

JAIR TRAPÉ GOULART

**“VULNERABILIDADE DE MIÓCITOS CARDÍACOS A CAMPOS
ELÉTRICOS DE ALTA INTENSIDADE:
INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA”**

***“THE LETHAL EFFECT OF HIGH-INTENSITY ELECTRIC FIELDS
ON CARDIAC MYOCYTES: INFLUENCE OF THE BETA-
ADRENERGIC PATHWAY”***

Campinas, SP

2012

i

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO

JAIR TRAPÉ GOULART

**“VULNERABILIDADE DE MIÓCITOS CARDÍACOS A CAMPOS ELÉTRICOS
DE ALTA INTENSIDADE:
INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA”**

***“THE LETHAL EFFECT OF HIGH-INTENSITY ELECTRIC FIELDS ON
CARDIAC MYOCYTES: INFLUENCE OF THE BETA-ADRENERGIC
PATHWAY”***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Elétrica da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica, na área de concentração de Engenharia Biomédica.

A dissertation presented to Graduate Program in Electrical Engineering of the School of Electrical and Computer Engineering of the University of Campinas to obtain the degree Master of Science in Electrical Engineering, emphasis in Biomedical Engineering.

**Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosana Almada Bassani**

***Advisor: José Wilson Magalhães Bassani, PhD
Co-Advisor: Rosana Almada Bassani, Sc.D***

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JAIR TRAPÉ GOULART, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI.**

Campinas, SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

G729v Goulart, Jair Trapé
Vulnerabilidade de miócitos cardíacos a campos
elétricos de alta intensidade: influência da estimulação
beta-adrenérgica / Jair Trapé Goulart. --Campinas, SP:
[s.n.], 2012.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani
Co-orientadora: Rosana Almada Bassani.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Miocárdio. 2. Desfibriladores. 3. Campos
elétricos. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II.
Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação. IV. Título.

Título em Inglês: The lethal effect of high-intensity electric fields on cardiac
myocytes: influence of the beta-adrenergic pathway

Palavras-chave em Inglês: Myocardium, Defibrillation, Electric field

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Wilson Nadruz Junior, Antônio Augusto Fasolo Quevedo

Data da defesa: 25-06-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

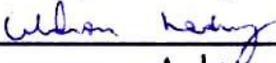
COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

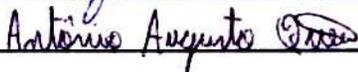
Candidato: Jair Trapé Goulart

Data da Defesa: 25 de junho de 2012

Título da Tese: "Vulnerabilidade de Miócitos Cardíacos a Campos Elétricos de Alta Intensidade: Influência da Estimulação Beta-adrenérgica"

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente): _____ 

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior: _____ 

Prof. Dr. Antônio Augusto Fasolo Quevedo: _____ 

Dedico este trabalho a meus pais, Jair e Lurdinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus familiares, em especial aos meus pais Jair Goulart e Maria de Lourdes Trapé Goulart, que sempre me ensinaram a importância dos estudos. Agradeço por todo o incentivo, carinho, compreensão e paciência,

aos professores José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani, pela sábia orientação, assistência prestada e pela paciência,

a todos os professores do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial a Pedro Xavier de Oliveira pela amizade e suporte imprescindíveis na realização deste trabalho,

a todos os amigos, funcionários e técnicos do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, em especial à Elizângela Souto de Oliveira pelo apoio técnico e amizade,

aos amigos e colegas pelas sugestões e pelos bons momentos, em especial a Tiago Paggi de Almeida, Fernando Oliveira Andrade, Carlos Alexandre Ferri, Marina Carneiro Monteiro, Leard de Oliveira Fernandes, Philipe R. F. Mendonça, José Paulo R. F. Mendonça, Chrystian Junqueira Alves, Arnaldo Fim Neto, Danielle Ferreira Feliciano, Felipe Campos Kitamura, Natália Ferreira Oshiyama, Carina Marconi Germer, Tiago Silveira, Cristiano Justino de Sousa, Mara A. P. Ávila, Marcelo de Almeida Viana, Luiza Naiara Siqueira do Prado, Guilherme C. L. Paiva e Marcelo Silva da Rocha,

ao apoio financeiro da CAPES na forma de bolsa de estudos,

a todos que contribuíram de forma direta ou indireta com este trabalho,

a todos aqueles que sempre olharam por mim.

“Every great advance in science has issued from a new audacity of imagination”
(John Dewey)

RESUMO

A aplicação de campos elétricos de alta intensidade (CEAI) no coração é realizada frequentemente durante tentativas de reversão da fibrilação, e para gerar sincronismo cardíaco com o uso de marca-passos. Entretanto, este procedimento rotineiro pode causar danos ao miocárdio. O objetivo deste trabalho foi investigar se a estimulação β -adrenérgica afeta a vulnerabilidade de miócitos ventriculares ao CEAI, uma vez que, durante a fibrilação ventricular, há aumento reflexo do tônus simpático, em virtude da conseqüente hipotensão arterial, e a administração de catecolaminas é um procedimento comum neste tipo de emergência. Miócitos foram isolados do ventrículo esquerdo de ratos Wistar adultos por digestão enzimática. As células foram perfundidas com solução de Tyrode a 23 °C e estimuladas a 0,5 Hz. Aplicou-se CEAI em intensidades crescentes até que fosse induzida uma lesão letal na célula. A probabilidade de morte celular foi determinada em função da amplitude do CEAI e da máxima variação estimada do potencial de membrana (ΔV_{\max}) por análise de sobrevivência (curva de letalidade). Destas curvas, obteve-se o parâmetro EL50 (valor de CEAI ou ΔV_{\max} com probabilidade de letalidade de 0,5). A estimulação β -adrenérgica, pela perfusão com 10 nM de isoproterenol (ISO), foi realizada na ausência e presença de 150 nM de metoprolol (MET, bloqueador de adrenoceptores β_1), 10 μ M de H-89 (inibidor de PKA) e 500 nM de BIS I (inibidor de PKC), bem como após protocolo para minimizar o aumento de mobilização celular de Ca^{2+} . As curvas foram comparadas por teste de Mantel-Cox. O tratamento com ISO promoveu o deslocamento da curva para a direita ($p < 0,01$) e EL50 aumentou de 85 para 100 V/cm. MET e H-89 aboliram o efeito protetor do ISO, e, quando perfundidos na ausência de ISO, não tiveram quaisquer efeitos sobre a indução de letalidade por CEAI. A redução da mobilização de Ca^{2+} e o tratamento com BIS I não alteraram as curvas de letalidade, na presença ou ausência de ISO, mas provocaram significativo aumento no tempo de recuperação das células após um choque não letal. As curvas em função de ΔV_{\max} foram similares àquelas em função da intensidade do campo. Os resultados mostram que a estimulação β -adrenérgica é capaz de proteger os miócitos dos efeitos deletérios do CEAI, permitindo que a célula suporte maiores ΔV_{\max} . A proteção parece ser mediada por adrenoceptores β_1 e PKA, e possivelmente envolve ativação de mecanismos de reparo. Estas vias de proteção podem ser futuramente exploradas para atenuar os danos miocárdicos causados pela desfibrilação/cardioversão.

Palavras-chave: miocárdio, desfibrilação, campo elétrico, morte celular, estimulação β -adrenérgica.

ABSTRACT

The myocardium is exposed to high-intensity electric fields (HIEF) during cardiac electric defibrillation, which may reverse life-threatening arrhythmias, but also cause cell damage. Impairment of cardiac pumping during ventricular fibrillation is usually associated with high sympathetic tone, and catecholamine infusion is a common procedure for the emergencial treatment of this arrhythmia. The present study was carried out to investigate whether adrenergic stimulation affects the vulnerability of ventricular myocytes to the lethal effect of HIEF. Left ventricular myocytes were isolated from adult Wistar rat hearts by collagenase digestion. Under perfusion with Tyrode's solution at 23 °C, cyclic contractile activity was evoked by stimulation at 0.5 Hz. A HIEF pulse was then applied, after which cells were allowed to rest and recover from the shock. Afterward, the protocol was repeated increasing HIEF amplitude until cell death ensued. The probability of cell death as a function of the field intensity or the estimated maximum change in membrane potential, ΔV_{max} (lethality curve) was determined by survival analysis. The protocol was carried out during exposure to 10 nM isoproterenol (ISO), in the absence and presence of the β_1 -adrenoceptor blocker metoprolol (MET, 150 nM), the PKA inhibitor H-89 (10 μ M), the PKC inhibitor BIS I (500 nM), or after a protocol designed to attenuate the increase in cell Ca^{2+} mobilization by ISO. Lethality curves were compared with the Mantel-Cox test. Exposure to ISO produced a marked rightward shift of the lethality curves ($p < 0.01$), and the field intensity associated with the cell death probability of 0.5 (EL50) was increased from 85 to 100 V/cm. Treatment with MET or H-89 alone did not significantly affect the curves, but completely abolished ISO protective effect. Decreasing Ca^{2+} mobilization and BIS I treatment did not produce significant effects on the lethality curves, either in the absence or presence of ISO, but they increased the time spent to cell recovery after a non-lethal shock. Similar results were obtained for the lethality curve as a function of ΔV_{max} . Therefore, β -adrenergic stimulation confers protection to ventricular myocytes from the lethal effects of HIEF, even though cells apparently experience higher variations of ΔV_{max} , which should lead to extensive electroporation. This effect, which seems to be mediated by β_1 -adrenoceptors and dependent on PKA activation, possibly involving recruitment of membrane repair mechanisms. This protective effect may be further explored as a means to attenuate HIEF deleterious effects on cardiac function that frequently result from electric defibrillation/cardioversion.

Keywords: myocardium, defibrillation, electric field, cell death, β -adrenergic stimulation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Representação esquemática de poros em uma bicamada lipídica que permitem (poro hidrofílico) ou não (poro hidrofóbico) a passagem de íons e outras moléculas polares.... 25
- Figura 1.2** – Energia livre (W) dos poros hidrofóbicos (W_1) e hidrofílicos (W_2) em relação ao raio dos poros (r) e o potencial transmembrana (V_m). W_c é a barreira de energia que se opõe à formação do poro hidrofílico, e r_c é o raio crítico para conversão do poro hidrofóbico em hidrofílico (Weaver & Chizmadzhev, 1996; licença número 2901020114458). 26
- Figura 1.3** – Representação esquemática do ciclo de ativação de uma proteína G. ① A proteína G encontra-se em repouso, na forma de complexo trimérico $G_{\alpha\beta\gamma}$ associado ao receptor acoplado a proteína G (GPCR) e com um difosfato de guanosina (GDP) ligado a subunidade G_α . ② Um agonista se liga ao GPCR. ③ GDP é substituído por um trifosfato de guanosina (GTP). ④ Subunidade G_α se dissocia do complexo $G_{\beta\gamma}$. ⑤ GTP é hidrolisado em GDP e fosfato inorgânico (P_i). ⑥ GDP oriundo da hidrólise permanece associado a G_α e a proteína G retorna ao estado de repouso ①. 30
- Figura 1.4** – Representação esquemática das principais vias de transdução da sinalização mediada por adrenoceptores. A ligação de um agonista ao adrenoceptor α_1 promove a ativação de uma proteína G_q , que por sua vez ativa uma fosfolipase C (PLC). Fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) é convertido em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) pela PLC. IP_3 promove a elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} , o que juntamente com a ação da DAG, promove a ativação da quinase de proteína C (PKC). Quando um agonista se liga ao adrenoceptor α_2 , ocorre a ativação de uma proteína G_i que irá inibir a adenilato ciclase (AC) e canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (VDCC). A ligação de um agonista ao adrenoceptor β leva a ativação de uma proteína G_s capaz de ativar a AC. Trifosfato de adenosina (ATP) é convertido em monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (cAMP) por ação da AC. cAMP atua como um segundo mensageiro que promove a ativação da quinase de proteína A (PKA). 31
- Figura 4.1** – Encurtamento celular de pico desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato em resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade a 0,5 Hz, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). $N = 10$. Há diferença significativa entre os grupos (***) $p < 0,001$; teste t de Student para amostras pareadas). 43
- Figura 4.2** – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do

potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato tratados com 10 nM isoproterenol (ISO) e células não expostas ao fármaco (controle). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.2. Há diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$ painel A, $p = 0,013$ painel B; teste de Mantel-Cox)..... 44

Figura 4.3 – Encurtamento celular de pico desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato, tratados com 150 nM metoprolol, em resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade a 0,5 Hz, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 10. Não há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,38$; teste t de Student para amostras pareadas)..... 46

Figura 4.4 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato na ausência de fármacos (controle), tratados apenas com 150 nM metoprolol (MET), e tratados com o antagonista e 10 nM isoproterenol (MET + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.4. Não há diferença significativa entre os 3 grupos ($p = 0,254$ painel A, $p = 0,938$ painel B; teste de Mantel-Cox). 47

Figura 4.5 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato sob condições controle (controle; N = 23), e submetidas ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados (min Ca^{2+} + ISO; N = 11) ou não (min Ca^{2+} ; N = 11) com 10 nM isoproterenol. Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.6. Há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,004$ painel A, $p = 0,015$ painel B; teste de Mantel-Cox para comparação entre os 3 grupos). 50

Figura 4.6 – Encurtamento celular de pico, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato estimulados eletricamente a 0,5 Hz, antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 μ M H-89 e 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 8. Não há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,64$; teste de Wilcoxon). 52

- Figura 4.7** – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato sob condições controle (controle), tratados com 10 μM H-89 (H-89) e com 10 nM isoproterenol na presença de H-89 (H-89 + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.8. Não há diferença significativa entre os 3 grupos ($p = 0,218$ painel A, $p = 0,941$ painel B; teste de Mantel-Cox)..... 53
- Figura 4.8** – Encurtamento celular de pico, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato estimulados eletricamente a 0,5 Hz, antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 500 nM BIS I e 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). $N = 10$. Há diferença significativa entre os grupos (** $p < 0,01$; teste t de Student para amostras pareadas)..... 54
- Figura 4.9** – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato em condições controles (controle), tratados com 500 nM BIS I (BIS I), e com 10 nM isoproterenol após incubação com o inibidor (BIS I + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.10. Há diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$ painel A, $p = 0,004$ painel B; teste de Mantel-Cox para comparação entre os 3 grupos)..... 56
- Figura 4.10** – Tempo de recuperação pós-choque de todos os grupos estudados. Colunas representam as médias e linhas os respectivos erros padrão (Tabela 11). Valores determinados em miócitos ventriculares isolados de rato expostos a diferentes condições experimentais: não tratado com fármacos (controle), tratado com 150 nM metoprolol (MET), 10 μM H-89 (H-89), 500 nM BIS I (BIS I), e em miócitos submetidos ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} (minCa^{2+}), na ausência (- ISO) ou presença (+ ISO) de tratamento com 10 nM isoproterenol. * $p < 0,001$, † $p < 0,05$ (teste *post-hoc* de Bonferroni)..... 58
- Figura 5.1** – Representação esquemática da sinalização de reparo via Ca^{2+} . Após o influxo de Ca^{2+} em decorrência de uma lesão, ocorre a elevação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ativa uma adenilato ciclase dependente de Ca^{2+} (AC). AC eleva a produção de monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (AMP_c), que ativa a quinase de proteína A (PKA). PKA atua tanto diretamente no selamento, como promove maior elevação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ca^{2+} também pode ativar calpaína, que hidrolisa a fosfolipase C (PLC), levando à sua ativação e posterior hidrólise de fosfatidil inositol bifosfato

(PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). IP₃ atua elevando a [Ca²⁺]_i. DAG e Ca²⁺ ativam a quinase de proteína C (PKC), que atuará no selamento. Ca²⁺ também pode interagir com SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*) e anexinas (ANX), para mediar a fusão de membranas e processos de exocitose e endocitose. PKC e PKA podem fosforilar ANX (Rothhut, 1997) e SNARE (Chung *et al.*, 2000; Chheda *et al.*, 2001). 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) em miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23) e tratados posteriormente com 10 nM isoproterenol (ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (teste t de Student).	42
Tabela 4.2 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.2). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23) e expostas a 10 nM isoproterenol (ISO; N = 10). IC95: intervalo de confiança para 95%.	43
Tabela 4.3 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) em miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados com 150 nM metoprolol (MET; N = 10), e com 150 nM metoprolol e posteriormente 10 nM isoproterenol (MET + ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial).....	45
Tabela 4.4 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.4). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23), expostas a 150 nM metoprolol apenas (MET; N = 10), e a 10 nM isoproterenol na presença do antagonista (MET + ISO; N = 10). IC95: intervalo de confiança para 95%.....	46
Tabela 4.5 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato sob condições controle (controle; N = 23), e submetidos ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados ($minCa^{2+}$ + ISO; N = 11) ou não ($minCa^{2+}$; N = 11) com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Os valores foram obtidos antes do tratamento experimental.....	48

- Tabela 4.6** – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.5). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células sob condições controle (controle; N = 23), e submetidas ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados (minCa²⁺ + ISO; N = 11) ou não (minCa²⁺; N = 11) com 10 nM isoproterenol. IC95: intervalo de confiança para 95%. 49
- Tabela 4.7** – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados com 10 μ M H-89 (H-89; N = 9) e miócitos tratados com 10 μ M H-89 e posteriormente 10 nM isoproterenol (H-89 + ISO; N = 8). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial). 51
- Tabela 4.8** – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.7). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23), expostas a 10 μ M H-89 (H-89; N = 9), e a 10 nM isoproterenol na presença do inibidor (H-89 + ISO; N = 8). IC95: intervalo de confiança para 95%. 52
- Tabela 4.9** – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados apenas com 500 nM BIS I (BIS I; N = 10), e com 10 nM isoproterenol na presença deste inibidor (BIS I + ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial). 54
- Tabela 4.10** – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.9). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23), expostas apenas a

500 nM BIS I (BIS I; N = 10) e expostas a 10 nM isoproterenol na presença do inibidor (BIS I + ISO; N = 10). IC95: intervalo de confiança para 95%..... 55

Tabela 4.11 – Valores (média ± erro padrão) do tempo de recuperação pós-choque e número de células (N) nos grupos de miócitos ventriculares de rato expostos a diferentes condições experimentais: não tratado com fármacos (controle), tratado com 150 nM metoprolol (MET), 10 µM H-89 (H-89), 500 nM BIS I (BIS I), e em miócitos submetidos à redução da mobilização de Ca^{2+} (min Ca^{2+}), na ausência (- ISO) ou presença (+ ISO) de tratamento com 10 nM isoproterenol. * p < 0,001, † p < 0,05 (teste *post-hoc* de Bonferroni). 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração citosólica de Ca ²⁺ livre
2a	Dimensão do eixo menor da célula
2c	Dimensão do eixo maior da célula
AC	Adenilato ciclase
ATP	Trifosfato de adenosina
BIS I	3-[1-(dimetilaminopropil)indol-3-il]-4-(indol-3-il)-maleimida
cAMP	Monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina
CD	Comprimento celular diastólico
DAG	Diacilglicerol
E	Campo elétrico
EAP	Estimulador elétrico de alta potência
EBP	Estimulador elétrico de baixa potência
EL50	Campo elétrico letal a 50% das células
EPM	Erro padrão da média
E _T	Campo elétrico limiar
FV	Fibrilação ventricular
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
H-89	N-[2-((p-Bromocinnamil)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
HEPES	Ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N"-2 etano-sulfônico
ISO	Isoproterenol
IP ₃	Inositol trifosfato
KREBS	Solução de Krebs-Henseleit
LED	Diodo emissor de luz
MET	Metoprolol
n	Coeficiente de Hill
NAV	Nódulo atrioventricular
NCX	Trocador Na ²⁺ -Ca ²⁺
PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PKA	Quinase de proteína A
PKC	Quinase de proteína C
PLC	Fosfolipase C

RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	ATPase de Ca^{2+} do retículo sarco-endoplasmático
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor</i>
Tyr	Solução de Tyrode modificada
TyrCI	Solução de Tyrode para isolamento de células
V_m	Potencial transmembrana
ΔV_{50}	Máxima variação do potencial transmembrana letal a 50% das células
ΔV_{\max}	Máxima variação do potencial transmembrana
ΔV_T	Máxima variação do potencial transmembrana induzida pelo campo elétrico limiar

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVI
SUMÁRIO	XVIII
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 ARRITMIAS CARDÍACAS	21
1.2 DESFIBRILAÇÃO ELÉTRICA.....	22
1.3 ELETROPORAÇÃO	24
1.4 CATECOLAMINAS.....	28
1.5 CATECOLAMINAS NA FIBRILAÇÃO VENTRICULAR.....	32
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 ANIMAIS.....	34
3.2 SOLUÇÕES.....	34
3.3 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES.....	35
3.4 EQUIPAMENTOS	35
3.4.1 Câmara de perfusão	35
3.4.2 Sistema de microscopia	36
3.4.3 Estimuladores elétricos	36
3.5 VARIÁVEIS E PARÂMETROS DETERMINADOS E ESTIMADOS	37
3.5.1 Dimensões celulares	37
3.5.2 Amplitude de contrações	37
3.5.3 Campo elétrico limiar (E_T)	37
3.5.4 Máxima variação do potencial de membrana (ΔV_{max})	37
3.5.5 Tempo de recuperação após choque de alta intensidade	38
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	38

3.6.1 Protocolo padrão.....	38
3.6.2 Estimulação β -adrenérgica	39
3.6.3 Redução da mobilização de Ca^{2+} durante a estimulação β -adrenérgica.....	39
3.6.4 Bloqueio dos receptores adrenérgicos β_1	40
3.6.5 Inibição da PKA	40
3.6.6 Inibição da PKC.....	40
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS	42
4.1 ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA	42
4.2 BLOQUEIO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1	44
4.3 REDUÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE Ca^{2+} DURANTE A ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA.....	47
4.4 INIBIÇÃO DA PKA	50
4.5 INIBIÇÃO DA PKC	53
4.6 TEMPO DE RECUPERAÇÃO PÓS-CHOQUE.....	56
5 DISCUSSÃO	59
5.1 CURVAS DE LETALIDADE	59
5.2 PROTEÇÃO CONFERIDA PELA ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA	60
5.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA PROTEÇÃO	62
5.4 PARTICIPAÇÃO DO Ca^{2+} NA PROTEÇÃO.....	65
5.5 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS.....	68
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS	71
ANEXO - CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	92

1 INTRODUÇÃO

O coração é um órgão que funciona como uma bomba muscular capaz de gerar a força motriz para manter o fluxo de sangue em todo o sistema vascular. Em mamíferos, ele é constituído de quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, de modo que o órgão funciona como duas bombas acopladas em série. O sangue da circulação sistêmica chega ao átrio direito, e, a seguir, segue para o ventrículo direito, através da válvula tricúspide. A contração do ventrículo direito irá ejetar o sangue para a circulação pulmonar, onde ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e o ar no interior dos alvéolos pulmonares (hematose). Ao fim da circulação pulmonar, a veia pulmonar desemboca no átrio esquerdo, de onde o sangue passa para o ventrículo esquerdo através da válvula mitral. Ao se contrair, o ventrículo esquerdo irá ejetar o sangue para a circulação sistêmica, suprindo todo o organismo com nutrientes e oxigênio, e transportando os resíduos metabólicos para os sítios de eliminação. Durante a sístole, a contração dos átrios precede a contração ventricular. Em decorrência da anatomia cardíaca, a atividade rítmica e sequencial das contrações das câmaras é fundamental para a eficiência deste órgão como uma bomba (Guyton & Hall, 2006).

