, relataram que a pressão arterial diastólica obtida por esse método pode não ser confiável, uma vez que a pressão arterial sistólica pode ser obtida em 100% das medições, enquanto em apenas 51,4% das medições foram obtidas as pressões arteriais diastólica.

A largura do manguito utilizado para aferição deve ser de aproximadamente 40% a 50% da circunferência das extremidades envolvidas, pois manguitos muito estreitos geram falsos aumentos de leitura, enquanto manguitos muito largos podem subestimar a pressão sanguínea. Os locais mais comuns de colocação do manguito situam-se entre o cotovelo e o carpo ou na região tibial, devendo-se evitar as proeminências esqueléticas (NELSON & COUTO, 2006).

Diante do exposto, tornou-se importante a realização desse projeto, para permitir a continuação do desenvolvimento de um novo medicamento, que poderá melhorar as condições clínicas e aumentar a sobrevida tanto de pequenos animais como de pessoas que

possuem insuficiência cardíaca, uma vez que o cão é um modelo experimental para o estudo desta enfermidade em humanos. Além disso, o mesmo se faz necessário em respeito aos protocolos de pesquisa da RESOLUÇÃO N° 251 de Agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde que determina realizar testes toxicológicos em três espécies animais distintas, sendo uma delas mamíferos não roedores, além de estudos acerca da farmacocinética do novo fármaco.

2- OBJETIVOS

Avaliar os efeitos vasodilatadores do LASSBio294 sobre o sistema cardiovascular de cães por meio da mensuração da pressão arterial antes e após a administração do fármaco cardiotônico em três concentrações diferentes.

3- METODOLOGIA

O estudo experimental foi realizado nas dependências da Universidade Federal de Goiás, onde para sua realização foram utilizados os laboratórios de Cardiologia Veterinária do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia e o de Bioconversão da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. O experimento foi realizado com cinco cadelas, adultas, da raça Beagle, consideradas clinicamente saudáveis, após exames clínicos e laboratoriais. Os animais foram alimentados com ração comercial⁷, com fornecimento de água à vontade, alojados em canis individuais.

Na primeira fase de experimentação todas as cadelas receberam uma dose de 2mg/kg de LASSbio294, por via oral. Os animais foram submetidos a mensuração da pressão arterial antes da administração do fármaco e após duas, quatro, seis, doze e vinte e quatro horas após a administração do mesmo. Na segunda e terceira fases de experimentação, receberam uma dose de 5mg/kg e 10mg/kg respectivamente, de LASSBio294, por via oral, sendo submetidas às mesmas avaliações que foram realizadas na primeira fase. O intervalo entre as fases foi de sete dias.

Para mensurar a pressão arterial foi usado o método oscilométrico (Monitor multiparamétrico DX 2022 DIXTAL[®] - Manaus-AM), acoplado o manguito na posição proximal da região entre o cotovelo e o carpo, no membro anterior esquerdo, sendo este colocado à altura do átrio direito (**Figura 1**). Em cada avaliação obteve-se quatro medições

⁷ Ração Natural Guabi Cães Adultos[®]

consecutivas da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de cada animal, descartando o valor mais discrepante e considerando como valor final a média aritmética das três aferições (HENIK et al., 2005; PEREIRA-NETO, 2005; BROWN et al., 2007).