O sincronismo que garante a eficiência do bombeamento cardíaco é obtido pela atividade elétrica deste órgão. Esta atividade elétrica envolve a geração e condução de potenciais de ação por todo o miocárdio, uma vez que células cardíacas são eletricamente acopladas por junções comunicantes, também conhecidas como junções *gap* (Bers, 2001). O nódulo sinusal é uma região no átrio direito onde é gerada a atividade elétrica, que é propagada para as células atriais. A atividade elétrica que se desenvolve nos átrios não pode se propagar diretamente para os ventrículos devido à existência de tecido conjuntivo isolante entre eles. O único ponto de passagem é o nódulo atrioventricular (NAV), uma estrutura localizada no átrio direito, próximo à válvula tricúspide. No NAV, a condução da atividade elétrica sofre um atraso, que permite que os ventrículos permaneçam relaxados durante a contração dos átrios, garantindo seu adequado enchimento. Do NAV, a atividade elétrica é propagada através do feixe de His e deste para as fibras de Purkinje, que conduzem a atividade elétrica nos ventrículos do ápice para a base e do endocárdio para o epicárdio (Malmivuo & Plonsey, 1995; Guyton & Hall, 2006).

O sincronismo elétrico do coração só é convertido em eficiência de bombeamento se vier acompanhado da coordenação da atividade contrátil. Em condições fisiológicas normais isso ocorre, pois a atividade elétrica está associada à atividade contrátil por um processo conhecido como acoplamento excitação-contração. Nas células cardíacas, este acoplamento ocorre quando o potencial de ação promove a abertura de canais de Ca^{2+} no sarcolema, permitindo a entra-

da deste íon para o citoplasma. O Ca^{2+} que entra na célula é capaz de promover a liberação dos estoques deste íon contidos no retículo sarcoplasmático (RS; Fabiato, 1983), gerando um grande aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), de 150-250 nM para 0,7-1 μM . Devido ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ocorre o favorecimento da ligação do Ca^{2+} à troponina C dos miofilamentos, o que permite a interação actina-miosina necessária para o desenvolvimento da contração celular. A concentração intracelular de Ca^{2+} retorna aos valores basais por ação de transportadores localizados no sarcolema e em organelas (Bers, 2002). Os principais transportadores envolvidos neste processo são a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA) e o trocador Na^{2+} - Ca^{2+} (NCX) do sarcolema, com menor participação da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e do uniporter mitocondrial (Bassani *et al.*, 1992, 1994). A redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminui a probabilidade de interação entre Ca^{2+} e troponina C, promovendo o relaxamento da célula (Bers, 2001, 2002).

1.1 ARRITMIAS CARDÍACAS

O coração está sujeito a sofrer alterações de seu ritmo normal, e conseqüente comprometimento de sua eficiência bombeadora, sob diversas condições patológicas. Estas arritmias podem comprometer a função cardíaca a ponto de serem letais. As arritmias mais graves são as que acometem os ventrículos, pois afetam diretamente o bombeamento de sangue. O caso mais grave e que pode levar a morte em poucos minutos é a fibrilação ventricular (FV), caracterizada por contração desordenada do ventrículo devida à perda da organização sequencial de ativação elétrica do miocárdio. As primeiras descrições da fibrilação advêm dos trabalhos de John McWilliam publicados entre 1887 e 1889 (Akselrod *et al.*, 2009), mas foi Carl J. Wiggers o primeiro a propor o mecanismo da fibrilação em 1940 (Akselrod *et al.*, 2009). Para Wiggers, a fibrilação seria decorrente da iniciação de uma contração cardíaca antes do fim da contração anterior. Tal contração prematura poderia ser causada por um estímulo (natural ou artificial) aplicado durante um período que foi denominado período vulnerável. Embora as células individuais desenvolvam contração durante a fibrilação, a ausência de um padrão organizado compromete severamente a eficiência cardíaca (Jalife, 2000; Keating & Sanguinetti, 2001; Chattipakorn & Chattipakorn, 2004; Guyton & Hall, 2006; Jones & Lodé, 2007; Akselrod *et al.*, 2009; Steendijk, 2009).

Nos Estados Unidos da América, é estimado que cerca de 600 mil pessoas sofram parada cardíaca a cada ano, das quais apenas um terço sofre a parada dentro de hospitais (Roger *et al.*, 2012). Quando são identificadas causas, as paradas cardíacas são associadas principalmente à FV e podem causar a morte súbita do paciente (Turakhia & Tseng, 2007). Estima-se

que ao redor do mundo a morte súbita atinja em torno de 4 a 5 milhões de pessoas anualmente (Chugh *et al.*, 2008).

1.2 DESFIBRILAÇÃO ELÉTRICA

Desde os primórdios do uso da eletricidade, o ser humano tem explorado com curiosidade os efeitos desta sobre os seres vivos. No início, ainda no século XVIII, os estudos eram meramente empíricos, e não raramente envolviam a eletrocussão de algum ser vivo por descargas oriundas de garrafas de Leyden, um dispositivo primitivo que permitia o armazenamento de carga elétrica. Homens como Giovanni Bianchi, van Pieter Musschenbroek e Abdilgaard conduziram estudos em que a eletricidade era utilizada tanto para matar como para reviver animais. Diversos trabalhos foram conduzidos ao longo dos anos neste campo, um tanto obscuro para a época, e em 1774 teria sido realizada a primeira desfibrilação elétrica bem sucedida em humanos. O caso em questão envolve a reanimação de uma menina de 3 anos, Sophia Greenhill, que teria morrido após uma queda. Imaginando que a menina já estivesse morta, os próprios pais autorizaram que um vizinho aplicasse choques elétricos em diversas partes do corpo da menina. Mas, somente em 1947 foi realizada com sucesso a primeira desfibrilação humana bem documentada. O feito foi obtido por Claude Beck, utilizando a aplicação de quatro choques de 110 V diretamente no coração do paciente Richard Heyard, que na época tinha 14 anos (Akselrod *et al.*, 2009).

Os primeiros trabalhos com desfibrilação elétrica eram muito aleatórios e consistiam basicamente em aplicar choques sucessivos em diferentes partes do corpo de um paciente, presumidamente morto, até que este fosse reanimado ou a equipe desistisse do processo. James Curry reuniu os relatos de ressuscitação disponíveis até 1792 e, tentando pôr ordem no caos, propôs o que seria a primeira descrição de um protocolo desfibrilatório. Para Curry, a aplicação de choques elétricos só deveria ser realizada se outras manobras não reanimassem o paciente após uma hora de tentativas. Mas, sem sombra de dúvidas, a maior contribuição deste autor foi apontar a importância do choque ser aplicado através do peito do paciente, além é claro de ter sugerido uma série de procedimentos de segurança (Akselrod *et al.*, 2009).

A ressuscitação elétrica não foi vista com bons olhos pela opinião pública no início. Afinal, em uma época de pouca difusão de informação científica entre a população, a realização de experimentos que envolviam a eletrocussão de cadáveres não raramente era associada a rituais e cultos satânicos. A publicação em 1818 do romance Frankenstein de Mary Shelley ajudou a obscurecer ainda mais o procedimento e levantou uma cortina de medo sobre o uso da eletricidade para ressuscitar mortos. No transcorrer dos séculos XIX e XX, muitos progressos

foram alcançados no campo da eletricidade, o que foi seguido da evolução destes processos de desfibrilação, até então muito empíricos (Akselrod *et al.*, 2009). Notadamente, no final do século XIX e início do século XX, o desenvolvimento e aplicação clínica do eletrocardiograma por Willem Einthoven representaram um grande avanço para o entendimento das arritmias cardíacas (Barold, 2003). Durante o século XX, houve o desenvolvimento dos desfibriladores e dos procedimentos desfibrilatórios modernos, que se tornaram parte do que se chama hoje de ressuscitação cardiopulmonar (Akselrod *et al.*, 2009).

Do ponto de vista funcional, a desfibrilação consiste na aplicação de um campo elétrico (E) de alta intensidade sobre o coração, o que reverte o quadro de fibrilação pela recuperação do sincronismo da atividade contrátil cardíaca. A aplicação de um E externo gera um gradiente de potencial elétrico no meio extracelular, que é capaz de promover o rearranjo de cargas nas faces da membrana celular e assim causar variações do potencial transmembrana (V_m). No caso das células cardíacas, que não são esféricas, as regiões da membrana mais próximas aos eletrodos são expostas aos maiores valores de potencial externo, e por isso experimentam as maiores variações de V_m (Knisley *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1999; Sharma & Tung, 2002). Quando V_m atinge o valor limiar para o disparo de um potencial de ação, a célula é excitada.

A estimulação de uma célula excitável, i.e., sua despolarização, é seguida de um período de refratariedade em que ela não responde a nenhum estímulo, por mais intenso que seja. Fazendo com que um grande número de células cardíacas entrem neste estado de inexcitabilidade ao mesmo tempo, é possível se extinguir as frentes de onda desordenadas que mantêm a FV, permitindo o restabelecimento do padrão normal de contração cardíaca (Zipes *et al.*, 1975; Aidley, 1998; Bers, 2001; Qu, 2006).

Normalmente, um E da ordem de 1 V/cm já é suficiente para estimular uma célula (Ideker *et al.*, 1995). Mas o E necessário para desfibrilação é bem maior, pois o coração possui células cardíacas a diferentes distâncias dos eletrodos e orientadas em várias direções, de modo que as células no miocárdio ficam expostas a diferentes valores de E (Yabe *et al.*, 1990; Vetter *et al.*, 2005). A orientação dos miócitos em relação ao E é um fator importante e capaz de determinar o valor limiar de E para excitação (Tung *et al.*, 1991; Ranjan & Thakor, 1995; Lima, 1999; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Assim, para obter uma maior chance de sucesso na desfibrilação é necessário um choque de alta intensidade (Chen *et al.*, 1998; Chattipakorn & Chattipakorn, 2004; Dossdall *et al.*, 2010). O problema é que os choques desfibrilatórios podem levar ao surgimento de E no coração que variam de 1 a 189 V/cm (Yabe *et al.*, 1990), e um E desta magnitude é mais que o suficiente para se promover hipercontratura irreversível e morte de células cardíacas (Jones *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2008; Klauke *et al.*, 2010).

O procedimento de desfibrilação pode acarretar efeitos indesejados graves. A exposição do coração a E de alta intensidade pode levar ao surgimento de lesões no miocárdio, refratariedade elétrica, depressão contrátil, redistribuição de receptores de membrana, perda de excitabilidade, reorganização de citoesqueleto e morte de miócitos cardíacos (Robinson, 1985; Onuma & Hui, 1985; Yabe *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1994; Malmivuo & Plonsey, 1995; Soares, 2003; Cheng *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009). O próprio choque desfibrilatório pode ainda promover a reindução do quadro de fibrilação (Trayanova, 2001; Dossall *et al.*, 2010), danos ao miocárdio e até morte após uma desfibrilação inicialmente bem sucedida (Becker *et al.*, 1991; Walcott *et al.*, 2003).

Os efeitos indesejados da desfibrilação são comumente associados à perda da permeabilidade seletiva da membrana em decorrência do fenômeno denominado eletroporação. Este consiste na permeabilização (formação de poros) da membrana celular (Tsong, 1991; Tovar & Tung, 1992; Tung *et al.*, 1994; Krauthamer & Jones, 1997; Nikolski & Efimov, 2005).

Mesmo com tantos problemas, uma vez constatada a FV, o procedimento de desfibrilação deve ser realizado em caráter de emergência. O tempo é também crucial nesta situação. Cerca de 50% dos quadros são revertidos se a desfibrilação ocorre nos primeiros 5 minutos, caindo em 10% a cada minuto sem tratamento (Eisenberg *et al.*, 1980; Larsen *et al.*, 1993). Em média, somente 21% dos pacientes sobrevivem a um episódio de FV (Roger *et al.*, 2011).

1.3 ELETROPORAÇÃO

A eletroporação, ou eletropermeabilização, compromete o controle do fluxo de íons e macromoléculas através da membrana (Kinosita & Tsong, 1977; Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996; Oliveira *et al.*, 2005; Nikolski & Efimov, 2005; Ivorra, 2010; Fedorov *et al.*, 2008). Dois tipos de poros podem surgir na membrana plasmática durante a eletroporação: os hidrofóbicos e os hidrofílicos (Figura 1.1). Os poros hidrofóbicos não permitem a passagem de íons, são menores, e surgem e desaparecem constantemente na membrana por agitação térmica dos fosfolípides que a constituem. Já os poros hidrofílicos são maiores, podem permitir a passagem de íons e macromoléculas, e são formados a partir dos poros hidrofóbicos já existentes (Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996). Assume-se que o poro hidrofóbico transforma-se em um poro hidrofílico quando excede um raio crítico (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Smith *et al.*, 2004). A formação deste tipo de poro é acompanhada do encurvamento da bicamada lipídica (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Tieleman, 2004), de modo que as cabeças polares dos fosfolípides formam um canal que permite a passagem de moléculas polares (Figura

1.1). À medida que moléculas de água e íons atravessam a membrana a favor de seu gradiente eletroquímico, a expansão do poro vai sendo acelerada (Tieleman, 2004).

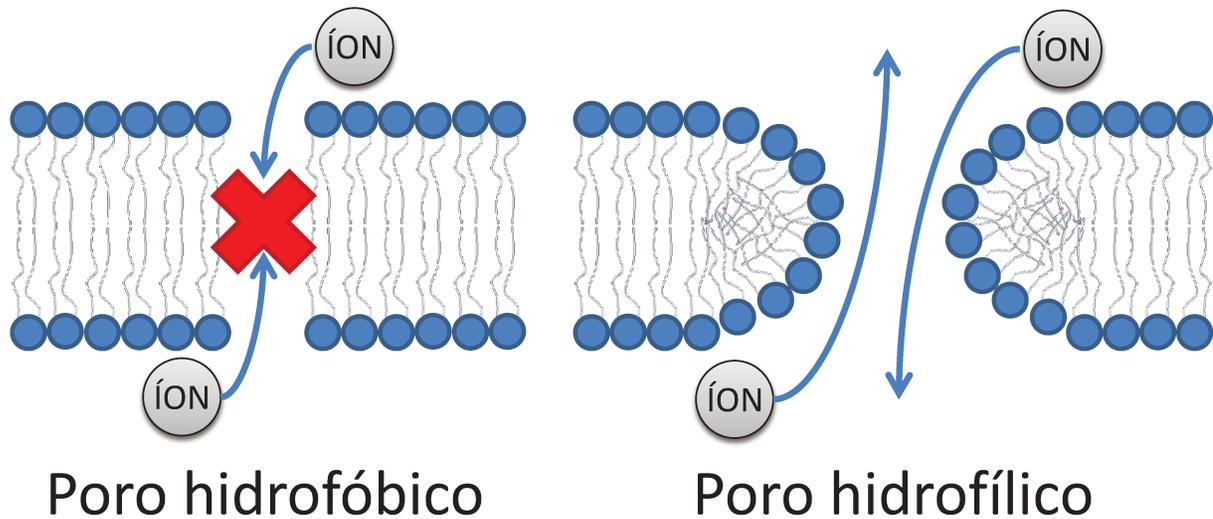


Figura 1.1 – Representação esquemática de poros em uma bicamada lipídica que permitem (poro hidrofílico) ou não (poro hidrofóbico) a passagem de íons e outras moléculas polares.

A aplicação de um E de alta intensidade promove a formação de poros hidrofílicos ao fornecer energia ao sistema (DeBruin & Krassowska, 1999): a variação de V_m modifica a condição de equilíbrio do sistema, de modo a favorecer a quebra da barreira de energia para a formação do poro hidrofílico, a qual passa a ser energeticamente favorável. A partir daí, o poro vai se expandindo e a energia livre do sistema diminui, o que estabiliza o sistema na nova condição de equilíbrio (Figura 1.2, Weaver & Chizmadzhev, 1996).

Aceita-se que existe um valor crítico de V_m que deve ser atingido para que a formação de poros hidrofílicos na membrana seja favorável (Kotnik *et al.*, 2003; Weaver e Chizmadzhev, 1996). A eletroporação consiste, assim, em um evento estocástico de conversão de poros hidrofóbicos em hidrofílicos (Böckmann *et al.*, 2008), de modo que quanto maior a variação de V_m (Wolf *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2004; Saulis, 2010) e quanto mais tempo V_m permanece acima do limiar de eletroporação (Kotnik *et al.*, 2003), maior a probabilidade de formação dos poros. Estes parâmetros, intensidade e duração, estão intimamente relacionados, sendo que pulsos de curta duração necessitam de uma intensidade de E maior do que pulsos longos para promover a eletroporação (Miklavčič *et al.*, 2010).

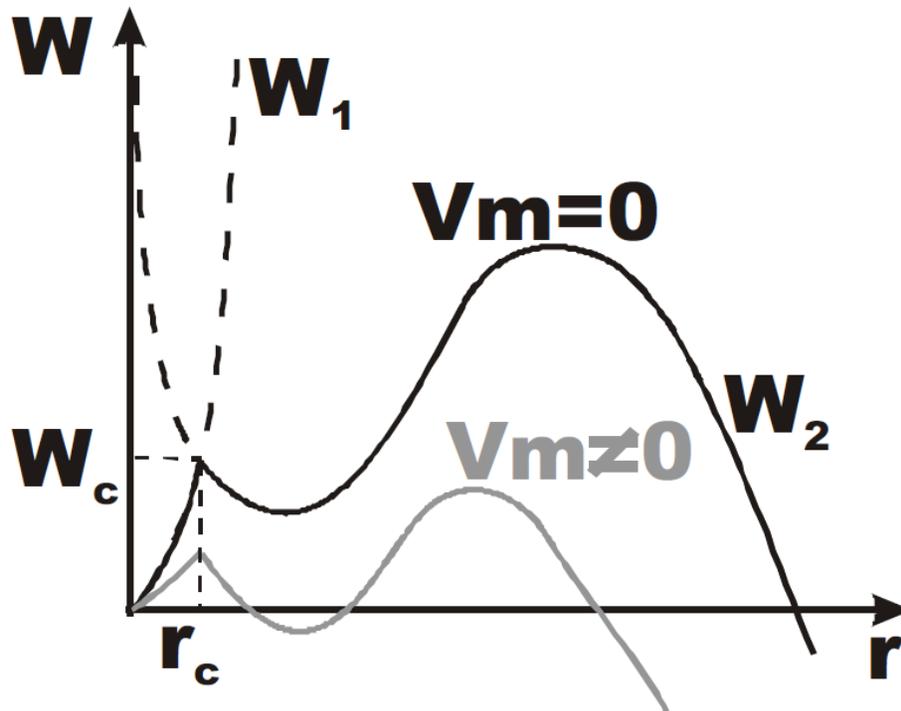


Figura 1.2 – Energia livre (W) dos poros hidrofóbicos (W_1) e hidrofílicos (W_2) em relação ao raio dos poros (r) e o potencial transmembrana (V_m). W_c é a barreira de energia que se opõe à formação do poro hidrofílico, e r_c é o raio crítico para conversão do poro hidrofóbico em hidrofílico (Weaver & Chizmadzhev, 1996; licença número 2901020114458).