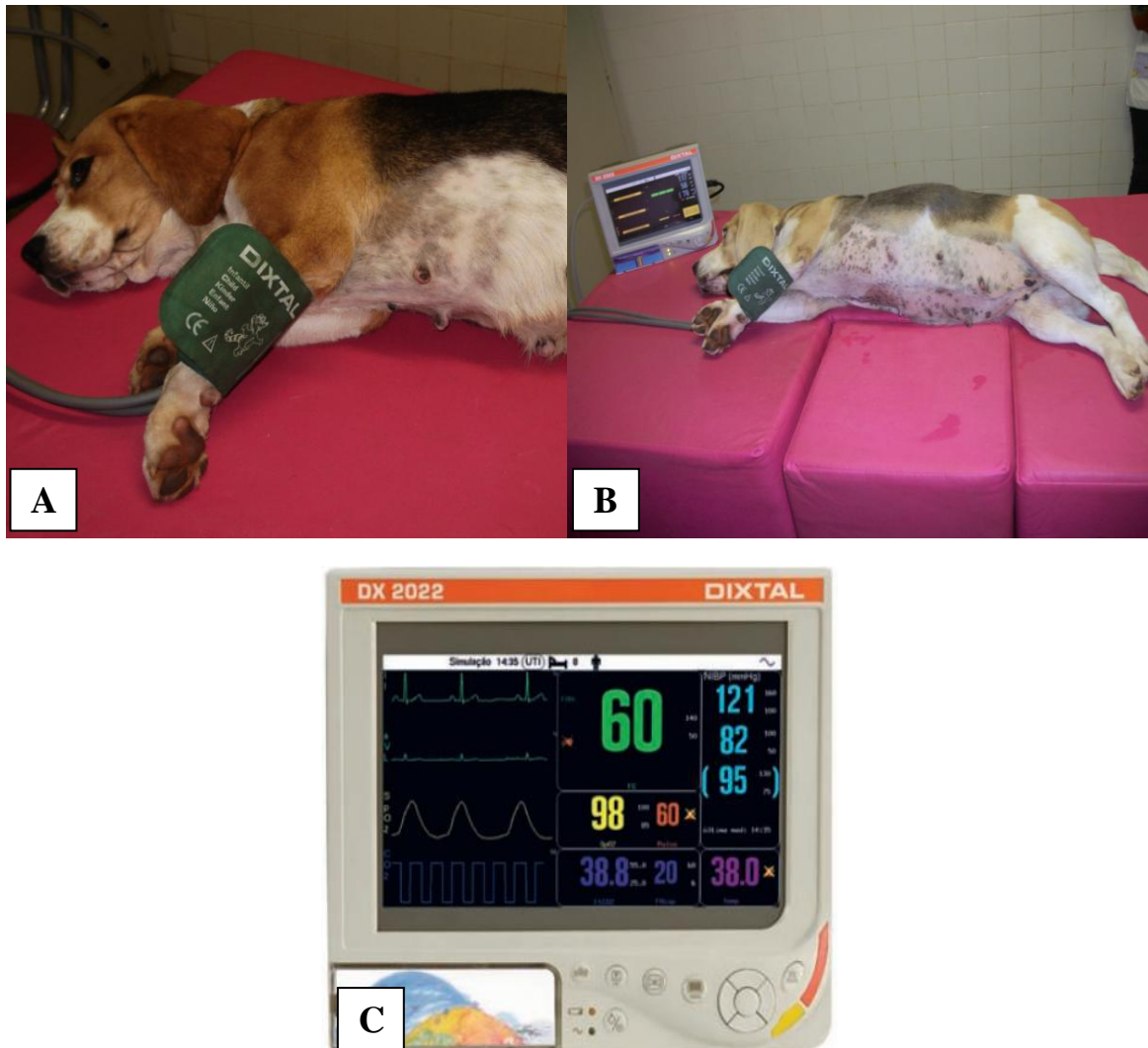


Figura 1 – A e B) Cadelas Beagle em decúbito lateral esquerdo com manguito acoplado na posição proximal da região entre o cotovelo e o carpo, no membro anterior esquerdo, para medição das pressões arteriais sistólica, diastólica e média utilizando o método oscilométrico; C) Monitor multiparamétrico DX 2022 DIXITAL[®] (Fonte: http://www.dixital.com.br/lib/dx_2022_lc_port.pdf)