A faixa de V_m descrita como limiar para formação de poros é ampla, entre 100 e 1100 mV, o que pode ser parcialmente causado por variação na espessura da membrana de diferentes tipos celulares, das condições experimentais e do método de medição de V_m (Crowley, 1973; Zimmermann *et al.*, 1974; O'Neill & Tung, 1991; Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999; Ivorra & Rubinsky, 2010). Em células cardíacas, a eletroporação parece começar a ocorrer quando V_m atinge valores próximos a ± 200 mV (Tung, 1996).

Dependendo da severidade da eletroporação, ela pode ser reversível (Saulis *et al.*, 1991; Saulis, 2010) ou irreversível (Ivorra & Rubinsky, 2010). A eletroporação irreversível culmina na morte celular, seja pela formação de poros permanentes, seja pela formação de poros temporários, que, no entanto, permanecem abertos por tempo suficiente para desencadear eventos que levam à morte celular (Ivorra & Rubinsky, 2010). Entretanto, a morte pode ocorrer mesmo quando não há completa lise da célula, e até após o completo reparo da membrana (Neu & Neu, 2010). Isto ocorreria por que a célula que sobrevive guardaria uma “memória” do evento de eletroporação. Esta memória, que pode perdurar por horas, foi proposta por Teissié *et al.* (2005) após a revisão de trabalhos que demonstram a permanência de alterações (i.e.,

inversão de posição) de fosfolípidos carregados negativamente na membrana que sofre reparo. Normalmente existe uma organização bem definida de fosfolípidos na membrana, o que é importante para diversos processos celulares, inclusive por participar da definição do V_m (Fadeel & Xue, 2009). A fosfatidilserina, por exemplo, é um fosfolípido que, em condições fisiológicas normais é mais abundante na face citoplasmática da membrana (Verhoven *et al.*, 1995; Fadok *et al.*, 1998; Fadeel & Xue, 2009). A inversão da localização da fosfatidilserina ocorre normalmente durante a apoptose, atuando como sinal para desencadear o ataque de fagócitos (Verhoven *et al.*, 1995; Fadok *et al.*, 1998; Savill & Fadok, 2000). A perda de conteúdo celular através dos poros e a mudança irreversível nas concentrações iônicas intracelulares também podem ser causas da morte celular pós-reparo (Neu & Neu, 2010). A morte das células cardíacas expostas a E de alta intensidade tem sido associada a estes últimos fatores, particularmente a sobrecarga de Ca^{2+} , um íon de alto potencial citotóxico (Case *et al.*, 2007). O aumento massivo e prolongado da $[Ca^{2+}]_i$ causa hipercontratura, que leva a lesão física do citoesqueleto e da membrana, bem como ativação de proteases Ca^{2+} -dependente e dano mitocondrial (Tung *et al.*, 1994; Knisley & Grant, 1995; Berridge *et al.*, 1998, 2000; Oliveira *et al.*, 2005; Klauke *et al.*, 2010).

Quando a lesão da membrana, por eletroporação ou outra causa, é reversível, os poros desaparecem por um processo passivo ou ativo. O processo passivo consiste no fechamento espontâneo dos poros. É um processo muito rápido (menos de 1 s), mas só observado em poros pequenos, de até 2 μm de diâmetro (McNeil & Steinhardt, 2003). Experimentos com hemácias demonstraram que o fechamento dos poros pode ocorrer em três etapas (dependendo dos parâmetros do pulso que gerou a eletroporação): a primeira etapa é caracterizada por uma rápida redução do raio do poro; a etapa seguinte é marcada por uma redução mais lenta do raio do poro, e a última etapa é a que leva ao fechamento definitivo do poro (Saulis *et al.*, 1991). O reparo de danos maiores requer um mecanismo ativo e mais lento, associado com os processos de exocitose ou endocitose e, portanto, dependente de trifosfato de adenosina (ATP) e Ca^{2+} (Steinhardt *et al.*, 1994; McNeil & Steinhardt, 2003; Schapire *et al.*, 2009; Draeger *et al.*, 2011).

O reparo ativo da membrana pode ocorrer basicamente de quatro formas, que não são mutuamente exclusivas e podem coexistir (McNeil & Steinhardt, 2003; Schapire *et al.*, 2009; Draeger *et al.*, 2011):

- 1) O poro é excitado, i.e., a célula descarta para o meio externo a região da membrana danificada na forma de uma vesícula. A exocitose de regiões danificadas da membrana foi demonstrada pela observação do descarte de micropartículas próximo

a regiões lesadas da membrana de células renais e do miométrio (Babiychuk *et al.*, 2009).

- 2) A fusão de vesículas à membrana *per se* promove uma redução da tensão superficial da membrana, levando ao fechamento dos poros (Togo *et al.*, 1999, 2000).
- 3) Formação de um *patch* de vesículas que se fundem e vedam os poros ou áreas de ruptura, como observados em fibroblastos e células ovo de ouriço do mar, ou axônio de neurônios (Eddleman *et al.*, 1997; Terasaki *et al.*, 1997; McNeil *et al.*, 2000; McNeil & Kirchhausen, 2005).
- 4) A região da membrana contendo o poro é endocitada (McNeil & Steinhardt, 2003; Schapire *et al.*, 2009; Draeger *et al.*, 2011), como observado em células renais e He-La lesadas pela toxina estreptolisina O (Idone *et al.*, 2008).

1.4 CATECOLAMINAS

As catecolaminas são moléculas que contêm um grupo funcional amina (NH_2) e um anel benzênico característico denominado catecol (1,2-dihidroxibenzeno). Estes compostos possuem importante função no organismo, atuando como hormônios e neurotransmissores da eferência simpática (Nagatsu, 2006). As principais catecolaminas biogênicas são a adrenalina (= epinefrina), noradrenalina (= norepinefrina) e dopamina, todas sintetizadas a partir da L-tirosina (Latifi *et al.*, 2000; Nagatsu, 2006). Além das biogênicas, existem importantes catecolaminas sintéticas desenvolvidas para atuar sobre receptores específicos, como o isoproterenol (= isoprenalina, um derivado da noradrenalina) e a dobutamina (Latifi *et al.*, 2000).

As catecolaminas exercem um importante papel na regulação da frequência e força de contração cardíacas. Entretanto, estes efeitos variam de acordo com os receptores adrenérgicos (adrenoceptores) ativados por elas (Guyton & Hall, 2006). Existem duas superfamílias de adrenoceptores, que são designadas pelas letras gregas α e β . Esta classificação teve origem na resposta excitatória (α) e inibitória (β) destes receptores em vasos sanguíneos, i.e., receptores α promovem a contração e receptores β a dilatação dos vasos sanguíneos (Ahlquist, 1948). Posteriormente identificou-se variações dentro destas famílias, e a classificação foi expandida para α_1 e α_2 , e β_1 e β_2 , em função da potência relativa de agonistas (Langer, 1974; Lands *et al.*, 1967a,b), e β_3 (Gauthier *et al.*, 1996).

Os receptores possuem séries de potência de agonistas características. No caso de adrenoceptores β , a ordem de potência é: β_1 (isoproterenol > adrenalina = noradrenalina), β_2 (isoproterenol > adrenalina >> noradrenalina) e β_3 (isoproterenol = noradrenalina > adrenalina).

O isoproterenol (ISO) é, portanto, um agonista seletivo para os adrenoceptores β , mas não seletivo para seus subtipos (Lands *et al.*, 1967b).

No coração, a predominância é da superfamília β (Bristow *et al.*, 1988; Steinfath *et al.*, 1992; Brodde & Michel, 1999). Embora os subtipos β_1 e β_2 coexistam, a dominância é marcadamente de β_1 , que perfazem cerca de 80% dos adrenoceptores β (Carlsson *et al.*, 1972; Minneman *et al.*, 1979; Brodde, 1991).

Os adrenoceptores são glicoproteínas de membrana que fazem parte da grande família dos receptores acoplados a proteína G. Estas são verdadeiras “chaves moleculares”, atuando na transdução de diversas vias de sinalização. As proteínas G são constituídas de três subunidades (G_α , G_β e G_γ), e podem ser classificadas em G_s , G_i , G_q , entre outras, de acordo com as variantes de sua subunidade G_α . Esta subunidade é a que possui atividade catalítica, i.e., a capacidade de hidrolisar trifosfato de guanosina (GTP). Durante sua atividade, as subunidades da proteína G se dissociam em um ciclo bem conhecido (Figura 1.3). No repouso, as três subunidades estão associadas em um complexo trimérico $G_{\alpha\beta\gamma}$ e uma molécula de difosfato de guanosina (GDP) está ligada a subunidade G_α . Quando o receptor é ocupado por um agonista, o GDP é substituído por GTP, o que promove a dissociação da subunidade G_α do complexo $G_{\beta\gamma}$. G_α irá atuar na modulação da atividade de alguma enzima, que irá prosseguir com a cascata de sinalização. O complexo dimérico $G_{\beta\gamma}$ também pode interagir com efetores e modular outras vias paralelas. Quando G_α hidrolisa o GTP em GDP e fosfato inorgânico, ela volta a se associar com as demais, formando novamente o complexo $G_{\alpha\beta\gamma}$ (Gilman, 1987; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; McCudden *et al.*, 2005; Deupi & Standfuss, 2011).

Após a ativação dos adrenoceptores e conseqüentemente da proteína G associada, a cascata de sinalização varia consideravelmente nas diferentes vias (Figura 1.4). As vias adrenergicas α_2 e β estão associadas a adenilato ciclase (AC), e a via α_1 a fosfolipase C (PLC).

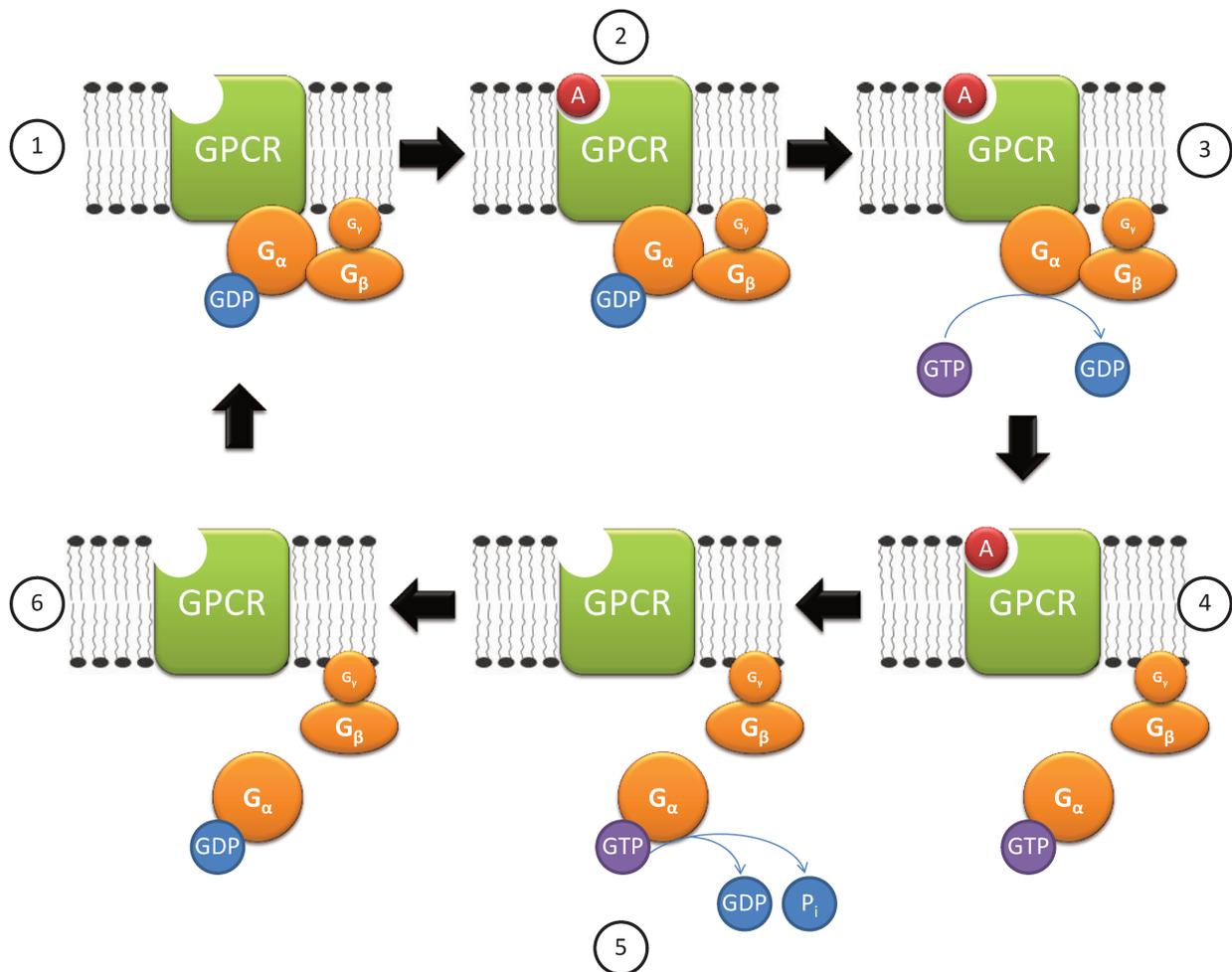


Figura 1.3 – Representação esquemática do ciclo de ativação de uma proteína G. ❶ A proteína G encontra-se em repouso, na forma de complexo trimérico $G_{\alpha\beta\gamma}$ associado ao receptor acoplado a proteína G (GPCR) e com um difosfato de guanosina (GDP) ligado a subunidade G_{α} . ❷ Um agonista se liga ao GPCR. ❸ GDP é substituído por um trifosfato de guanosina (GTP). ❹ Subunidade G_{α} se dissocia do complexo $G_{\beta\gamma}$. ❺ GTP é hidrolisado em GDP e fosfato inorgânico (P_i). ❻ GDP oriundo da hidrólise permanece associado a G_{α} e a proteína G retorna ao estado de repouso ❶.

A ativação de adrenoceptores α_1 promove a ativação de uma proteína G_q , um tipo de proteína G cuja subunidade G_{α} estimula a atividade de PLC. PLC é uma enzima capaz de hidrolisar fosfolípides, neste caso, o fosfolípide de membrana fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2). A hidrólise do PIP_2 pela PLC origina diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). IP_3 é capaz de estimular a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares. Em conjunto, Ca^{2+} e DAG promovem a ativação do efetor final desta via, a quinase de proteína C (PKC, Minneman, 1988). Os substratos da PKC são bastante diversos, de modo que ela está presente em uma grande variedade de processos celulares, e.g., nos mecanismos associados à excitose e fusão de membranas (De

Matteis *et al.*, 1993; Buccione *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996; Westermann *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2000).

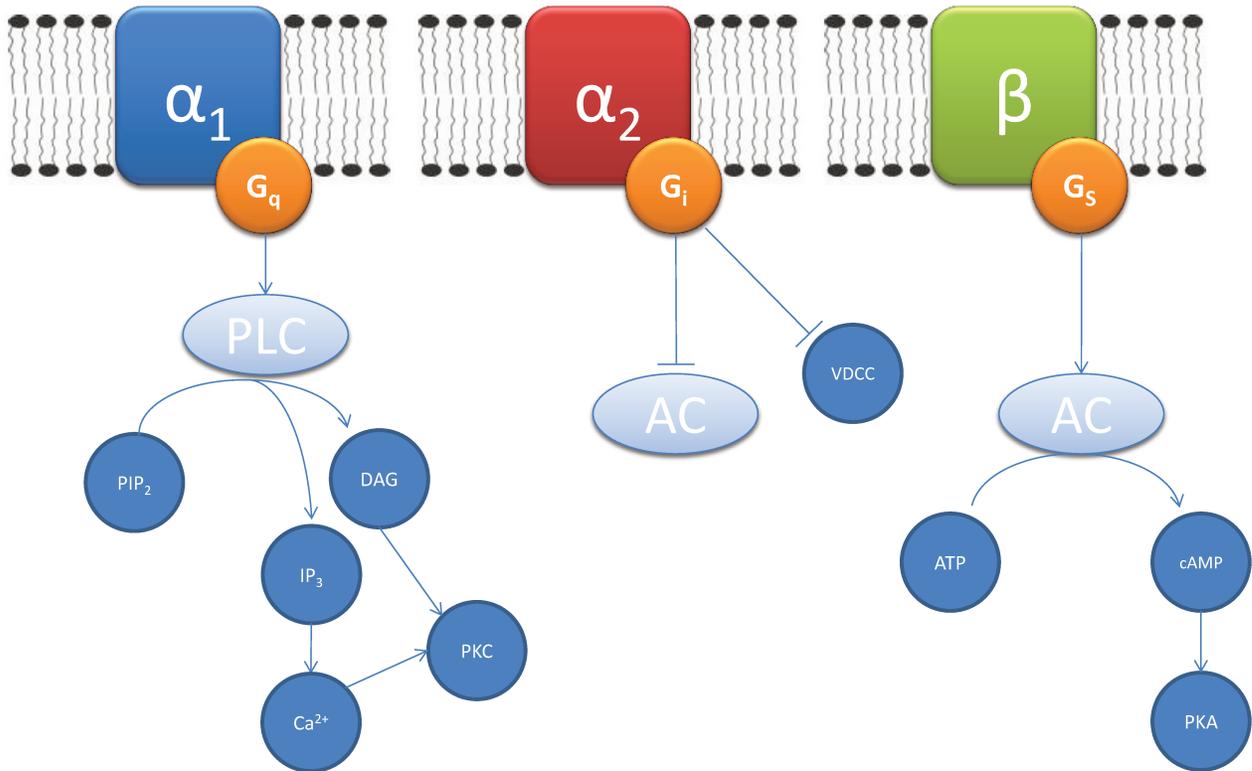


Figura 1.4 – Representação esquemática das principais vias de transdução da sinalização mediada por adrenoceptores. A ligação de um agonista ao adrenoceptor α_1 promove a ativação de uma proteína G_q , que por sua vez ativa uma fosfolipase C (PLC). Fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) é convertido em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) pela PLC. IP₃ promove a elevação da concentração citosólica de Ca²⁺, o que juntamente com a ação da DAG, promove a ativação da quinase de proteína C (PKC). Quando um agonista se liga ao adrenoceptor α_2 , ocorre a ativação de uma proteína G_i que irá inibir a adenilato ciclase (AC) e canais de Ca²⁺ voltagem dependentes (VDCC). A ligação de um agonista ao adrenoceptor β leva a ativação de uma proteína G_s capaz de ativar a AC. Trifosfato de adenosina (ATP) é convertido em monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (cAMP) por ação da AC. cAMP atua como um segundo mensageiro que promove a ativação da quinase de proteína A (PKA).

A via de sinalização canônica associada aos receptores β é a da proteínas G_s . Estas são proteínas G cuja subunidade G_α promove a estimulação da atividade da AC, a qual converte ATP em monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (cAMP). cAMP é um importante segundo mensageiro capaz, dentre outras coisas, de promover a ativação da quinase de proteína A (PKA, Bers, 2001, 2002). A PKA inativa é um complexo proteico formado por 4 subunidades, 2 regulatórias e 2 catalíticas. O cAMP se associa às subunidades regulatórias, o que leva a dissociação do complexo, permitindo que as subunidades catalíticas da PKA fosforilem seus substratos (Kim *et al.*, 2007). Assim como ocorre com a PKC, a PKA afeta uma grande variedade de funções

celulares, como os processos de excitação e fusão de membranas (Muñiz *et al.*, 1997; Chheda *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2004; Seino & Shibasaki, 2005; Skelin & Rupnik, 2011).

1.5 CATECOLAMINAS NA FIBRILAÇÃO VENTRICULAR

Como há prejuízo do desenvolvimento de contração coordenada dos ventrículos durante a fibrilação ventricular, ocorre comprometimento da função bombeadora do coração, e consequente redução do débito cardíaco (ver 1.1). Já que pressão arterial e débito cardíaco estão intrinsecamente relacionados, ocorre também queda imediata da pressão arterial. Conseqüentemente, a atividade dos barorreceptores arteriais é reduzida, resultando em aumento compensatório do tônus neural da eferência simpática. Como resultado, ocorre maior liberação de catecolaminas circulantes e nas terminações adrenérgicas que inervam o coração, produzindo efeitos cronotrópico e inotrópico positivos pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Wortsman *et al.*, 1984; Foley *et al.*, 1987; Winkle *et al.*, 1990; Meredith *et al.*, 1991; Woodhouse *et al.*, 1992).