Os dados obtidos na fase experimental foram submetidos à análise estatística pelo programa de computador Jandel SigmaStat for Windows (SigmaStat for Windows, versão 3.0.1. Systat Software Inc - Richmond, CA, EUA). Os dados obtidos na fase experimental foram comparados entre os tempos experimentais, dentro de um mesmo grupo e entre grupos (entre diferentes doses), os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls para comparação ao longo dos momentos dentro de cada grupo e ANOVA de uma via para comparação entre os grupos em cada momento.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Considerou-se para o experimento um nível de significância de 5%.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio da avaliação da pressão arterial após o uso das doses de 2mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg do LASSBio294, por via oral, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias e Desvios-padrão dos valores obtidos das pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) em mmHg

| | | Basal | 2 horas | 4 horas | 6 horas | 12 horas | 24 horas |
|----------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 2mg/Kg | PAS | 125,4±7,2 | 117,1±11,9 | 107,1±4,0* | 109,1±7,7* | 122,4±5,3 | 112,1±7,0* |
| | PAD | 63,9±15,5 | 62,2±21,7 | 57,4±15,8 | 61,8±18,9 | 59,7±16,4 | 62,3±9,7 |
| | PAM | 84,3±11,1 | 76,1±24,1 | 72,4±8,2 | 71,6±19,7 | 80,7±11,1 | 79,0±7,3 |
| 5mg/Kg | PAS | 127,2±9,0 | 114,1±5,4 | 114,3±7,6 | 116,7±8,6 | 127,5±13,8 | 121,3±10,1 |
| | PAD | 64,7±15,0 | 58,0±8,9 | 61,7±8,2 | 65,7±6,8 | 73,5±14,8 | 66,3±10,9 |
| | PAM | 85,5±12,2** | 76,8±7,0** | 79,2±7,8** | 82,0±6,5** | 91,4±14,1** | 85,0±9,4** |
| 10mg/Kg | PAS | 116,6±10,4 | 117,5±6,8 | 113,3±8,6 | 115,3±13,8 | 110,3±18,1 | 120,7±6,9 |
| | PAD | 57,9±14,4** | 57,9±14,7** | 62,9±12,9** | 57,0±10,2** | 58,7±9,8** | 59,2±12,8** |
| | PAM | 77, ±13,0 | 76,7±11,4 | 80,0±11,6 | 71,7±8,3 | 74,6±7,3 | 76,1±11,3 |

* Diferenças significativas entre momentos de um mesmo grupo

** Dados que não apresentaram distribuição normal, sendo empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls

Na avaliação da pressão arterial sistólica foi observada diferença estatística dentro do grupo 2mg/Kg, onde ocorreu diminuição para esta variável em relação ao basal nos tempos de quatro ($p=0,010$), seis ($p=0,018$) e vinte quatro ($p=0,045$) horas. Os valores nos tempos de quatro (107,07mmHg) e seis (109,07mmHg) horas tiveram médias discretamente abaixo dos parâmetros considerados normais para a espécie em questão (TILLEY & GOODWIN, 2002) (**Figura 2**). Podemos assim, confirmar o potencial vasodilatador do LASSBio294 em cães da raça Beagle saudáveis, além da sua segurança, já que não foi observada hipotensão, mesmo nas doses superiores (10mg/kg). Efeitos similares foram observados por THOMASON & FALLOW (2007) que, utilizando o Pimobendan em cães com insuficiência cardíaca congestiva não observaram hipotensão arterial quando o fármaco foi adicionado a monoterapia com inibidores da ECA.

Também foram observadas diferenças significativas entre os tempos quatro ($p=0,028$) e seis ($p=0,045$) horas em relação ao tempo doze horas (**Figura 2**), sendo esta a última medição do dia, podendo este incremento de pressão ser relacionado à diminuição da biodisponibilidade do protótipo a fármaco ou ao estresse dos animais devido às seguidas contenções (SCHLOTZHAUER & LITTEL, 1997). SCHELLENBERG et al. (2007) e RATTEZ et al. (2010) relataram que quando Beagles adultos passaram por um período de adaptação para medição da pressão arterial sistêmica, utilizando o método Doppler e o método oscilométrico (pet-MAP[®]), respectivamente, os valores das medições diminuíram gradualmente e de forma significativa em relação a medição inicial.

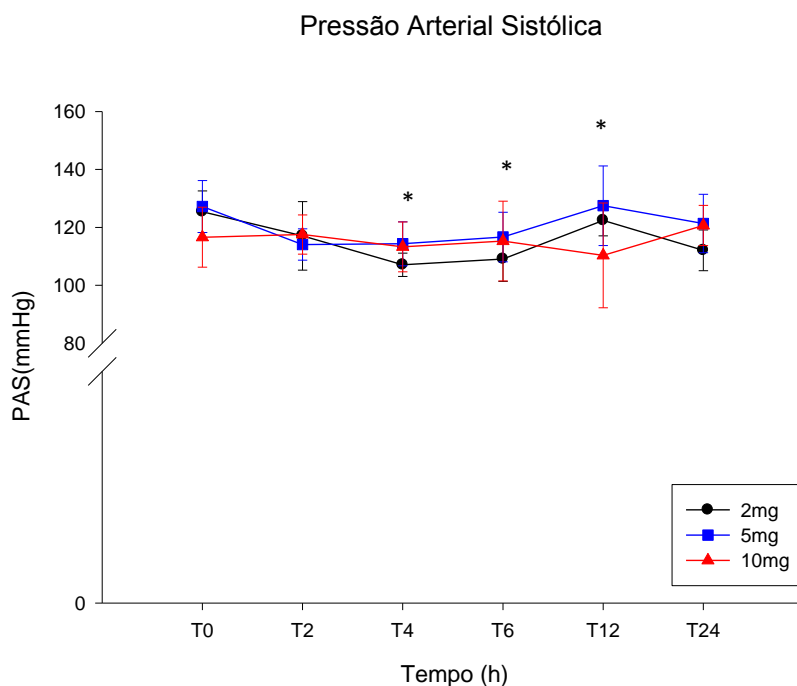


Figura 2 - Médias \pm desvios padrão da pressão arterial sistólica de cães da raça Beagle que receberam LASSBio-294 nas doses de 2, 5 e 10 mg/kg pela via oral

Porém, para as doses de 5mg/Kg e 10mg/kg, não foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo em cada grupo, nem entre os diferentes grupos para pressão arterial sistólica. Mostrando que o LASSBio294, possivelmente não apresenta efeito dose-dependente, diferentemente do observado por SUDO et al. (2001) que comprovaram que o incremento na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos Wistar, foi dose-dependente.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nem dentro dos grupos ao longo do tempo, para as variáveis pressões arteriais diastólica e média (**Figuras 3 e 4**), entretanto, deve-se considerar que FRIEDMAN et al. (1990) relataram que o método indireto de aferição da pressão arterial apresenta uma desvantagem relacionada a imprecisão relativa aos valores de pressão arterial diastólica, o que se traduz em falta de sensibilidade dos equipamentos utilizados em mensurar adequadamente essa pressão.