A infusão de catecolaminas, em especial a adrenalina, é um procedimento comumente utilizado nos protocolos de reanimação, precedendo a desfibrilação (Lee, 2011). Herlitz *et al.* (1995) relatam uma maior taxa de recuperação espontânea da circulação e sobrevivência de pacientes com FV tratados emergencialmente com adrenalina, no entanto, sem desfibrilação elétrica. Mas, em casos em que a infusão de catecolaminas precede a desfibrilação, tem se observado uma queda no limiar de desfibrilação (Tang *et al.*, 2001; Kalus *et al.*, 2005), i.e., a desfibrilação é obtida com choques de menor amplitude efetiva, o que é associado a uma estimulação elétrica cardíaca mais segura e eficiente (Jones *et al.*, 1985; Bardou *et al.*, 1988; Walcott *et al.*, 1998; Kroll & Swerdlow, 2007; Viana, 2011; Vostrikov *et al.*, 2011). Ademais, a ativação de PKC e PKA, que pode ser obtida por ação de catecolaminas (ver 1.4), tem sido associada a uma potencialização e facilitação dos mecanismos de reparo celular em neurônios, fibroblastos e células da córnea (Togo *et al.* 1999; Shen & Steinhardt, 2005; Spaeth *et al.*, 2010, 2011). No entanto, ainda não é conhecido se as catecolaminas afetam a vulnerabilidade das células miocárdicas à lesão causada por E de alta intensidade, e é esta questão que este trabalho se propõe a responder.

2 OBJETIVOS

Determinar a influência da estimulação β -adrenérgica na vulnerabilidade de miócitos cardíacos a campos elétricos de alta intensidade e identificar as vias de sinalização envolvidas neste processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos oriundos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos no biotério do CEB em gaiolas coletivas (até 3 animais/gaiola) e ambiente climatizado com fotoperíodo de 12:12 horas, recebendo água e ração *ad libitum* até a realização dos experimentos. Os animais foram manipulados apenas para limpeza das gaiolas.

Todo o procedimento experimental envolvendo animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (protocolos número 2490-1B e 2587-1B; Anexo).

3.2 SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água ultrafiltrada tipo I (Easypure UF, Barnstead International, Dubuque, IA, EUA) com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ e apresentaram pH de 7,4 após titulação com NaOH, ou bobulhamento com carbogênio (no caso de soluções contendo bicarbonato). Os sais utilizados foram de padrão analítico. As concentrações dos componentes das soluções abaixo descritas estão expressas em mM:

- a) **Solução de Tyrode para isolamento de células (TyrCl)**: NaCl 140; KCl 6; MgCl_2 2,5; ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N"-2 etano-sulfônico (HEPES) 10; glicose 11.
- b) **Solução de Tyrode modificada (Tyr)**: NaCl 140; KCl 6; MgCl_2 2; HEPES 5; glicose 11; $\pm \text{CaCl}_2$ 0,5.
- c) **Solução de Krebs-Henseleit (KREBS)**: NaCl 115; KCl 4,6; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 25; MgSO_4 2,4; glicose 11,1.
- d) **Solução cardioplégica**: KCl 30; KH_2PO_4 10; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1; HEPES 10; glicose 11; taurina 20; ácido glutâmico 70.
- e) **Solução de isoproterenol (ISO)**: A solução estoque de ISO-HCl (20 mM), contendo 10 mM de ácido ascórbico foi diluída em Tyr para a concentração final de 10 nM.
- f) **Solução de metoprolol (MET)**: A solução estoque de tartarato de MET (15 mM) foi diluída em Tyr para a concentração final de 150 nM.
- g) **Solução de N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89)**: Alíquotas da solução estoque de dicloridrato de H-89 (10 mM) foram diluídas em

água ultrapura para a concentração de 100 μM . A seguir, procedeu-se à diluição em Tyr para a concentração final de 10 μM .

- h) **Solução de Cloridrato de 3-[1-(dimetilaminopropil)indol-3-il]-4-(indol-3-il)-maleimida (BIS I)**: A solução estoque de Cloridrato de BIS I (2,227 mM) foi diluída em Tyr para a concentração final de 500 nM.

ISO, MET e BIS I foram adquiridos de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA) e H-89 foi adquirido de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). O solvente das soluções estoque de ISO e MET foi água ultrafiltrada tipo I, enquanto que, para H-89 e BIS I, usou-se dimetilsulfóxido. Todas as soluções estoque foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES

O isolamento de miócitos do ventrículo esquerdo de ratos Wistar foi realizado de acordo com Penna & Bassani (2010). O animal foi sacrificado por exsanguinação após concussão cerebral, o coração foi dissecado e os miócitos do ventrículo esquerdo foram isolados por digestão enzimática a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Resumidamente, a aorta foi canulada e o coração foi perfundido com KREBS contendo 0,5 mM de CaCl_2 por cerca de 4 min. O coração foi então perfundido por 4-5 min com KREBS sem CaCl_2 , e em seguida, com esta solução contendo colagenase tipo I (0,4-0,5 mg/ml; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 15-20 min. Para interromper a digestão, o coração foi perfundido com TyrCl sem colagenase, contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml; Calbiochem, San Diego, CA, EUA) por 5-8 min. Por fim, o ventrículo esquerdo foi dissecado e triturado mecanicamente para dissociação das células em banho com solução cardioplégica contendo a mesma concentração de albumina.

3.4 EQUIPAMENTOS

A montagem experimental utilizada para a realização do presente trabalho foi desenvolvida em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do CEB/UNICAMP (para maiores detalhes, ver Oliveira, 2004; Ricardo *et al.*, 2006).

3.4.1 Câmara de perfusão

A suspensão de células obtidas no isolamento era depositada em uma câmara de perfusão de acrílico transparente, cujo fundo era formado por uma lamínula de vidro. Nesta câmara, foram dispostos dois eletrodos de platina (2 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro), parale-

los ao fluxo de perfusão. Esta configuração permite o cálculo do E aplicado no interior câmara como se esta fosse um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008):

$$E = \frac{V}{d} \quad [3.1]$$

onde E (V/cm) é o campo elétrico no interior da câmara, V é a tensão aplicada aos eletrodos e d é a distância entre os eletrodos (0,75 cm).

No caso da câmara de perfusão utilizada, a aproximação da expressão 3.1 apresenta um erro menor que 2% desde que a célula se encontre à distância de, pelo menos, 2 mm dos eletrodos e 5 mm do degrau de saída da solução (Oliveira, 2004; Oliveira *et al.*, 2008). Esta condição foi respeitada na realização de todos os experimentos.

Uma fina camada de colágeno foi aplicada para revestir a lamínula no fundo da câmara de perfusão e permitir a adesão das células, evitando que estas fossem deslocadas pelo fluxo de solução. Após a secagem do colágeno (20 min) a suspensão de células era depositada na câmara. Após 30 min de sedimentação, as células eram perfundidas por Tyr a uma taxa de 3 a 4 mL/min.

3.4.2 Sistema de microscopia

O sistema de microscopia utilizado (Oliveira, 2004; Ricardo *et al.*, 2006) consiste em um microscópio invertido que permite ampliar a imagem em 910 vezes. A iluminação foi obtida por um diodo emissor de luz (LED) vermelho de alta intensidade (Super Bright LED, Jumbo, 5000 mcd, 1,85 V, 20 mA, fabr. Archer, N. Cat. 276 - 086). A imagem ampliada por uma objetiva (mod. Plan 32, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) era captada por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*, mod. ICD-31 Ikegami Tsushinki Co., Tóquio, Japão) e simultaneamente transmitida para um monitor de vídeo (mod. KBM 1200S, Kodo, Ilhéus, BA) e para uma placa de aquisição de vídeo (mod. Dazzle Digital Video Creator 150, Pinnacle Systems, North Canton, OH, EUA), conectada a um microcomputador (Pentium Dual Core, 2,8 GHz, 2 GB de RAM, 230 GB), onde foram armazenados os arquivos de vídeo.

3.4.3 Estimuladores elétricos

Um estimulador elétrico de baixa potência (EBP; desenvolvido no CEB/UNICAMP), capaz de gerar pulsos retangulares de tensão (mono ou bipolar simétrico; amplitude 0-15 V; frequência 0,1-10 Hz; duração 0,1-10 ms) foi programado para fornecer pulsos bipolares de baixa intensidade com 10 ms de duração total, à frequência de 0,5 Hz.

Um estimulador elétrico de alta potência (EAP; mod. S48K, Grass, West Warwick, RI, EUA), capaz de gerar pulsos retangulares monopolares de tensão com amplitude de 10 mV a 150 V, duração de 10 μ s a 10 s, foi programado para gerar pulsos de alta intensidade, com 10 ms de duração sincronizados ao EBP.

A seleção do estimulador a ser utilizado foi feita por meio de um dispositivo comutador (Oliveira, 2004). A saída de cada estimulador foi monitorada em canais separados de um osciloscópio digital (mod. TDS-360, Tektronix Inc., Beaverton, OR, EUA).

3.5 VARIÁVEIS E PARÂMETROS DETERMINADOS E ESTIMADOS

3.5.1 Dimensões celulares

O comprimento e a largura das células foram estimados com uma escala graduada posicionada no monitor de vídeo. Tal escala foi calibrada por meio da projeção de uma graticula padrão (resolução de 10 μ m, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) na tela do monitor de vídeo. Após a calibração, a escala graduada possibilitou medidas com resolução de 1 μ m.

3.5.2 Amplitude de contrações

O encurtamento celular de pico (amplitude de contrações evocadas por estimulação elétrica) foi determinado pela mensuração quadro-a-quadro do comprimento celular, a partir dos vídeos gravados durante os experimentos. O comprimento celular mínimo (i.e., no pico da contração) foi expresso como porcentagem do comprimento celular diastólico (CD). Para cada célula, tomou-se o valor médio de 3 contrações sucessivas em cada condição experimental.

3.5.3 Campo elétrico limiar (E_T)

Selecionava-se uma célula cujo eixo maior estivesse alinhado paralelamente à direção do campo. A seguir, ajustava-se o volume da solução na câmara e realizava-se estimulação elétrica supralimiar de baixa intensidade com o EBP para produção de atividade contrátil cíclica. A amplitude do estímulo era então reduzida progressivamente até o desaparecimento da atividade contrátil. O valor da amplitude do estímulo que cessava a resposta à estimulação elétrica foi utilizado para o cálculo de E_T , como indicado em 3.4.1.

3.5.4 Máxima variação do potencial de membrana (ΔV_{max})

Para o cálculo de ΔV_{max} , foi utilizado o modelo proposto por Klee & Plonsey (1976), o qual assume a geometria de um esferoide prolato para o cardiomiócito (Bassani *et al.*, 2006;

Gomes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008). Tal modelo nos permite inferir sobre o ΔV_{\max} a partir do valor de E aplicado e das dimensões celulares:

$$\Delta V_{\max}(E, \theta, a, c) = E(a^2 A^2 \sin^2 \theta + c^2 C^2 \cos^2 \theta)^{1/2} \quad [3.2]$$

onde **E** é o campo elétrico aplicado, **a** e **c** são, respectivamente, a metade da dimensão do eixo menor da célula (2a) e do eixo maior da célula (2c), θ é o ângulo entre a direção de E e 2c, **A** e **C** são parâmetros geométricos:

$$A = \left\{ 1 - 0,5 \epsilon^{-2} - \left[0,25(1 - \epsilon^2) \ln \frac{(1-\epsilon)}{(1+\epsilon)} \right] \epsilon^{-3} \right\}^{-1} \quad [3.3]$$

$$C = \left\{ \epsilon^{-2} - \left[0,5(1 - \epsilon^2) \ln \frac{(1-\epsilon)}{(1+\epsilon)} \right] \epsilon^{-3} \right\}^{-1} \quad [3.4]$$

$$\epsilon = \left(1 - \frac{a^2}{c^2} \right)^{1/2} \quad [3.5]$$

No presente trabalho foram utilizadas apenas células cujo eixo maior era paralelo à direção do E aplicado ($\theta = 0$). Assim ΔV_{\max} pode ser obtido por:

$$\Delta V_{\max} = E \cdot c \cdot C \quad [3.6]$$

3.5.5 Tempo de recuperação após choque de alta intensidade

Quando o estímulo de alta intensidade não promovia a morte celular, na maioria das vezes, a célula tornava-se espontânea (i.e., apresentava contrações espontâneas) e inexcitável. Nestes casos, foi aguardado o período necessário para recuperação da quiescência e excitabilidade, antes de se prosseguir com o protocolo experimental (tempo de recuperação, contado a partir do instante da aplicação do choque de alta intensidade até o cessamento da atividade espontânea e o retorno da resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade). Como as células frequentemente resistiam a mais de um choque, e o tempo de recuperação tendeu a se prolongar após choques de maior intensidade, foi considerada a média do tempo de recuperação de todos os choques não letais.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.6.1 Protocolo padrão

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do CEB/UNICAMP, em temperatura ambiente (24 ± 2 °C).

Uma vez determinado o E_T , a célula foi estimulada com pulsos de baixa intensidade (20% superior ao E_T) por meio do EBP, por 1-2 min. Nestas condições, iniciava-se a gravação de vídeo. Após 10 contrações, o EAP era selecionado via comutador, e aplicava-se um único

pulso de alta intensidade (ajustada como um fator de E_T , que variou entre 8 e 40). A seguir, cessava-se a estimulação elétrica e observava-se o comportamento da célula. Havia duas possibilidades: morte celular ou recuperação. No presente trabalho, a primeira foi identificada pelo desenvolvimento de hipercontratura irreversível, inexcitabilidade irreversível e perda da integridade física da membrana e da organização intracelular (Oliveira *et al.*, 2008). Nos casos de sobrevivência ao choque, era comum o desenvolvimento de contrações espontâneas e falha de resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade. Aguardava-se então um período de recuperação (ver 3.5.5), que variou de 1 a 30 min, dependendo da reação da célula.

Após recuperação da excitabilidade celular, o procedimento até aqui descrito era repetido, entretanto com a aplicação de um pulso do EAP com intensidade maior que aquela do pulso anterior, e assim sucessivamente. O protocolo era encerrado quando a morte celular era constatada. Apenas uma célula foi estudada em cada câmara. Ao final do experimento, as células remanescentes na câmara de perfusão eram desprezadas.

3.6.2 Estimulação β -adrenérgica

O protocolo padrão foi aplicado na presença de 10 nM ISO, um agonista de adrenocéptores β que não apresenta seletividade para diferentes subtipos do receptor (Lands *et al.*, 1967b). As células foram expostas a ISO por 2 min antes do início do protocolo.

3.6.3 Redução da mobilização de Ca^{2+} durante a estimulação β -adrenérgica

O objetivo deste protocolo foi minimizar o aumento da mobilização de Ca^{2+} que ocorre na célula em resposta à estimulação β -adrenérgica (Bassani *et al.*, 1995; Bers, 2001). Para tal, o protocolo padrão foi modificado: a) não foi aplicada estimulação elétrica de baixa intensidade previamente à aplicação do pulso de alta intensidade; b) antes do protocolo, as células eram perfundidas por aproximadamente 30 s com 10 mM cafeína dissolvida em Tyr sem $CaCl_2$, com o objetivo de depletar o RS de sua carga de Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1992, 1993). Em seguida à perfusão com cafeína, era feita perfusão por 1 min com Tyr, e então, por mais 2 min com Tyr contendo ou não 10 nM ISO. O volume da solução era acertado e só então o pulso de alta intensidade era aplicado. Como descrito no protocolo padrão, nestes experimentos e nos demais citados a seguir, efetuou-se o aumento progressivo da amplitude do choque de alta intensidade até ocorrência da morte da célula em estudo.

3.6.4 Bloqueio dos receptores adrenérgicos β_1

O protocolo padrão foi aplicado na presença de 150 nM MET, um antagonista competitivo de adrenoceptores do subtipo β_1 (Minneman *et al.*, 1979). As células foram expostas a MET por 15 min antes do início da aplicação de choques de alta intensidade. A seguir, as células foram expostas a MET por mais 2 min, na presença ou ausência de 10 nM ISO, como descrito em 3.6.2.

3.6.5 Inibição da PKA

As células foram pré-incubadas por 20 min com 10 μ M H-89, um inibidor seletivo da PKA (Chijiwa *et al.*, 1990). Em alguns experimentos, 10 nM ISO foram adicionados à solução de perfusão, como descrito em 3.6.2. Foram, portanto, realizados experimentos na presença e ausência de ISO.

3.6.6 Inibição da PKC

As células foram incubadas por 20 min com Tyr contendo 500 nM BIS I, inibidor seletivo da PKC (Toullec *et al.*, 1991). A seguir, realizou-se 2 min de perfusão com Tyr contendo ou não 10 nM ISO, na presença de BIS I, sendo então aplicado o protocolo padrão.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente as células utilizadas em cada grupo experimental a ser comparado foram confrontadas quanto a 4 variáveis: E_T , ΔV_{\max} limiar (ΔV_T , i.e., ΔV_{\max} induzida por E_T), 2c e 2a. Foram aplicados 3 testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk), e assumiu-se que a distribuição poderia ser considerada como normal se este fosse o resultado de, pelo menos, 2 dos testes. A mesma estratégia foi utilizada para a variável % de CD nos grupos em que se comparou encurtamento celular antes e após um dado tratamento.

Quando foram comparados 2 grupos, utilizou-se teste t de Student (com correção de Welch, no caso de amostras não homocedásticas) ou Mann-Whitney. Na comparação de 3 grupos, foi utilizada análise de variância monofatorial, ou análise de Kruskal-Wallis, caso não fosse confirmada a distribuição normal das amostras sob comparação. Para determinar se um dado tratamento alterou a amplitude de contração das células, foi realizado um teste t de Student para amostras pareadas ou teste de Wilcoxon, caso uma das amostras sob comparação não apresentasse distribuição normal. O tempo de recuperação das células foi comparado por análise de variância bifatorial e teste *post-hoc* de Bonferroni.

Para cada grupo experimental, utilizou-se o máximo valor subletal e mínimo valor letal de E de cada célula para a determinação da função que relaciona a probabilidade de letalidade à amplitude de E (análise de sobrevivência, Kleinbaum, 1996). Uma relação semelhante foi obtida utilizando-se os valores de ΔV_{\max} correspondentes aos valores de E aplicados para a obtenção da relação descrita acima. A análise de sobrevivência gera uma tabela de probabilidade de letalidade, que contém as probabilidades médias e os respectivos valores de erro-padrão (EPM) associados a cada valor de E ou de ΔV_{\max} (curva de letalidade). As curvas obtidas de células de diferentes grupos foram comparadas pelo teste de Mantel-Cox (Mantel, 1966).

Aos pontos das curvas de letalidade, foi ajustada uma função sigmoide (equação 3.7), o que permitiu a definição dos parâmetros EL50 e ΔV_{50} (valor de E ou de ΔV_{\max} associado a uma probabilidade de letalidade de 0,5) bem como do coeficiente de Hill (n) de cada curva.

$$F(x) = \frac{1}{1 + \left(\frac{L50}{x}\right)^n} \quad [3.7]$$

onde **F(x)** é a probabilidade de letalidade, **L50** é o módulo de EL50 ou ΔV_{50} , e **n** é o coeficiente de Hill. Observe que, nesta função, os valores mínimo e máximo de F(x) foram considerados constantes e iguais a zero e 1, respectivamente. Em todos os casos, esta função resultou num ajuste adequado aos pontos ($R^2 > 0,92$).

Os resultados estão apresentados como média acompanhada do EPM, ou, para EL50, ΔV_{50} e n, do intervalo de confiança para 95% (IC95). No caso destes parâmetros, no entanto, esta apresentação tem função descritiva, já que o teste adequado para comparação das curvas é o de Mantel-Cox, mencionado anteriormente. Considerou-se a ocorrência de significância estatística quando $p < 0,05$. Todos os testes e cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA

Foram utilizadas 23 células no grupo controle (i.e., não exposto a qualquer tratamento farmacológico) e 10 no grupo ISO (tratamento com 10 nM ISO). A Tabela 4.1 apresenta os valores de E_T , ΔV_T , 2c e 2a nestes grupos, obtidos antes do tratamento farmacológico. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,752$ para E_T ; $p = 0,433$ para ΔV_T ; $p = 0,174$ para 2c e $p = 0,559$ para 2a; teste t de Student).

Tabela 4.1 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) em miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23) e tratados posteriormente com 10 nM isoproterenol (ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (teste t de Student).