Pressão Arterial Diastólica

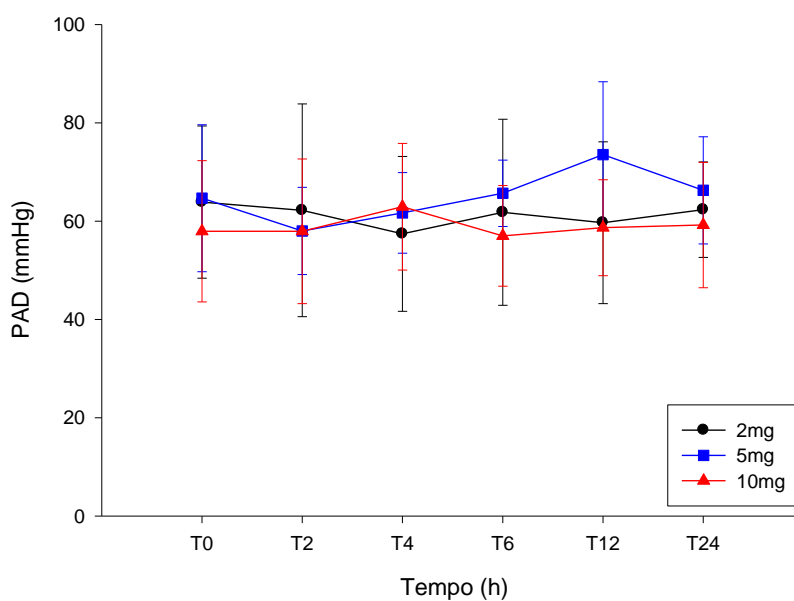


Figura 3 - Médias \pm desvios padrão da pressão arterial diastólica de cães da raça Beagle que receberam LASSBio-294 nas doses de dois, cinco e 10mg/kg pela via oral

Pressão Arterial Média

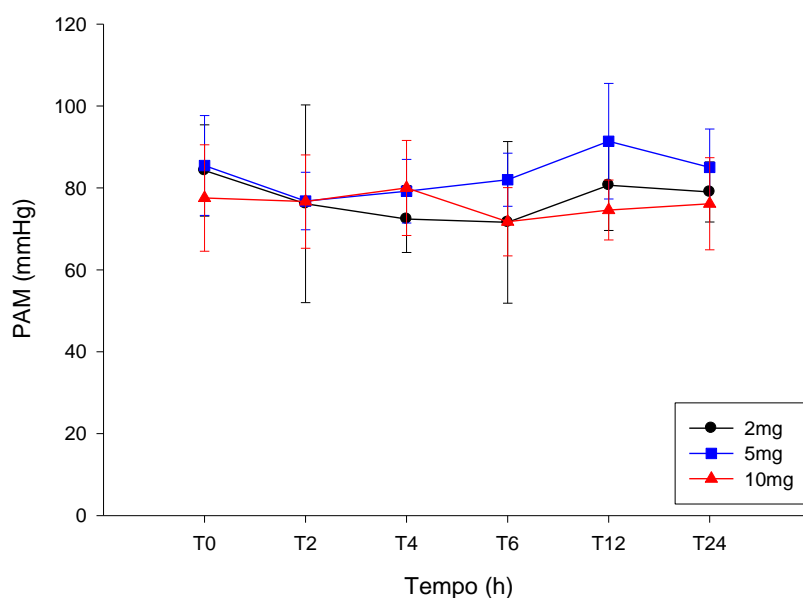


Figura 4 - Médias \pm desvios padrão da pressão arterial média de cães da raça Beagle que receberam LASSBio-294 nas doses de dois, cinco e 10mg/kg pela via oral

Avaliando-se os resultados, o protótipo a fármaco mostrou segurança, porém de eficácia ainda não completamente comprovada. É possível que o uso contínuo deste tenha efeitos mais promissores já que a maioria das terapias para insuficiência cardíaca são feitas com o uso contínuo de fármacos, como por exemplo, os inibidores da ECA. Sugerimos a realização da combinação do LASSBio294 com outros fármacos, como os inibidores da ECA, amlodipina, nitratos, assim como foi feito com o Pimobendan, adquirindo desta forma efeito aditivo na ação vasodilatadora, conseguindo-se uma eficácia maior (THOMASON & FALLOW, 2007).

É necessária avaliação posterior do uso do LASSBio294 em cães portadores de insuficiência cardíaca, já que foi possível observar que apesar de não ter ocorrido diferença estatística para a maioria das avaliações, este causou discreta diminuição na pressão arterial, podendo este efeito ser mais significativo em cardiopatas.

O LASSBio294 não apresentou efeitos colaterais ou sinais de intoxicação, assim como observado por PERSIANO & OLIVEIRA ALVES (2010) em estudo piloto para doses de um e 2mg/Kg, mostrando-se vantajoso em relação aos digitálicos, já que estes podem levar a quadros de intoxicação digitálica e provocar arritmias (SPINOSA et al., 2006).

Assim, o protótipo a fármaco mostra-se como potencial candidato a fármaco, devendo ser realizados estudos futuros, considerando a maior eficácia na ação vasodilatadora com a dose de 2mg/Kg.

5- CONCLUSÃO

A administração via oral do protótipo a fármaco LASSBio294, nas doses de 2mg/Kg, 5mg/Kg e 10mg/Kg, não causa efeitos colaterais em cães da raça Beagles hígdos.

Foi observada discreta queda da pressão arterial sistólica na dose de 2mg/Kg, indicando vasodilatação. Não houve alterações nas pressões arteriais sistólicas nas doses de 5,0mg/Kg e 10mg/Kg.

O LASSBio294 não alterou as pressões arteriais diastólica e média nas diferentes doses utilizadas.

Com base nas avaliações das pressões arteriais sistólicas, diastólicas e médias utilizando-se o método oscilométrico conclui-se que o LASSBio294 mostrou-se seguro para estes parâmetros.

6- REFERÊNCIAS

BARREIRO, E. J., E. X. ALBUQUERQUE, R. T. SUDO lassbio 294 novel digitalis-like compound with potential anti-fatigue activity, Patente: privilégio de inovação N. 60-525,352. 30 DE JANEIRO DE 1999 (DEPÓSITO).

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v.25, n. 6B, p.1172-1188, 2002.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. Química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v. 25, n.1, p. 129-148, 2002.

BARREIRO, E. J; A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual Química**. v.01, n.01, p. 26-34 . Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/15/22> acesso em 25 de janeiro de 2011.

BRAGA, R.C.; TÔRRES, A.C.B.; PERSIANO, C.B.; ALVES, R.O.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. OLIVEIRA, V. Determination of the cardioactive prototype LASSBio-294 and its metabolites in dog plasma by LC–MS/MS: Application for a pharmacokinetic study, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55 , p.1024-1030, 2011.

BRASIL. Leis etc.Resolução n.251 de 07 de agosto de 1997. Aprovar as seguintes normais de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 setembro 1997.

BROWN, S.;ATKINS, C.;BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of veterinary internal medicine**, Lakewood, v.21, p.542-558, 2007.

CARNEIRO, E.O. ANDRADE, C.H. BRAGA, R.C. TÔRRES, A.C.B. ALVES, R.O. LIÃO, L.M. FRAGA, C.A.M. BARREIRO, E.J. OLIVEIRA, V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3734-3736, 2010.

COSTA, D.G.; SILVA,J.S.; KÜMMERLE,A.E.; SUDO,R.T.; LANDGRAF,S.S.; CARUSO-NEVES,C.; FRAGA,C.A.M.; BARREIRO,E.J.L.; ZAPATA-SUDO, G. LASSBio-294, A compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves Ca²⁺ influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction, **American Journal Hypertension**, v. 23 1220-1227, 2010.

DETWEILER, D.K. Mecanismos de controle do sistema circulatório. In: DUKES, H.H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1996. cap.10, p.170-208.

FRIEDMAN, D.B., JENSEN F.B., MATZEN S. Non-invasive blood pressure monitoring during head-up tilt using the Penaz principle. **Acta Anaesthesiol.**, v. 34, p.519-22, 1990.

HENIK, R.A.; DOLSON, M.K.; WENHOLZ, L.J. How to obtain a blood pressure measurement. **Clinical techniques in small animal practice**. Madison. v.20, n.3 p.144-150, 2005.