	Grupos	
	Controle (N = 23)	ISO (N = 10)
E_T (V/cm)	3,33 \pm 0,07	3,38 \pm 0,06
ΔV_T (mV)	24,5 \pm 0,6	23,7 \pm 0,8
2c (μ m)	115 \pm 3	108 \pm 3
2a (μ m)	22,4 \pm 0,8	23,2 \pm 1,1

ISO é um agonista β -adrenérgico, de modo que sua ação é capaz de evocar um efeito inotrópico positivo em células cardíacas (Bers, 2001; Ricardo *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2007; Penna & Bassani, 2010; Boer *et al.*, 2011). Como esperado, a exposição dos cardiomiócitos a 10 nM ISO (cerca do dobro da concentração requerida para produção de 50% da resposta inotrópica máxima em miócitos ventriculares de rato; Penna & Bassani, 2010) produziu um aumento de cerca de 70% na amplitude das contrações a 0,5 Hz, de 7,2 \pm 1,6 para 12,1 \pm 1,5 % de CD ($p < 0,001$; N = 10; teste t de Student para amostras pareadas; Figura 4.1).

Na Figura 4.2, pode-se observar que a curva de letalidade de células tratadas com 10 nM ISO apresentou um marcante deslocamento para a direita, tanto em função de E (Figura 4.2A), quanto em função de ΔV_{max} (Figura 4.2B). O teste de Mantel-Cox revelou diferença significativa entre as curvas dos grupos controle e ISO ($p < 0,001$ e 0,013 para E e ΔV_{max} , respectivamente). Os valores de EL50, ΔV_{50} e n estão apresentados na Tabela 4.2. Esses resultados permitem concluir que ISO parece ter conferido às células maior resistência ao efeito letal de E de alta intensidade.

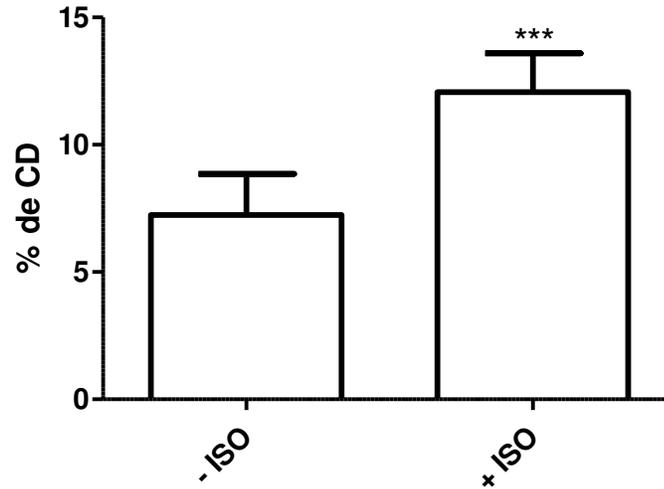


Figura 4.1 – Encurtamento celular de pico desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato em resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade a 0,5 Hz, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 10. Há diferença significativa entre os grupos (***) $p < 0,001$; teste t de Student para amostras pareadas).

Tabela 4.2 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.2). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23) e expostas a 10 nM isoproterenol (ISO; N = 10). IC95: intervalo de confiança para 95%.

	Grupos			
	Controle		ISO	
	Média	IC95	Média	IC95
EL50 (V/cm)	85,1	84,1 a 86,2	99,9	98,4 a 101,3
n	20,92	15,35 a 26,49	14,59	11,93 a 17,26
R ²		0,97		0,99
ΔV_{50} (mV)	613	609 a 617	728	699 a 757
n	11,58	10,52 a 12,63	9,32	6,03 a 12,60
R ²		0,99		0,93

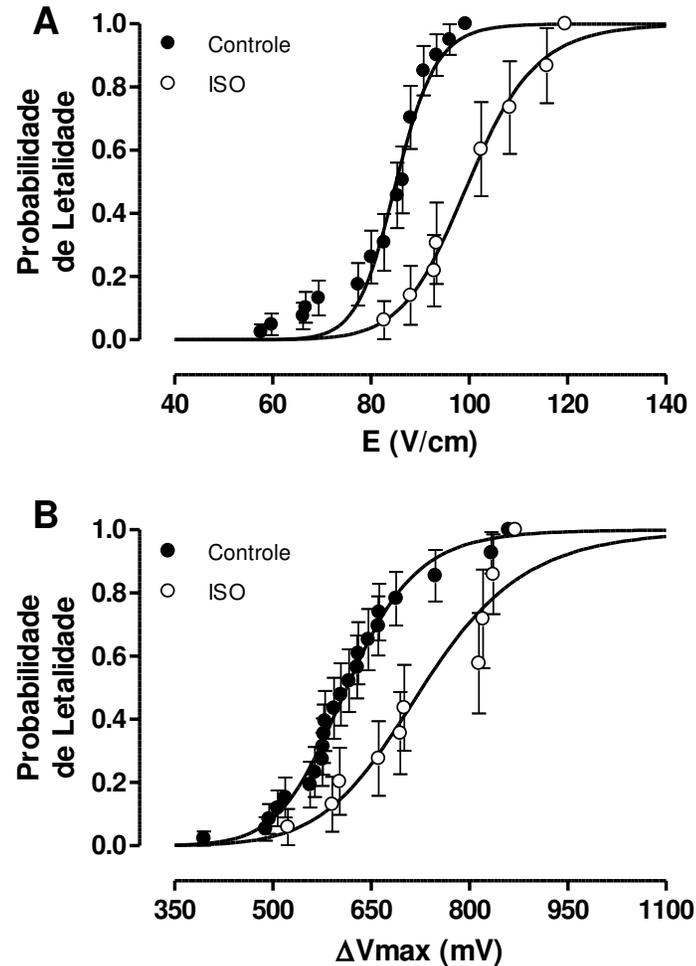


Figura 4.2 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato tratados com 10 nM isoproterenol (ISO) e células não expostas ao fármaco (controle). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.2. Há diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$ painel A, $p = 0,013$ painel B; teste de Mantel-Cox).

4.2 BLOQUEIO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS β_1

Neste protocolo, além do grupo controle utilizado em todas as comparações, foram utilizadas 10 células tratadas com MET e 10 células tratadas com MET + ISO. A análise de variância monofatorial não indicou diferença significativa entre os grupos quanto a E_T ($p = 0,085$), ΔV_T ($p = 0,128$), $2c$ ($p = 0,972$) e $2a$ ($p = 0,552$), determinados antes do tratamento farmacológico (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) em miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados com 150 nM metoprolol (MET; N = 10), e com 150 nM metoprolol e posteriormente 10 nM isoproterenol (MET + ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial).

	Grupos		
	Controle (N = 23)	MET (N = 10)	MET + ISO (N = 10)
E_T (V/cm)	3,33 \pm 0,07	3,55 \pm 0,07	3,52 \pm 0,05
ΔV_T (mV)	24,5 \pm 0,6	26,1 \pm 0,8	26,2 \pm 0,5
2c (μ m)	115 \pm 3	115 \pm 4	116 \pm 2
2a (μ m)	22,4 \pm 0,8	22,5 \pm 1,3	23,9 \pm 1,0

ISO é um agonista β -adrenérgico não seletivo (Lands *et al.*, 1967b). Por outro lado, adrenoceptores beta dos subtipos 1, 2 e 3 são expressos no ventrículo de mamífero, sendo o primeiro subtipo o mais abundante e amplamente responsável pela mediação do efeito inotrópico positivo (Steinberg, 1999; Penna & Bassani, 2010; Boer *et al.*, 2011). Foi utilizado MET, um antagonista seletivo dos receptores adrenérgicos β_1 (Minneman *et al.*, 1979), para investigar se o efeito do ISO sobre a sensibilidade a campos elétricos de alta intensidade é decorrente da ativação de receptores adrenérgicos deste subtipo.

O tratamento com 150 nM MET (concentração 75 vezes a constante de dissociação aparente do antagonista em miócitos ventriculares de rato para inibição do efeito inotrópico do ISO; Penna & Bassani, 2010) aboliu o aumento significativo do encurtamento celular de pico em resposta ao ISO (de 8,6 \pm 1,5 na ausência de fármacos para 9,0 \pm 1,6% de CD na presença de MET + ISO; N = 10; p = 0,38; teste t de Student para amostras pareadas). Este resultado mostra que MET, nesta concentração, é capaz de antagonizar efetivamente o efeito inotrópico positivo de 10 nM ISO, o que confirma que o subtipo β_1 é o subtipo de adrenoceptores β majoritariamente envolvido na mediação da estimulação inotrópica por este agonista.

Como mostrado na Figura 4.4, o tratamento com MET isoladamente não modificou as curvas de letalidade. No entanto, quando os miócitos foram tratados com ISO na presença de MET, o desvio à direita da curva de letalidade, observado anteriormente, não ocorreu (p = 0,254 e 0,938 para E e ΔV_{max} , respectivamente; teste de Mantel-Cox para comparação entre os 3 grupos). Os parâmetros das curvas de letalidade estão apresentados na Tabela 4.4. Este resultado indica que o efeito protetor do ISO sobre a morte celular induzida por campos elétricos de alta intensidade é mediado pela ativação de receptores adrenérgicos β_1 .

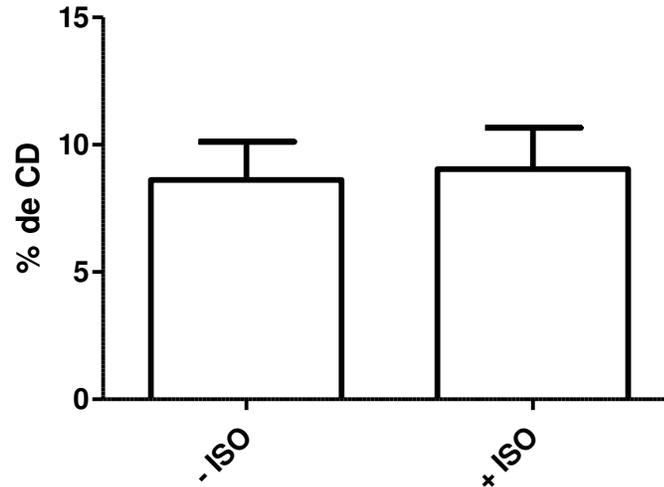


Figura 4.3 – Encurtamento celular de pico desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato, tratados com 150 nM metoprolol, em resposta à estimulação elétrica de baixa intensidade a 0,5 Hz, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 10. Não há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,38$; teste t de Student para amostras pareadas).

Tabela 4.4 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.4). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23), expostas a 150 nM metoprolol apenas (MET; N = 10), e a 10 nM isoproterenol na presença do antagonista (MET + ISO; N = 10). IC95: intervalo de confiança para 95%.

	Grupos					
	Controle		MET		MET + ISO	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
EL50 (V/cm)	85,1	84,1 a 86,2	85,8	81,1 a 90,6	84,9	82,1 a 87,7
n	20,92	15,35 a 26,49	8,69	4,88 a 12,50	12,24	7,28 a 17,20
R ²		0,97		0,94		0,97
ΔV_{50} (mV)	613	609 a 617	627	613 a 641	642	627 a 657
n	11,58	10,52 a 12,63	12,31	8,44 a 16,17	13,40	8,85 a 17,95
R ²		0,99		0,97		0,96

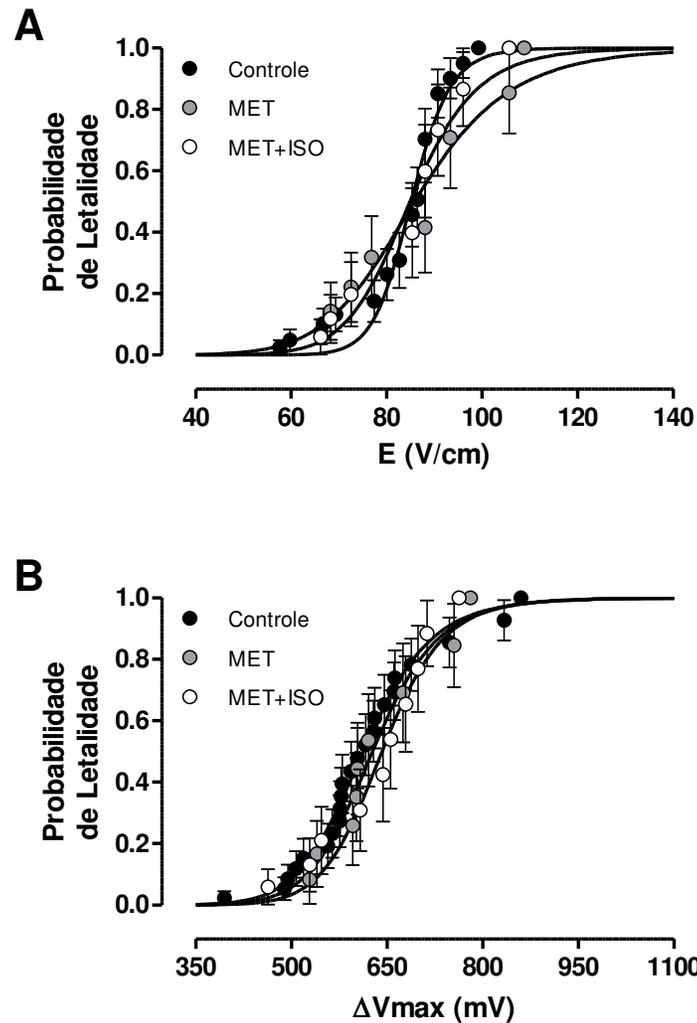


Figura 4.4 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato na ausência de fármacos (controle), tratados apenas com 150 nM metoprolol (MET), e tratados com o antagonista e 10 nM isoproterenol (MET + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.4. Não há diferença significativa entre os 3 grupos ($p = 0,254$ painel A, $p = 0,938$ painel B; teste de Mantel-Cox).

4.3 REDUÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE Ca^{2+} DURANTE A ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA

Neste protocolo, foram utilizadas 11 células não expostas ao ISO (grupo minCa^{2+}) e 11 tratadas com 10 nM ISO (grupo $\text{minCa}^{2+} + \text{ISO}$), cujos resultados foram comparados com o grupo controle. A análise de variância monofatorial não mostrou diferença significativa entre os grupos para E_T ($p = 0,613$), ΔV_T ($p = 0,794$), e $2c$ ($p = 0,956$). De modo semelhante, a análise de Kruskal-Wallis não indicou diferença significativa de $2a$ ($p = 0,690$).

Tabela 4.5 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato sob condições controle (controle; N = 23), e submetidos ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados (minCa²⁺ + ISO; N = 11) ou não (minCa²⁺; N = 11) com 10 nM isoproterenol. Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Os valores foram obtidos antes do tratamento experimental.

	Grupos		
	Controle (N = 23)	minCa ²⁺ (N = 11)	minCa ²⁺ + ISO (N = 11)
E_T (V/cm)	3,33 \pm 0,07	3,28 \pm 0,09	3,29 \pm 0,05
ΔV_T (mV)	24,5 \pm 0,6	24,8 \pm 0,9	24,7 \pm 0,6
2c (μ m)	115 \pm 3	117 \pm 3	116 \pm 3
2a (μ m)	22,4 \pm 0,8	23,8 \pm 0,8	23,8 \pm 1,4

Como visto em 4.1, 10 nM de ISO são capazes de produzir um efeito inotrópico significativo em miócitos ventriculares, o qual é dependente do aumento da amplitude da variação sistólica da concentração citosólica de Ca^{2+} (Bers, 2001; Soriano *et al.*, 2007). Para determinar se o efeito protetor do ISO estaria associado ao aumento da mobilização celular de Ca^{2+} , procedeu-se à depleção dos estoques do íon contidos no RS, que constitui a principal fonte de Ca^{2+} ativador da contração em mamíferos (Delbridge *et al.*, 1996; Bers, 2001); e que é aumentado pelo tratamento com ISO (Ginsburg & Bers, 2004). Além disso, não foi aplicada a estimulação elétrica previamente ao choque de alta intensidade, a qual evoca ciclicamente a corrente de Ca^{2+} através do sarcolema. Esta, também estimulada por ISO (Ginsburg & Bers, 2004), eleva a disponibilidade de Ca^{2+} para o RS (Bassani *et al.*, 2004). Com esses procedimentos, buscou-se reduzir o nível de estimulação de mecanismos dependentes de Ca^{2+} que pudessem estar envolvidos no processo de reparo das lesões de membrana induzidas pelo choque de alta intensidade.

Este procedimento experimental não afetou a curva de letalidade, e nem impediu que o tratamento com ISO aumentasse a resistência das células ao efeito deletério do E de alta intensidade ($p = 0,004$ e $0,015$ para as curvas em função de E e ΔV_{max} , respectivamente; teste de Mantel-Cox para comparação dos grupos controle, minCa²⁺ e minCa²⁺ + ISO). Como se pode observar na Tabela 4.6 e na Figura 4.5, a diferença detectada entre os grupos foi causada pelo desvio à esquerda da curva do grupo minCa²⁺ + ISO.

Tabela 4.6 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.5). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células sob condições controle (controle; N = 23), e submetidas ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados ($minCa^{2+}$ + ISO; N = 11) ou não ($minCa^{2+}$; N = 11) com 10 nM isoproterenol. IC95: intervalo de confiança para 95%.

	Grupos					
	Controle		$minCa^{2+}$		$minCa^{2+}$ + ISO	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
EL50 (V/cm)	85,1	84,1 a 86,2	79,1	76,2 a 82,1	94,8	92,7 a 96,9
n	20,92	15,35 a 26,49	10,61	6,90 a 14,32	11,68	8,16 a 15,20
R ²		0,97		0,95		0,98
ΔV_{50} (mV)	613	609 a 617	615	597 a 634	730	719 a 741
n	11,58	10,52 a 12,63	11,13	7,25 a 15,01	13,14	9,78 a 16,51
R ²		0,99		0,95		0,97

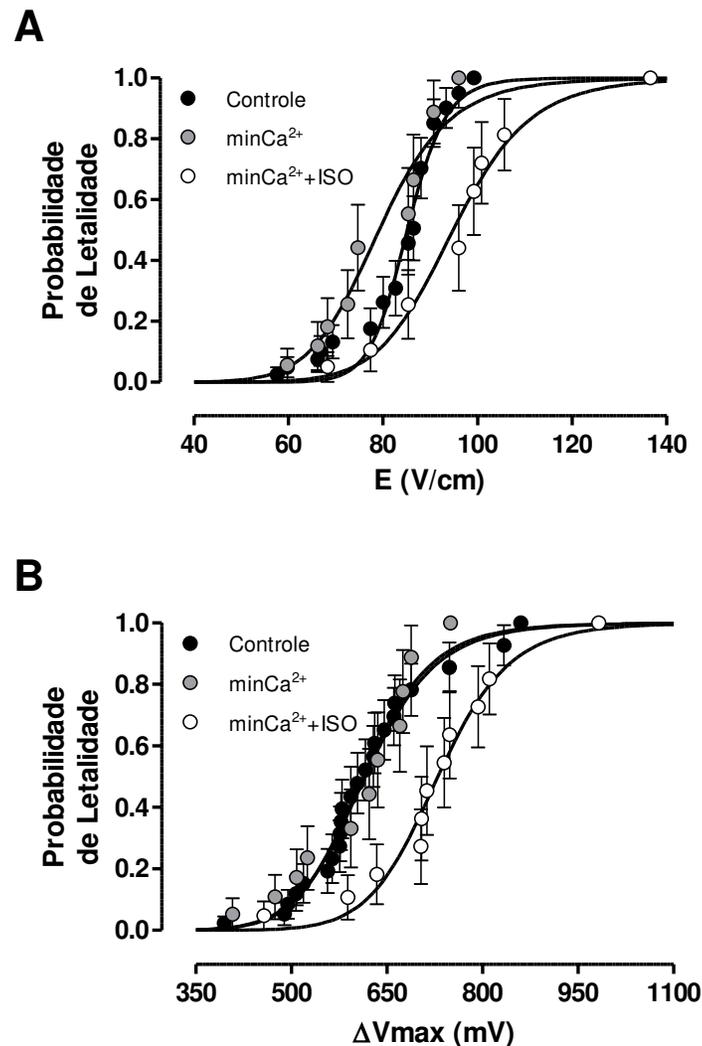


Figura 4.5 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato sob condições controle (controle; $N = 23$), e submetidas ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} , tratados ($\text{minCa}^{2+} + \text{ISO}$; $N = 11$) ou não (minCa^{2+} ; $N = 11$) com 10 nM isoproterenol. Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.6. Há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,004$ painel A, $p = 0,015$ painel B; teste de Mantel-Cox para comparação entre os 3 grupos).

4.4 INIBIÇÃO DA PKA

Neste protocolo, utilizou-se 9 células no grupo H-89 e 8 no grupo H-89 + ISO. Os valores de E_T ($p = 0,602$), ΔV_T ($p = 0,974$), $2c$ ($p = 0,443$) e $2a$ ($p = 0,314$), obtidos antes do tratamento farmacológico (Tabela 3.7), não foram estatisticamente diferentes (análise de variância monofatorial).

Tabela 4.7 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados com 10 μ M H-89 (H-89; N = 9) e miócitos tratados com 10 μ M H-89 e posteriormente 10 nM isoproterenol (H-89 + ISO; N = 8). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial).

	Grupos		
	Controle (N = 23)	H-89 (N = 9)	H-89 + ISO (N = 8)
E_T (V/cm)	3,33 \pm 0,07	3,30 \pm 0,13	3,47 \pm 0,15
ΔV_T (mV)	24,5 \pm 0,6	24,3 \pm 0,9	24,5 \pm 0,9
2c (μ m)	115 \pm 3	115 \pm 2	109 \pm 3
2a (μ m)	22,4 \pm 0,8	22,0 \pm 2,0	25,1 \pm 1,9

Como é amplamente aceito que os efeitos inotrópico e lusitrópico da ativação de adrenoceptores β_1 são mediados apenas pela via cAMP-PKA (Steinberg, 1999; Xiang, 2011), procedeu-se a exposição de miócitos ao ISO após tratamento com H-89, um conhecido inibidor da PKA (Chijiwa *et al.*, 1990), com o objetivo de investigar se a PKA estaria envolvida no efeito protetor do ISO.

Como esperado, o tratamento com 10 μ M H-89 impediu o aumento do encurtamento celular de pico em resposta ao ISO (de 6,8 \pm 2,0 na ausência de fármacos para 8,0 \pm 1,7% de CD na presença de H-89 + ISO; N = 8; p = 0,64; teste de Wilcoxon; Figura 4.6). Este resultado mostra que H-89, nesta concentração, é capaz de inibir efetivamente o efeito inotrópico positivo da ativação β -adrenérgica por 10 nM ISO mediada pela via cAMP-PKA.

As curvas de letalidade estão ilustradas na Figura 4.7, e os parâmetros estão apresentados na Tabela 4.8. Como se pode observar, as curvas obtidas em células tratadas apenas com H-89 foram semelhantes às aquelas obtidas no grupo controle. No entanto, ISO, após tratamento com H-89, não produziu o desvio à direita observado na ausência do inibidor (p = 0,218 e 0,941 para as curvas em função de E e ΔV_{max} , respectivamente; teste de Mantel-Cox para comparação dos grupos controle, H-89 e H-89 + ISO). Este resultado mostra que a inibição de PKA *per se* não altera a resposta das células ao E de alta intensidade, mas é capaz de abolir a resposta protetora advinda da estimulação β -adrenérgica, implicando fortemente na participação da PKA na produção deste efeito.

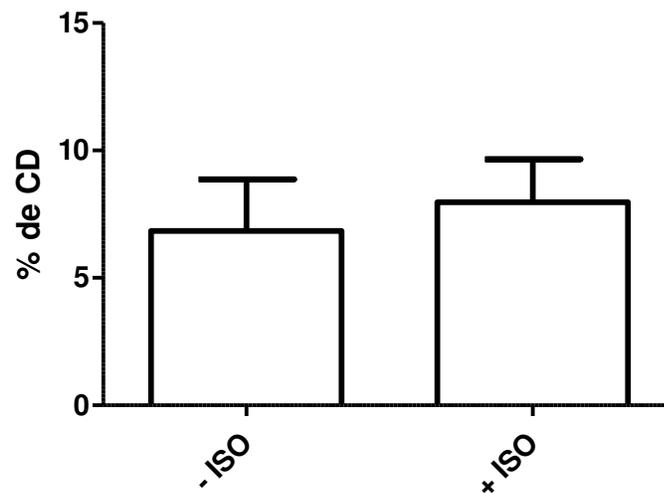


Figura 4.6 – Encurtamento celular de pico, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato estimulados eletricamente a 0,5 Hz, antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 10 μ M H-89 e 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 8. Não há diferença significativa entre os grupos ($p = 0,64$; teste de Wilcoxon).

Tabela 4.8 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.7). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; N = 23), expostas a 10 μ M H-89 (H-89; N = 9), e a 10 nM isoproterenol na presença do inibidor (H-89 + ISO; N = 8). IC95: intervalo de confiança para 95%.

	Grupos					
	Controle		H-89		H-89 + ISO	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
EL50 (V/cm)	85,1	84,1 a 86,2	83,7	82,0 a 85,4	87,2	85,2 a 89,2
n	20,92	15,35 a 26,49	11,68	8,85 a 14,51	13,72	9,50 a 17,94
R ²		0,97		0,97		0,98
ΔV_{50} (mV)	613	609 a 617	618	601 a 634	638	622 a 654
n	11,58	10,52 a 12,63	10,00	6,81 a 13,20	18,29	8,67 a 27,92
R ²		0,99		0,96		0,93

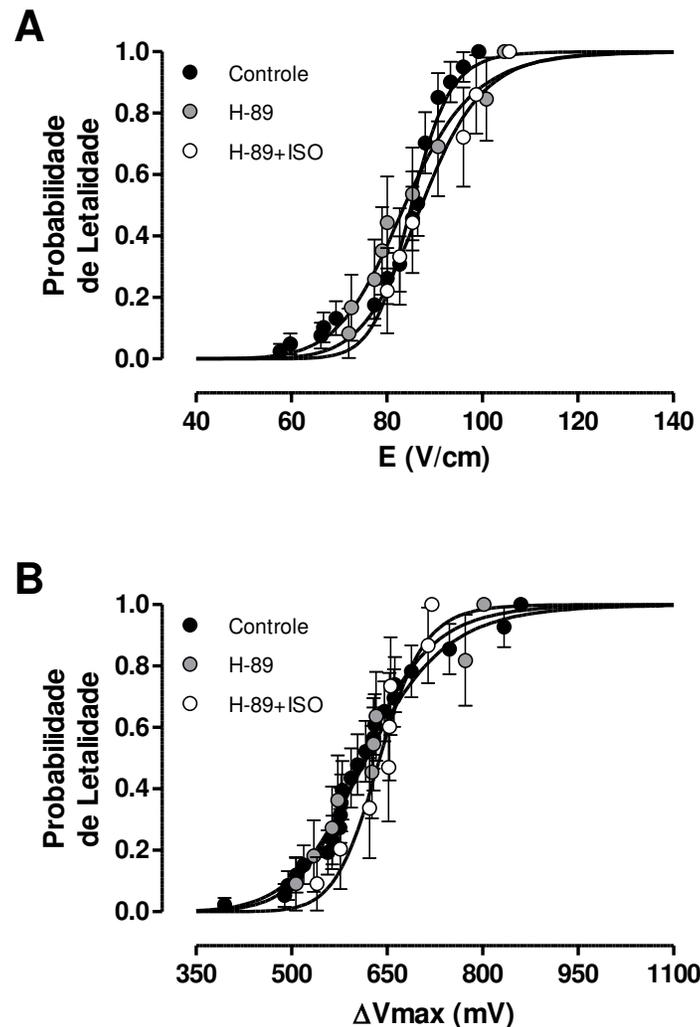


Figura 4.7 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato sob condições controle (controle), tratados com 10 μM H-89 (H-89) e com 10 nM isoproterenol na presença de H-89 (H-89 + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.8. Não há diferença significativa entre os 3 grupos ($p = 0,218$ painel A, $p = 0,941$ painel B; teste de Mantel-Cox).

4.5 INIBIÇÃO DA PKC

Neste protocolo, utilizou-se 10 células em ambos os grupos BIS I e BIS I + ISO. Como observado na Tabela 4.9, os valores de E_T ($p = 0,364$), ΔV_T ($p = 0,246$), $2c$ ($p = 0,683$) e $2a$ ($p = 0,677$), obtidos antes do tratamento farmacológico, foram comparáveis entre os grupos, como concluído a partir dos resultados da análise de variância monofatorial.

Tabela 4.9 – Valores (média \pm erro padrão) de campo limiar (E_T) e máxima variação estimada do potencial de membrana gerada por este valor de campo (ΔV_T) nos grupos de miócitos ventriculares de rato não expostos a fármacos (controle; N = 23), miócitos tratados apenas com 500 nM BIS I (BIS I; N = 10), e com 10 nM isoproterenol na presença deste inibidor (BIS I + ISO; N = 10). Estão apresentados ainda o comprimento (2c) e largura (2a) dessas células. Não houve diferença significativa entre os grupos para qualquer dessas variáveis (análise de variância monofatorial).

	Grupos		
	Controle (N = 23)	BIS I (N = 10)	BIS I + ISO (N = 10)
E_T (V/cm)	3,33 \pm 0,07	3,23 \pm 0,10	3,16 \pm 0,08
ΔV_T (mV)	24,5 \pm 0,6	22,8 \pm 0,8	23,1 \pm 1,3
2c (μ m)	115 \pm 3	110 \pm 6	114 \pm 5
2a (μ m)	22,4 \pm 0,8	23,6 \pm 1,2	22,9 \pm 0,8

Para investigar se a PKC estaria envolvida indiretamente no efeito do ISO observado no presente trabalho, utilizou-se o tratamento com seu inibidor BIS I, na concentração de 500 nM, a qual deve ser suficiente para garantir a inibição da PKC ($K_i = 14 \pm 3$ nM), mas não de outras quinases (Toullec *et al.*, 1991). O tratamento com BIS nesta concentração não impediu o aumento do encurtamento celular de pico em resposta ao ISO (de $9,6 \pm 1,3$ na ausência de fármacos para $15,3 \pm 1,1\%$ de CD na presença de BIS I + ISO; N = 10; $p < 0,01$; teste t de Student para amostras pareadas; Figura 4.8).

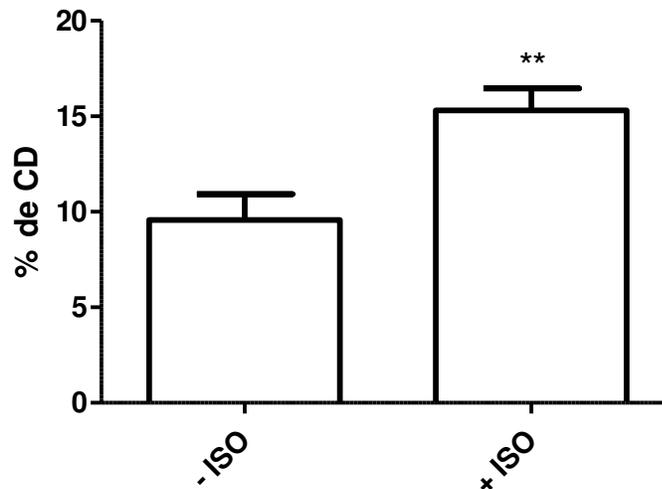


Figura 4.8 – Encurtamento celular de pico, expresso como porcentagem do comprimento diastólico (CD), desenvolvido por miócitos cardíacos isolados de rato estimulados eletricamente a 0,5 Hz, antes (- ISO) e após (+ ISO) o tratamento com 500 nM BIS I e 10 nM isoproterenol. Estão apresentados os valores de média (colunas) e erro-padrão (linhas). N = 10. Há diferença significativa entre os grupos (** $p < 0,01$; teste t de Student para amostras pareadas).

As curvas de letalidade determinadas em células tratadas com 10 nM de ISO após o tratamento com 500 nM de BIS I mostraram-se deslocadas para a direita em relação às determinadas na presença apenas de BIS I e no grupo controle, enquanto que estas últimas foram comparáveis entre si (Figura 4.9; parâmetros apresentados na Tabela 4.10). O teste de Mantel-Cox revelou diferença significativa entre os 3 grupos para as curvas em função de E ($p < 0,001$) e de ΔV_{\max} ($p = 0,004$).

Tabela 4.10 – Valores de campo elétrico (EL50) e da máxima variação estimada do potencial transmembrana (ΔV_{50}) associados à probabilidade de letalidade de 0,5 em miócitos ventriculares isolados de rato, determinados por regressão não linear aplicada aos pontos da curva de letalidade (Figura 4.9). Estão ainda apresentados os valores do coeficiente de Hill (n) das curvas obtidas em células não exposta a fármacos (controle; $N = 23$), expostas apenas a 500 nM BIS I (BIS I; $N = 10$) e expostas a 10 nM isoproterenol na presença do inibidor (BIS I + ISO; $N = 10$). IC95: intervalo de confiança para 95%.

	Grupos					
	Controle		BIS I		BIS I + ISO	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
EL50 (V/cm)	85,1	84,1 a 86,2	86,5	84,7 a 88,2	100,6	99,8 a 101,4
n	20,92	15,35 a 26,49	14,33	8,87 a 19,78	33,85	25,57 a 42,13
R^2		0,97		0,96		0,98
ΔV_{50} (mV)	613	609 a 617	595	590 a 602	758	731 a 784
n	11,58	10,52 a 12,63	15,47	12,73 a 18,20	9,42	6,24 a 12,60
R^2		0,99		0,98		0,94

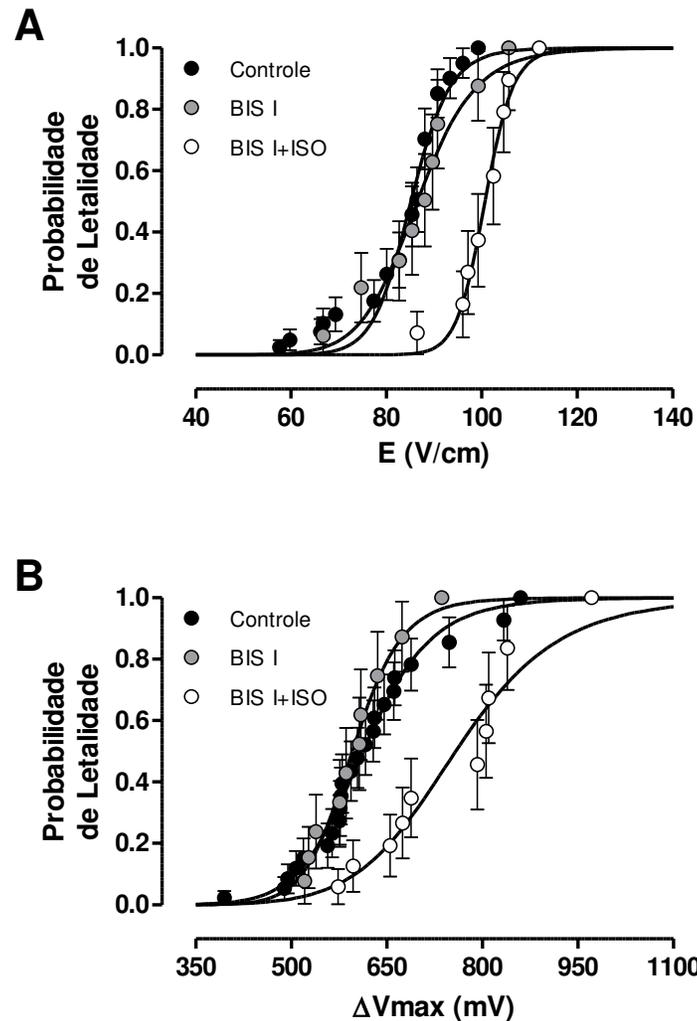


Figura 4.9 – Curvas de letalidade, que descrevem a probabilidade de ocorrência de morte celular em função do módulo do campo elétrico aplicado (E ; painel A) e da máxima variação do potencial transmembrana (ΔV_{\max} ; painel B), determinadas em miócitos ventriculares isolados de rato em condições controles (controle), tratados com 500 nM BIS I (BIS I), e com 10 nM isoproterenol após incubação com o inibidor (BIS I + ISO). Círculos representam as médias e as linhas verticais, os respectivos valores de erro padrão. Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 4.10. Há diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$ painel A, $p = 0,004$ painel B; teste de Mantel-Cox para comparação entre os 3 grupos).

4.6 TEMPO DE RECUPERAÇÃO PÓS-CHOQUE

Nos casos de choque não letal, havia desenvolvimento de atividade espontânea e redução da excitabilidade no período pós-choque, tão mais intensos quanto maior a amplitude do E aplicado. Porém, com o tempo, estes efeitos se dissipavam. O tempo médio de recuperação das células após a aplicação do E de alta intensidade foi estimado e comparado entre todos os

grupos de células utilizados (Tabela 4.11 e Figura 4.9). Os grupos são os mesmos (mesmas células) que foram descritos de 4.1 a 4.5.

A análise de variância bifatorial foi realizada levando em consideração os fatores condição experimental e tratamento com ISO. As condições experimentais em questão são a ausência de tratamento prévio com fármacos (controle), tratamento com MET, H-89 ou BIS I, ou realização do protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} . Segundo está análise, a condição experimental a que as células foram submetidas influenciou significativamente o tempo de recuperação pós-choque ($p < 0,001$). Por outro lado, o tratamento com ISO não exerceu influência significativa sobre esta variável ($p = 0,391$). Não foi detectada interação significativa entre os fatores examinados ($p = 0,730$).

Entre as condições experimentais, o tratamento com BIS I aumentou significativamente o tempo de recuperação das células (Tabela 4.11). O teste *post-hoc* de Bonferroni confirmou a significância deste efeito ($p < 0,001$), que independeu do tratamento com ISO. Além disso, observou-se que o ISO prolongou o tempo de recuperação ($p < 0,05$) apenas nas células submetidas ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} .

Tabela 4.11 – Valores (média \pm erro padrão) do tempo de recuperação pós-choque e número de células (N) nos grupos de miócitos ventriculares de rato expostos a diferentes condições experimentais: não tratado com fármacos (controle), tratado com 150 nM metoprolol (MET), 10 μM H-89 (H-89), 500 nM BIS I (BIS I), e em miócitos submetidos à redução da mobilização de Ca^{2+} (min Ca^{2+}), na ausência (- ISO) ou presença (+ ISO) de tratamento com 10 nM isoproterenol. * $p < 0,001$, † $p < 0,05$ (teste *post-hoc* de Bonferroni).

Condição experimental	Tempo de Recuperação (min)			
	- ISO		+ ISO	
	Média \pm EPM	N	Média \pm EPM	N
Controle	4,9 \pm 0,5	23	4,3 \pm 0,4	10
MET	5,7 \pm 0,5	10	4,7 \pm 0,4	10
min Ca^{2+}	6,0 \pm 0,5	11	6,4 \pm 0,6 †	11
H-89	4,8 \pm 0,4	9	5,1 \pm 0,3	8
BIS I	11,2 \pm 1,3 *	10	10,4 \pm 0,7 *	10

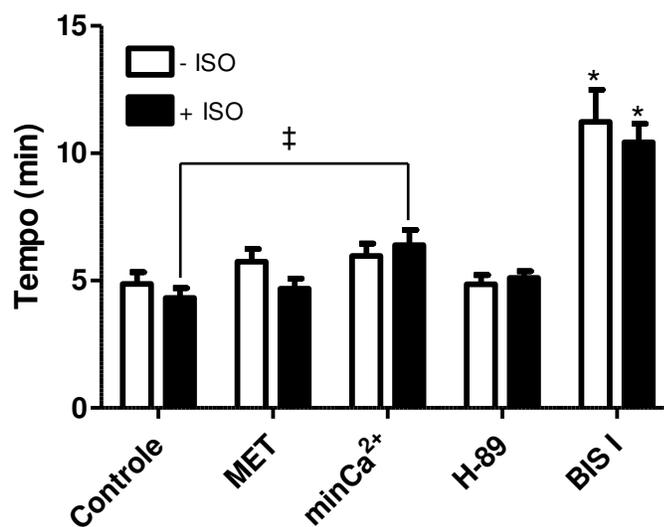


Figura 4.10 – Tempo de recuperação pós-choque de todos os grupos estudados. Colunas representam as médias e linhas os respectivos erros padrão (Tabela 11). Valores determinados em miócitos ventriculares isolados de rato expostos a diferentes condições experimentais: não tratado com fármacos (controle), tratado com 150 nM metoprolol (MET), 10 μ M H-89 (H-89), 500 nM BIS I (BIS I), e em miócitos submetidos ao protocolo para redução da mobilização de Ca^{2+} (minCa²⁺), na ausência (- ISO) ou presença (+ ISO) de tratamento com 10 nM isoproterenol. * $p < 0,001$, † $p < 0,05$ (teste *post-hoc* de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram investigados os efeitos da estimulação β -adrenérgica na letalidade de miócitos ventriculares submetidos a E de alta intensidade, como aqueles observados durante o procedimento de desfibrilação/cardioversão. Também foram investigadas as possíveis vias de sinalização envolvidas, por meio do bloqueio de receptores adrenérgicos β_1 , inibição de PKA e PKC e redução da maior mobilização de Ca^{2+} evocada pela ação de catecolaminas.

5.1 CURVAS DE LETALIDADE

Para que as curvas de letalidade sejam comparáveis, é preciso que o limiar de estimulação (E_T e ΔV_T), as dimensões celulares (2a e 2c) e a orientação (ângulo θ) das células estudadas sejam compatíveis estatisticamente. O ângulo θ é importante uma vez que o limiar de estimulação e sensibilidade ao efeito letal de E variam conforme a orientação dos miócitos cardíacos em relação a E (Tung *et al.*, 1991; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Assim sendo, neste trabalho, tomou-se o cuidado de garantir que o ângulo θ sempre fosse próximo de zero (desvio máximo de 5°). Também parece haver uma relação entre as amplitudes do E_T e o E letal (Oliveira *et al.*, 2008), bem como as dimensões celulares (2c e 2a) podem influenciar a forma como a célula responde ao E (Knisley *et al.*, 1993; Bassani *et al.*, 2006; JT Goulart, PX Oliveira, JWM Bassani e RA Bassani, resultados não publicados). Assim, como cada curva de letalidade é determinada num conjunto diferente de células, é importante que as células utilizadas em diferentes grupos sejam semelhantes quanto ao limiar de estimulação (E_T e ΔV_T) e dimensões celulares (2c e 2a), e isto foi um requerimento no presente trabalho. É interessante observar que, os valores de ΔV_T aqui estimados estiveram dentro da faixa esperada para a variação de potencial necessária para evocar um potencial de ação em cardiomiócitos (Bers, 2001; Oshiyama *et al.*, 2012).