LIMA, P.C. LIMA, L.M. SILVA,K.C.M. LÉDA,P.H.O. MIRANDA, A.L.P. FRAGA, C.A.M. BARREIRO, E.J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole, **European Journal Medicinal Chemistry**. V.35, p.187-203, 2000.

KÜMMERLE, A.E.; SILVA, A.G.; ZAPATA-SUDO; G.; SUDO, R.T.; SIMONE, C.A.; ALVES, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Síntese de Novos Compostos Cardioativos Planejados por Otimização Estrutural do Protótipo N-acilidrazônico LASSBio-294. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, 2006.

JEPSON, R.E.; HARTLEY, V.; MENDEL, M. et al. A comparison of CAT Doppler and oscillometric memoprint machines for noninvasive blood pressure measurement in conscious cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.7, p.147- 152, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. C. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. 2.ed. Rio de Janeiro:Elsevier, P. 195, 2006.

PEREIRA-NETO, G. B. **Efeitos da correção da obesidade sobre os parâmetros ecocardiográficos, eletrocardiográficos, radiográficos e da pressão arterial em cães**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PERSIANO, C.B.; OLIVEIRA ALVES, R. Identificação de Metabólitos Gerados após a Administração de um novo Protótipo a Fármaco Cardiotônico (LASSBio 294) em cães. **Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - VII CONPEEX**. p. 4644 – 4656, 2010.

RATTEZ, E.P.; REYNOLDS, B.S.; CONCORDET, D.; LAYSSOL-LAMOUR, C.J.; SEGALIN, M.M.; CHETBOUL, V.; LEFEBVRE, H.P. Within-day and between-day variability of blood pressure measurement in healthy conscious Beagle dogs using a new oscillometric device. **Journal of Veterinary Cardiology**. Toulouse, v.12, p.35-40, 2010.

ROSENTHAL S.L., FERGUSON M.J., LEBOM B.K., et al. Association of pimobendan with ventricular arrhythmias in dogs with congestive heart failure, In: **Proceedings: American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 20(76), p. 731, 2006.

ROSSI NETO, J. M. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. São Paulo, v.14, n.1, p. 1-10, 2004

SCHELLENBERG, S.; GLAUS, T.M.; REUSCH, C.E. Effect of long-term adaptation on indirect measurements of systolic blood pressure in conscious untrained beagles. **Veterinary Record**. London, v.161, p.418-421, 2007.

SCHLOTZHAUER, S.; LITTEL, R.C. **SAS® system for elementary statistical analysis**. 2. ed. Cary, NC: SAS Institute, 456p, 1997.

SILVA, C.L.M.; NOEL, F.; BARREIRO, E.J. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**. Rio de Janeiro, v. 135, p. 293-298, 2002.

SOARES, E.C.; LARSSON, M.H.M.A. Aspectos clínicos-epidemiológicos da doença valvar crônica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Niterói, v.10, n.1, p.3-9, 2003.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.897, 2006.

SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G.; BARREIRO, E.J. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. **British Journal of Pharmacology**. Rio de Janeiro, v. 134, p. 603-613, 2001.

SUDO, R.T. ALBUQUERQUE, E.X. BARREIRO, E.J. ARACAVAL, Y. CINTRA, W.M. MELO, P.A. NOEL, F.G. SUDO, G.Z. SILVA, C.L.M. CASTRO, N.G. FERNANDES, P.D. FRAGA, C.A.M. MIRANDA, A.L.P. Thienylhydrazon with digitalis-like properties (positive inotropic effects), US Patent 7,091,238B1, 2006.

TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. Manual of canine and feline cardiology. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.337-344, 2002.

THOMASON, J.D.; FALLAW, T.K.; CALVERT, C. Pimobendan treatment in dogs with congestive heart failure. **Veterinary Medicine**. v. 102, p.736, 2007.