Em todas as curvas de letalidade em função de ΔV_{max} , a morte celular só foi observada quando ΔV_{max} atingia valores acima de 300 mV. Segundo Tung (1996), a eletroporação em células cardíacas começa a ocorrer quando o V_m atinge aproximadamente ± 200 mV. Mas a eletroporação não necessariamente culmina na morte celular, para isso devem ser gerados danos extensos o bastante para que o fenômeno seja irreversível (Ivorra & Rubinsky, 2010). Assim como já descrito na literatura (Oliveira *et al.*, 2005, 2008), observamos que uma ΔV_{max} não letal (< 300 mV) é capaz de gerar danos que promovem inexcitabilidade e atividade espontânea temporárias. Assumindo um V_m de repouso da ordem de -75 mV (Bassani *et al.*, 2004; Oshiyama

ma *et al.*, 2012), começamos a observar morte celular quando V_m excede -375 mV, entretanto a probabilidade de morte é muito pequena, menor que 0,05. Vale ressaltar que o valor de ΔV_{max} é superestimado neste trabalho. Isso acontece porque o modelo de Klee & Plonsey (1976) não prevê a quebra de dielétrico da membrana resultante da eletroporação. O fluxo de íons que se estabelece pelos poros hidrofóbicos limita a variação de V_m , de modo que a ΔV_{max} real sempre será menor que a estimada pelo modelo (Neunlist & Tung, 1997; Cheek & Fast, 2004).

5.2 PROTEÇÃO CONFERIDA PELA ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA

O tratamento com 10 nM ISO foi suficiente para promover uma estimulação β -adrenérgica significativa, caracterizada por aumento substancial do encurtamento celular. Nessas condições, surgiu uma clara proteção ao efeito deletério do E, que pode ser constatado por um deslocamento das curvas de letalidade para a direita em relação ao grupo controle. O efeito protetor esteve presente tanto quando se observou os valores de E, quanto os de ΔV_{max} associados à letalidade. Assim, é provável que a estimulação β -adrenérgica seja capaz de atuar em mecanismos celulares que tornam os cardiomiócitos mais resistentes à polarização da membrana induzida por E, uma vez que ΔV_{50} foi elevado em 100 mV após tratamento com ISO.

Os mecanismos envolvidos nesta proteção podem ser associados a 3 hipóteses: alteração da fluidez da membrana, aumento da eficiência na remoção do Ca^{2+} citoplasmático e potencialização dos mecanismos de reparo da membrana. As 3 possibilidades podem ser não exclusivas, contribuindo juntas para a proteção. As vias envolvidas na proteção podem atuar em todas estas possibilidades, mas é mais provável que a primeira e a última sejam as principais causas da maior resistência celular ao E.

A fluidez de membrana afeta a eletroporação, tanto no que diz respeito à formação, quanto ao fechamento dos poros hidrofóbicos. Quanto mais fluida for a membrana, maior será a probabilidade de formação e de reversão dos poros (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Tarek, 2005; Zimmermann *et al.*, 2008; van Uiter *et al.*, 2010). A estimulação β -adrenérgica produzida pelo tratamento com ISO é capaz de elevar a fluidez da membrana, tanto de forma direta como indireta. Hirata *et al.* (1979) sugeriram que a ocupação de receptores β -adrenérgicos por ISO é capaz de ativar diretamente a metilação de fosfolípidos, aumentando a fluidez da membrana. O próprio processo de exocitose de vesículas (que pode ocorrer durante o reparo) também pode aumentar a fluidez da membrana, como mostrado em estudos utilizando pinça óptica (Togo *et al.*, 1999, 2000). Há indicação de que esta exocitose pode ser modulada pela PKA, ativada durante a estimulação β -adrenérgica (Muñiz *et al.*, 1997; Seino & Shibasaki, 2005; Skelin & Rupnik, 2011). No caso específico de células contráteis, também observamos outra forma de

redução da tensão superficial. Após um choque subletal, as células que se recuperam apresentam um encurtamento, o que pode estar associado a uma redução da tensão superficial de membrana (Rapoport, 1972, 1973).

Como a hipercontratura celular observada durante a exposição do cardiomiócitos a E de alta intensidade advém de uma sobrecarga de Ca^{2+} (Knisley & Grant, 1995; Oliveira *et al.*, 2008), aumentar a eficiência da remoção deste íon poderia garantir maior resistência às células. A remoção do Ca^{2+} citoplasmático é sabidamente aumentada pela estimulação β -adrenérgica, sendo a principal causa a estimulação da captação de Ca^{2+} pela SERCA (Bers, 2001). Entretanto, em nosso laboratório não se observou o aumento da sensibilidade das células ao E de alta intensidade após a inibição da SERCA por thapsigargin (Oliveira *et al.*, 2005). Assim, este mecanismo não parece ser capaz de explicar a proteção que encontramos.

Os mecanismos ativos de reparo, i.e., que tomam lugar quando a reversão do poro hidrofílico não ocorre de forma espontânea, são associados a processos celulares de exocitose e fusão de membranas (McNeil & Steinhardt, 2003; Schapire *et al.*, 2009; Draeger *et al.*, 2011). A estimulação β -adrenérgica é capaz de modular estes processos diretamente, via PKA, ou indiretamente, levando à ativação de PKC. Embora a via da PKA seja a única via diretamente acoplada aos adrenoceptores β (Steinberg, 1999; Xiang, 2011), há relatos que sugerem comunicação cruzada (*cross-talk*), antagônica, sinérgica e/ou sequencial, entre as vias adrenoceptor β -PKA e PKC (Guimond *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2009; Adderley *et al.*, 2010; Khaliulin *et al.*, 2010; Drosatos *et al.*, 2011), particularmente quanto ao processo de tráfico de vesículas e sua fusão com a membrana, e reparo de lesões na membrana (Shen & Steinhardt, 2005; Spaeth *et al.*, 2010; Than *et al.*, 2011).

Associar a estimulação β -adrenérgica a mecanismos de reparo de danos celulares é bastante interessante do ponto de vista evolutivo. Uma maior estimulação adrenérgica é classicamente associada a comportamentos de luta e fuga, i.e., a uma condição de preparação para se enfrentar uma situação que oferece risco a sobrevivência (Romero, 2010). Mesmo que esqueçamos danos globais ao organismo, e nos foquemos apenas no coração, nestas condições ocorre um aumento de frequência e força de contração, de modo que o coração passa a trabalhar em um regime de maior *stress* e conseqüentemente é mais sujeito a danos (Clarke *et al.*, 1995; Bers, 2001; Guyton & Hall, 2006; Romero, 2010). A demonstração de que uma via de sinalização de situação de risco e que submete naturalmente o coração a uma condição de maior susceptibilidade a danos também é capaz de tornar as células mais eficientes em reparo é algo que não surpreende, e mostra que este é um mecanismo muito conveniente.

5.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA PROTEÇÃO

Exceto pela remota possibilidade de efeito físico direto da interação do ISO com a membrana, é plausível admitir que o efeito protetor do ISO seja associado à ativação de receptores β -adrenérgicos, uma vez que já é classicamente estabelecido que ISO é um agonista seletivo aos adrenoceptores do tipo β (Lands *et al.*, 1967b). Entretanto, os 3 subtipos de adrenoceptores β estão presentes nos cardiomiócitos ventriculares de mamíferos (Carlsson *et al.*, 1972; Minneman *et al.*, 1979; Gauthier *et al.* 1996). Como os adrenoceptores do subtipo β_1 são mais abundantes no miocárdio (Carlsson *et al.*, 1972; Minneman *et al.*, 1979; Brodde, 1991) e são os mais importantes na mediação do efeito inotrópico positivo (Steinberg, 1999; Penna & Bassani, 2010; Boer *et al.*, 2011), levantou-se a hipótese de que adrenoceptores β_1 mediarão também o efeito protetor do ISO. Esta hipótese foi confirmada pela abolição deste efeito ao se tratar as células com MET, um antagonista seletivo dos receptores adrenérgicos β_1 (Minneman *et al.*, 1979), numa concentração suficiente para abolir também o efeito inotrópico positivo do ISO.

O efeito do MET sobre os potenciais de ação e correntes de membrana em cardiomiócitos é conhecido. Sua ação estabilizadora da membrana poderia e modificar a resposta desta ao E. Todavia, esses efeitos são observados em concentrações da ordem de 10^{-3} M (Barrington & Ten Eick, 1990; Sanchez-Chapula, 1992), i.e., ao menos 1 ordem de grandeza acima da concentração utilizada neste trabalho. Como o tratamento apenas com MET não alterou a curva de letalidade, é possível concluir que o bloqueio dos adrenoceptores β_1 parece não alterar a condição basal de reparo celular, apenas impede o ganho de proteção por estimulação desta via.

Os experimentos com inibição da PKA mostram que esta quinase tem papel fundamental na proteção β -adrenérgica das células ao E. H-89, um conhecido inibidor da PKA (Chijiwa *et al.*, 1990), foi capaz de inibir ambos o efeito inotrópico positivo (Figura 4.6) e protetor da estimulação β -adrenérgica, indicando que PKA é um efetor essencial na cascata de sinalização que possivelmente ativa os mecanismos de reparo capazes de tornar a célula mais resistente aos efeitos deletérios do E. Isto não é surpresa, uma vez que é amplamente aceito que os efeitos da ativação de adrenoceptores β_1 são principalmente mediados pela ação da PKA (Steinberg, 1999; Xiang, 2011).

Para garantir a inibição da PKA utilizamos uma concentração relativamente alta de H-89 (10 μ M; $K_i = 48$ nM, Chijiwa *et al.*, 1990). Foram realizados testes preliminares com concentrações menores (1, 3, 5 e 10 μ M) de H-89, e apenas o tratamento com 10 μ M de H-89 foi capaz de ter um efeito significativo, inibindo a ação inotrópica positiva da estimulação β -adrenérgica. Devido a fatores como procedência e lote, pode haver uma grande variação na eficiência de um fármaco, e a inibição de PKA com concentrações mais elevadas de H-89, como 10 μ M, é co-

num em diversos trabalhos realizados em diferentes tipos celulares (Kashima *et al.*, 2001; Fujino *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011; Jonassen *et al.*, 2012).

Outra limitação do uso de H-89 é seu efeito sobre correntes iônicas de membrana. O tratamento com 5 μM desta droga pode provocar inexcitabilidade celular por reduzir a corrente de Ca^{2+} do tipo L (Hussain *et al.*, 1999). De fato, após o tratamento com H-89, observamos que várias células pararam de responder à estimulação elétrica. Entretanto, como as curvas de letalidade de células tratadas com H-89 não foram diferentes das curvas do grupo controle, pode-se supor que este efeito não altere o comportamento da célula em relação ao efeito deletério do E, especialmente porque as correntes iônicas não parecem estar envolvidas no processo de eletroporação. Outros trabalhos demonstraram que o bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, com verapamil (Oliveira *et al.*, 2005), Cd^{2+} e Ni^{2+} (Tovar & Tung, 1992) não altera a resposta de cardiomiócitos aos efeitos deletérios do E.

Assim, acreditamos que a explicação mais plausível para o desaparecimento do efeito protetor da estimulação β -adrenérgica após o tratamento com H-89 seja a inibição da PKA. Esta hipótese é consistente com o relato de que a PKA pode atuar em várias etapas do mecanismo de exocitose, aumentando a disponibilidade de vesículas, modulando o transporte destas e mediando a fusão de membranas (Muñiz *et al.*, 1997; Chheda *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2004; Seino & Shibasaki, 2005; Skelin & Rupnik, 2011).

Spaeth *et al.* (2010, 2011) demonstraram que a taxa de reparo de axônios transeccionados é maior quando a PKA é ativada por cBIMPS (um análogo de cAMP que ativa apenas PKA). A inibição de PKA com KT5720 e PKI também produziu redução na taxa de reparo (Spaeth *et al.*, 2010). A via de ação da PKA identificada no reparo não estaria no tráfego ou no aumento da disponibilidade de vesículas do sistema de Golgi, mas sim na fusão de membranas, por fosforilação de proteínas especializadas neste processo, denominadas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*). A utilização de inibidores de SNAREs aboliu o aumento da taxa de reparo causado pela ativação de PKA (Spaeth *et al.*, 2011).

Shen & Steinhardt (2005) observaram que a PKA é capaz de potencializar o auto-reparo de células da córnea de coelho lesadas mecanicamente. Potencializar o reparo é definido como tornar a célula mais eficiente em se reparar de forma global, enquanto facilitar o reparo consiste em tornar a célula mais eficiente no reparo de lesões ocorridas na mesma região da membrana. Entretanto, este grupo propôs que a PKA só participaria do processo de potencialização, i.e., após uma lesão, a PKA tornaria a célula mais apta a se reparar apenas se a segunda lesão fosse causada em uma região diferente da membrana. No caso do dano causado a cardiomiócitos pelo E, quando a célula se encontrar orientada paralelamente ao campo, a lesão tende a

ocorrer de forma localizada nos polos (Oliveira *et al.*, 2008; Klauke *et al.*, 2010). O aumento da eficiência de reparo na mesma região, ou seja, facilitação, observado por Shen & Steinhardt (2005), seria independente de PKA, e estaria relacionada apenas à ativação de PKC. Esta proposta poderia, em tese, também ser aplicável à proteção de miócitos cardíacos pelo ISO, observada neste trabalho. Para investigá-la, foram realizados experimentos nos quais a estimulação β -adrenérgica foi realizada na presença de BIS I, um inibidor de PKC (Toullec *et al.*, 1991).

O tratamento com 500 nM de BIS I não afetou significativamente o efeito inotrópico positivo da estimulação β -adrenérgica. Este resultado era esperado, uma vez que não existem relatos de que PKC participe da modulação deste efeito. Mas este resultado foi importante em demonstrar que a concentração utilizada de BIS I não foi capaz de inibir a PKA.

No que diz respeito à letalidade, a inibição de PKC não produziu efeitos significativos sobre o efeito de E, fosse na ausência ou presença de ISO. Este resultado sugere que, em miócitos ventriculares de rato, a PKA não atua como mero coadjuvante favorecendo a ativação de PKC, mas tem papel central no processo que confere maior resistência ao E. Este resultado não descarta a participação da PKC nos mecanismos basais de reparo, mas mostra que a proteção mediada pela ativação de adrenoceptores β_1 não parece envolver participação de PKC.

Apesar da inibição de PKC não se relacionar com o ganho de resistência das células ao efeito deletério do E, vários trabalhos associam sua ação aos mecanismos de excitose e fusão de membranas (De Matteis *et al.*, 1993; Buccione *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996; Westermann *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2000). Nossos resultados apontam um provável envolvimento da PKC na taxa de reparo pós-choque da membrana. Sob inibição de PKC, o tempo de recuperação das células após um choque subletal aumentou substancialmente, efeito este que independeu do tratamento com ISO.

Togo *et al.* (1999), realizando experimentos com lesão mecânica de fibroblastos 3T3, observaram que, após repetidas lesões, o reparo é mais rápido que após a primeira lesão. Os autores propuseram a existência de um pré-condicionamento da célula, de modo que os mecanismos de reparo ativados pela primeira lesão não se inativariam, o que tornaria a célula mais apta a realizar o próximo reparo (Shen *et al.*, 2005). Os mecanismos moleculares que permitem esta facilitação de reparo foram associados à ativação de PKC (Togo *et al.*, 1999; Shen & Steinhardt, 2005) e de SNAREs (Shen *et al.*, 2005) na primeira lesão. No presente trabalho, também foram induzidas lesões repetidas, até a ocorrência de morte celular (ver 3.6.1), condição necessária para realização da análise de sobrevivência. Seria então possível explicar o aumento do tempo médio de recuperação pós-choque por BIS I como resultado do bloqueio da facilitação do reparo. A inibição da PKC com BIS I impede a ocorrência da facilitação (Togo *et al.*,

1999; Shen & Steinhardt, 2005), mas pode (Shen & Steinhardt, 2005) ou não (Togo *et al.*, 1999) tornar o segundo reparo mais lento que o primeiro: a razão entre a velocidade do 2º reparo e a do 1º reparo foi próxima a 1 (fibroblastos 3T3 tratados com 500 nM BIS I; Togo *et al.*, 1999) ou menor que 1 (fibroblastos 3T3 tratados com 1 µM Gö-6976; Togo *et al.*, 1999; células da córnea tratadas com 1 µM BIS I; Shen & Steinhardt, 2005). Assim, os resultados de Togo *et al.* (1999) sugerem que os mecanismos basais de reparo independem de PKC, estando esta enzima relacionada apenas a um ganho de velocidade de reparo após a primeira lesão.

De modo geral nossos resultados mostram que o aumento da resistência de cardiomiócitos ao efeito deletério do E após a estimulação β-adrenérgica se dá por ativação de adrenocetores β₁ e subsequente ativação da PKA. Pode-se especular que a ação da PKA provavelmente se dá potencializando os mecanismos de reparo celular, o que pode estar relacionado a capacidade de reparar danos mais extensos, uma vez que os choques são progressivamente mais intensos e conseqüentemente tornam a eletroporação mais ampla (Wolf *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2004; Miklavčič *et al.*, 2010; Saulis, 2010). PKC atuaria na facilitação do processo de reparo. Mas os mecanismos basais de reparo parecem ser independentes destas duas quinases, já que a inibição delas não torna a célula menos resistente ao E.

5.4 PARTICIPAÇÃO DO Ca²⁺ NA PROTEÇÃO

Em condições fisiológicas, quando a membrana celular é lesada, ocorre um massivo influxo de Ca²⁺ do meio extracelular para o citoplasma. A elevação da [Ca²⁺]_i pode atuar como um sinal e levar à ativação dos mecanismos de reparo celular (Steinhardt *et al.*, 1994; Spaeth *et al.*, 2010), assim como as vias que levam a morte por apoptose (Orrenius *et al.*, 2003) ou perda de integridade celular por hipercontratura (Knisley & Grant, 1995; Oliveira *et al.*, 2008; Klauke *et al.*, 2010). A participação do Ca²⁺ no reparo não espontâneo de membrana é decorrente de seu papel em todo o processo de excitose e fusão de membranas. A ação do Ca²⁺ é direta na fusão de membranas mediada por SNAREs, na qual a sinaptotagmina atua como sensor de Ca²⁺ (Jackson & Chapman, 2006). A inibição das proteínas sinaptobrevina e SNAP-25 (duas SNAREs) impede o reparo de membrana mediado por Ca²⁺ (Steinhardt *et al.*, 1994). Ca²⁺ também pode promover a interação de anexinas com a membrana, tal interação está relacionada a eventos de excitose, endocitose e reparo de membrana (Gerke *et al.*, 2005; Babiychuk *et al.*, 2009; Draeger *et al.*, 2011). Mas o papel do Ca²⁺ não se resume a uma participação direta: ele pode atuar ativando PKA e PKC, que irão atuar ativamente nos processos de reparo (McNeil & Steinhardt, 2003; Shen & Steinhardt, 2005; Spaeth *et al.*, 2010). Spaeth *et al.* (2010) propuseram um modelo no qual o influxo de Ca²⁺ pela lesão inicia os mecanismos de reparo via ativa-

ção de PKA, PKC, Epac (proteína de troca ativada por cAMP) e oxidação. Um aumento de $[Ca^{2+}]_i$ pode promover a ativação de uma isoforma de AC dependente de Ca^{2+} , o que levará à ativação da PKA por aumento da disponibilidade de cAMP (Hanoune & Defer, 2001; Kim *et al.*, 2007). A PKA é capaz tanto de atuar nos mecanismos de reparo, como aumentar ainda mais a mobilização de Ca^{2+} , no caso do coração (Bers, 2001). Por outro lado, PKC é ativada diretamente por Ca^{2+} e DAG, sendo que a disponibilidade de DAG também pode ser aumentada com o aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Neste último caso, Ca^{2+} ativaria calpaína, uma protease que pode promover a ativação da PLC, a qual, por sua vez, hidrolisa PIP_2 em IP_3 e DAG (Minneman, 1988; Banno *et al.*, 1995). IP_3 também pode promover o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ por liberação dos estoques de Ca^{2+} do RS (Bers, 2001). A figura 5.1 apresenta um esquema desta sinalização de reparo.

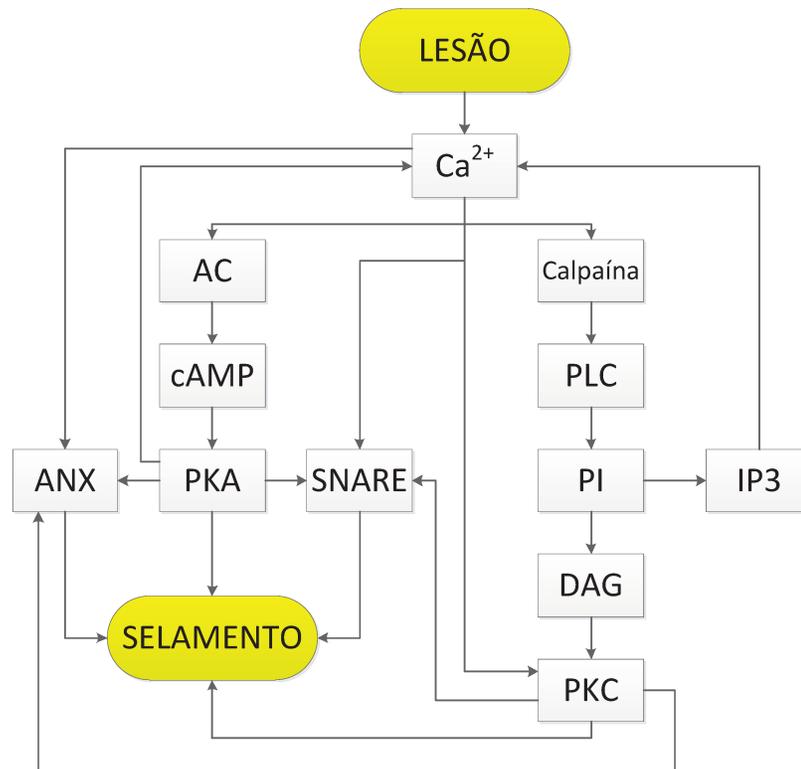


Figura 5.1 – Representação esquemática da sinalização de reparo via Ca^{2+} . Após o influxo de Ca^{2+} em decorrência de uma lesão, ocorre a elevação de $[Ca^{2+}]_i$ que ativa uma adenilato ciclase dependente de Ca^{2+} (AC). AC eleva a produção de monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (AMP_C), que ativa a quinase de proteína A (PKA). PKA atua tanto diretamente no selamento, como promove maior elevação de $[Ca^{2+}]_i$. Ca^{2+} também pode ativar calpaína, que hidrolisa a fosfolipase C (PLC), levando à sua ativação e posterior hidrólise de fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). IP_3 atua elevando a $[Ca^{2+}]_i$. DAG e Ca^{2+} ativam a quinase de proteína C (PKC), que atuará no selamento. Ca^{2+} também pode interagir com SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*) e anexinas (ANX), para mediar a fusão de membranas e processos de exocitose e endocitose. PKC e PKA podem fosforilar ANX (Rothhut, 1997) e SNARE (Chung *et al.*, 2000; Chheda *et al.*, 2001).

A ativação de PKA isoladamente pelo influxo de Ca^{2+} durante a lesão de membrana é pouco provável em miócitos ventriculares. As ACs que apresentam atividade aumentada em presença de Ca^{2+} são as isoformas AC1 e AC8, cuja expressão ocorre principalmente no cérebro (Hanoune & Defer, 2001). Estas isoformas já foram encontradas em células atriais, mas miócitos ventriculares carecem de AC1, e apresentam baixa expressão de AC8 (Mattick *et al.*, 2007). As principais isoformas encontradas em miócitos ventriculares são AC5 e AC6, ambas inibidas por Ca^{2+} (Hanoune & Defer, 2001). Assim, a não ocorrência de um aumento na probabilidade de morte ou no tempo de recuperação dos cardiomiócitos após a inibição da PKA não causa surpresa. Diferentemente do que ocorre em neurônios, onde a inibição de PKA resulta em uma queda na eficiência de reparo (Spaeth *et al.*, 2010), é provável que, mesmo se presentes, as ACs dependentes de Ca^{2+} dos miócitos ventriculares não sejam capazes de promover uma ativação considerável de PKA no momento da lesão, o que explicaria a ausência de evidência da participação da PKA nos mecanismos basais de reparo de membrana em miócitos ventriculares.

10 nM de ISO são capazes de produzir um efeito inotrópico significativo em miócitos ventriculares (ver 3.1), que é dependente do aumento da amplitude da variação sistólica da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bers, 2001; Soriano *et al.*, 2007). Para determinar se o efeito protetor do ISO estaria associado ao aumento da mobilização celular de Ca^{2+} , realizou-se a depleção dos estoques deste íon contidos no RS, que constitui a principal fonte de Ca^{2+} ativador da contração em mamíferos (Delbridge *et al.*, 1996; Bers, 2001). Estes estoques de Ca^{2+} do RS são ainda aumentados pelo tratamento com ISO (Ginsburg & Bers, 2004). Além disso, não foi utilizada a estimulação elétrica prévia ao choque de alta intensidade, a qual evoca ciclicamente a corrente de Ca^{2+} através do sarcolema. Esta, também estimulada por ISO (Ginsburg & Bers, 2004), eleva a disponibilidade de Ca^{2+} para o RS (Bassani *et al.*, 2004). Com esses procedimentos, buscou-se reduzir o acionamento de mecanismos dependentes de Ca^{2+} que pudessem estar envolvidos no processo de reparo das lesões de membrana induzidas pelo choque de alta intensidade.

O protocolo utilizado não leva a uma condição de depleção do íon Ca^{2+} : simplesmente é obtida uma redução da mobilização de Ca^{2+} . Assim, é de se esperar que, caso o aumento da mobilização de Ca^{2+} , evocado pela estimulação β -adrenérgica antes da lesão, pré-condicionasse os mecanismos de reparo, o efeito protetor do ISO desapareceria ou o tempo de recuperação das células seria aumentado. Entretanto, este procedimento experimental não afetou a curva de letalidade, e nem impediu que o ISO aumentasse a resistência das células ao efeito deletério do E de alta intensidade. O que se observou foi um aumento de ~50% no tempo

de recuperação médio das células submetidas a este procedimento e tratadas com ISO. Este resultado poderia ser explicado por uma menor ativação de PKC neste caso, interpretação baseada na observação de que a inibição de PKC por BIS I causa um grande aumento no tempo de recuperação das células, possivelmente por abolir a facilitação do reparo celular.

Deste modo, o efeito protetor da estimulação β -adrenérgica parece independe do aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Estes achados são similares aos obtidos por Spaeth *et al.* (2010), que observaram que, por mais que Ca^{2+} seja necessário para o reparo, a ausência de Ca^{2+} pode ser suprida, em parte, pela ativação dos mecanismos de reparo via aumento de cAMP. Quando provemos uma estimulação β -adrenérgica usando ISO, estamos de fato aumentando a disponibilidade de cAMP. Nossos resultados com a inibição de PKA utilizando H-89 corroboram esta hipótese. Assim, acreditamos que o processo de reparo necessite de uma $[Ca^{2+}]_i$ basal para que os mecanismos de reparo dependentes de Ca^{2+} funcionem, mas que um aumento desta $[Ca^{2+}]_i$ não é requerido para o aumento da resistência dos miócitos ao E conferido pela estimulação β -adrenérgica.

5.5 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O aumento da liberação de catecolaminas pelas terminações adrenérgicas cardíacas e dos níveis plasmáticos desses sinalizadores têm sido encontrados durante a FV (Wortsmann *et al.*, 1984; Foley *et al.*, 1987; Winkle *et al.*, 1990; Meredith *et al.*, 1991; Woodhouse *et al.*, 1992), de modo que o coração é exposto ao choque desfibrilatório já sob considerável estimulação adrenérgica. Além disso, o procedimento de desfibrilação costuma ser precedido de infusão de adrenalina (Lee, 2011). Não há consenso sobre o benefício desta abordagem, mas já foi demonstrado que a infusão de adrenalina promove um aumento da taxa de sobrevivência de pacientes não desfibrilados e uma redução da energia requerida para o sucesso na desfibrilação (Herlitz *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2001). Redução do limiar de desfibrilação em decorrência da estimulação com noradrenalina também foi relatada em pacientes com desfibriladores implantáveis (Kalus *et al.*, 2005).

Nós demonstramos que a estimulação β -adrenérgica pode tornar as células cardíacas mais resistentes ao E, e que este efeito é abolido pelo uso de MET, um bloqueador dos adrenocetores β_1 . O uso de β -bloqueadores é comumente indicado no tratamento da insuficiência cardíaca (Foody *et al.*, 2002; Böhm *et al.*, 2011; Bocchi *et al.*, 2012). Porém, pacientes com insuficiência cardíaca constituem um grupo de risco para a FV e estão mais propensos a serem submetidos a uma desfibrilação/cardioversão (Roger *et al.*, 2012). Em tese, o uso de bloqueadores β_1 poderia aumentar os danos associados ao procedimento, por impedir que a maior pre-

sença de catecolaminas endógenas promova proteção. Entretanto, o uso crônico do β -bloqueador MET na insuficiência cardíaca reduz a ocorrência de morte súbita nos pacientes (Goldstein *et al.*, 2001) e também pode restaurar a perda do acoplamento dos adrenoceptores β à sua via de transdução, que ocorre nesta condição patológica (Bristow, 1997), o que poderia permitir que uma estimulação adrenérgica residual exerça efeito protetor sobre o miocárdio no caso da aplicação de um choque desfibrilatório.

Embora a infusão de catecolaminas durante a FV pareça ser benéfica, este procedimento é controverso por apresentar um efeito pró-arrítmico. As arritmias causadas pela estimulação β -adrenérgica são decorrentes da atividade espontânea associada a uma sobrecarga de Ca^{2+} (Bassani & Bassani, 2003; Boer *et al.*, 2011). Além disso, este tratamento pode facilitar a reentrância e reindução de FV pela abreviação do período refratário dos cardiomiócitos (Tovar & Jones, 1997). Apesar de toda a discussão a este respeito, a utilização da estimulação β -adrenérgica é rotineira nas tentativas de ressuscitação emergencial, sendo os maiores problemas associados a altas doses de catecolaminas, nas quais se observa uma queda na eficiência da ressuscitação e redução da sobrevivência nas 24 horas seguintes (Hörnchen *et al.*, 1993; Hilwig *et al.*, 2000). No presente trabalho, foi possível obter uma considerável proteção ao E de alta intensidade com uma concentração submáxima de ISO, na faixa nanomolar (Penna & Bassani, 2010). Nossos resultados, que demonstram pela primeira vez que a estimulação adrenérgica confere proteção miocárdica contra a lesão causada pelo choque, sugerem que tratamentos que visem uma estimulação β -adrenérgica branda (insuficiente para um efeito pró-arrítmico considerável) podem contribuir para um aumento da eficiência dos protocolos de desfibrilação.

6 CONCLUSÕES

Dos resultados do presente trabalho, é possível concluir que:

- a) A estimulação β -adrenérgica aumenta a resistência de miócitos ventriculares de rato aos efeitos deletérios do E de alta intensidade.
- b) Os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito protetor, que são mediados pela ocupação de adrenoceptores β_1 , parecem envolver a via de transdução clássica associada a estes receptores, da qual a PKA é o efetor.
- c) A ação da PKA não está relacionada ao aumento da mobilização de Ca^{2+} celular, nem ao *cross-talk* com PKC. Há indicação de que PKC tenha influência facilitadora do reparo da membrana, tornando a recuperação pós-choque mais rápida, mas tal facilitação independe da estimulação β -adrenérgica.
- d) Propõe-se que PKA possa atuar nos mecanismos de reparo celular e, assim, conferir maior resistência a célula. Entretanto, estudos ainda são necessários para se determinar quais os mecanismos de reparo são direta ou indiretamente potencializados por PKA durante a estimulação β -adrenérgica.
- e) Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam ser futuramente melhor explorados, fornecendo subsídio para o desenvolvimento e utilização de fármacos que possam atenuar os efeitos deletérios dos procedimentos de desfibrilação ou cardioversão sobre a integridade e a função do miocárdio.

7 REFERÊNCIAS

ADDERLEY SP; SRIDHARAN M; BOWLES EA; STEPHENSON AH; ELLSWORTH ML; SPRAGUE RS. Protein kinases A and C regulate receptor-mediated increases in cAMP in rabbit erythrocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 298: H587-H593, 2010.

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

AIDLEY DJ. **The Physiology of Excitable Cells**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 477 p.

AKSELROD H; KROLL MW; ORLOV MV. History of defibrillation. In: EFIMOV, IR; KROLL MW; TCHOU PJ (Ed.). **Cardiac Bioelectric Therapy**. New York: Springer, 2009. p. 15-40.

BABIYCHUK EB; MONASTYRSKAYA K; POTEZ S; DRAEGER A. Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. **Cell Death Differ** 16: 1126-1134, 2009.

BANNO Y; NAKASHIMA S; HACHIYA T; NOZAWA Y. Endogenous cleavage of phospholipase C- β 3 by agonist-induced activation of calpain in human platelets. **J Biol Chem** 270: 4318-4324, 1995.

BARDOU AL; DEGONDE J; BIRKUI PJ; CHESNAIS JM. Stimulation threshold of isolated myocytes and cross shock defibrillation. **Proc. Annual International Conference IEEE** 2: 961-962 1988.

BAROLD SS. Willem Einthoven and the birth of clinical electrocardiography a hundred years ago. **Cardiac Electrophysiol Rev** 7: 99-104, 2003.

BARRINGTON PL; TEN EICK RE. Characterization of the electrophysiological effects of metoprolol on isolated feline ventricular myocytes. **J Pharmacol Exp Ther** 252: 1043-1052, 1990.

BASSANI JWM; BASSANI RA; BERS DM. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. **J Physiol** 460: 603-621, 1993.

BASSANI JWM; BASSANI RA; BERS DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **J Physiol** 476: 279-293, 1994.

BASSANI RA; ALTAMIRANO J; PUGLISI JL; BERS DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. **J Physiol** 559: 593-609, 2004.

BASSANI RA; BASSANI JWM. Papel do Ca^{2+} na geração de arritmias cardíacas: quando a hierarquia é subvertida. **Rev SOCESP** 13: 693-706, 2003.

BASSANI RA; BASSANI JWM; BERS DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **J Physiol** 453: 591-608, 1992.

BASSANI RA; LIMA KA; GOMES PAP; OLIVEIRA PX; BASSANI JWM. Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes. **Physiol Meas** 27: 851-863, 2006.

BASSANI RA; MATTIAZZI A; BERS DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 268: H703-H712, 1995.

BECKER LB; OSTRANDER MP; BARRETT J; KONDOS GT. Outcome of CPR in a large metropolitan area - where are the survivors? **Ann Emerg Med** 20: 355-361, 1991.

BERRIDGE MJ; BOOTMAN MD; LIPP P. Calcium - a life and death signal. **Nature** 395: 645-648, 1998.

BERRIDGE MJ; LIPP P; BOOTMAN MD. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 1: 11-21, 2000.

BERS DM. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**. 2 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 427 p.

BERS DM. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature** 415: 198-205, 2002.

BOCCHI E; MARCONDES-BRAGA F; BACAL F; FERRAZ A; ALBUQUERQUE D; RODRIGUES D. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica - 2012. **Arq Bras Cardiol** 98: 1-33, 2012.

BÖCKMANN RA; DE GROOT BL; KAKORIN S; NEUMANN E; GRUBMÜLLER H. Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. **Biophys J** 95: 1837-1850, 2008.

BOER DC; BASSANI JWM; BASSANI RA. Functional antagonism of β -adrenoceptor subtypes in the catecholamine-induced automatism in rat myocardium. **Br J Pharmacol** 162: 1314-1325, 2011.

BÖHM M; LINK A; CAI D; NIEMINEN MS; FILIPPATOS GS; SALEM R; SOLAL AC; HUANG B; PADLEY RJ; KIVIKKO M; MEBAZAA A. Beneficial association of β -blocker therapy on recovery from severe acute heart failure treatment: data from the survival of patients with acute heart failure in need of intravenous inotropic support trial. **Crit Care Med** 39: 940-944, 2011.

BRISTOW MR. Mechanism of Action of Beta-Blocking Agents in Heart Failure. **Am J Cardiol** 80: 26L-40L, 1997.

BRISTOW MR; SANDOWOVAL AB; GILBERT EM; DEISHER T; MINOBE W; RASMUSSEN R. Myocardial α - and β -adrenergic receptors in heart failure: is cardiac-derived norepinephrine the regulatory signal? **Eur Heart J** 9: 35-40, 1988.

BRODDE OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. **Pharmacol Rev** 43: 203-242, 1991.

BRODDE OE; MICHEL MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Rev** 51: 651-690, 1999.

BUCCIONE R; BANNYKH S; SANTONE I; BALDASSARRE M; FACCHIANO F; BOZZI Y; DI TULLIO G; MIRONOV A; LUINI A; DE MATTEIS MA. Regulation of constitutive exocytic transport by membrane receptors. **J Biol Chem** 271: 3523-3533, 1996.

CABRERA-VERA TM; VANHAUWE J; THOMAS TO; MEDKOVA M; PREININGER A; MAZZONI MR; HAMM HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. **Endocr Rev** 24: 765-781, 2003.

CARLSSON E; ÅBLAD B; BRÄNDSTRÖM A; CARLSSON B. Differentiated blockade of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. **Life Sci** 11: 953-958, 1972.

CASE RM; EISNER D; GURNEY A; JONES O; MUALLEM S; VERKHRATSKY A. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. **Cell Calcium** 42: 345-350, 2007.

CHATTIPAKORN S; CHATTIPAKORN N. Electrophysiological concept of ventricular defibrillation mechanism. **J Med Assoc Thai** 87: 1394-1401, 2004.

CHEEK ER; FAST VG. Nonlinear changes of transmembrane potential during electrical shocks. **Circ Res** 94: 208-214, 2004.

CHEN P; SWERDLOW CD; HWANG C; KARAGUEUZIAN HS. Current concepts of ventricular defibrillation. **J Cardiovasc Electrophysiol** 9: 553-562, 1998.

CHENG DKL; TUNG L; SOBIE EA. Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 277: H351-H362, 1999.

CHHEDA MG; ASHERY U; THAKUR P; RETTIG J; SHENG Z-H. Phosphorylation of snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. **Nat Cell Biol** 3: 331-338, 2001.

CHIJIWA T; MISHIMA A; HAGIWARA M; SANO M; HAYASHI K; INOUE T; NAITO K; TOSHIOKA T; HIDAHA H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. **J Biol Chem** 265: 5267-5272, 1990.

CHO M; THATTE H; LEE R; GOLAN D. Induced redistribution of cell surface receptors by alternating current electric fields. **FASEB J** 8: 771-776, 1994.

CHUGH SS; REINIER K; TEODORESCU C; EVANADO A; KEHR E; AL SAMARA M; MARIANI R; GUNSON K; JUI J. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. **Prog Cardiovasc Dis** 51: 213-228, 2008.

CHUNG SH; POLGÁR J; REED GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. **J Biol Chem** 275: 25286-25291, 2000.

CLARKE MSF; CALDWELL RW; CHIAO H; MIYAKE K; MCNEIL PL. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. **Circ Res** 76: 927-934, 1995.

CROWLEY JM. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. **Biophys J** 13: 711-724, 1973.

DE MATTEIS MA; SANTINI G; KAHN RA; DI TULLIO G; LUINI A. Receptor and protein kinase C-mediated regulation of ARF binding to the Golgi complex. **Nature** 364: 818-821, 1993.

DEBRUIN KA; KRASSOWSKA W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. **Biophys J** 77: 1213-1224, 1999.

DELBRIDGE LM; BASSANI JWM; BERS DM. Steady-state twitch Ca^{2+} fluxes and cytosolic Ca^{2+} buffering in rabbit ventricular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol** 270: C192-C199, 1996.

DEUPI X; STANDFUSS J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. **Curr Opin Struct Biol** 21: 541-551, 2011.

DOSDALL DJ; FAST VG; IDEKER RE. Mechanisms of defibrillation. **Annu Rev Biomed Eng** 12: 233-258, 2010.

DRAEGER A; MONASTYRSKAYA K; BABIYCHUK EB. Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit. **Biochem Pharmacol** 81: 703-712, 2011.

DROSATOS K; BHARADWAJ KG; LYMPEROPOULOS A; IKEDA S; KHAN R; HU Y; AGARWAL R; YU S; JIANG H; STEINBERG SF; BLANER WS; KOCH WJ; GOLDBERG IJ. Cardiomyocyte lipids impair β -adrenergic receptor function via PKC activation. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 300: E489-E499, 2011.

EDDLEMAN CS; BALLINGER ML; SMYERS ME; GODELL CM; FISHMAN HM; BITTNER GD. Repair of plasmalemmal lesions by vesicles. **PNAS** 94: 4745-4750, 1997.

EISENBERG MS; COPASS MK; HALLSTROM AP; BLAKE B; BERGNER L; SHORT FA; COBB LA. Treatment of out-of-hospital cardiac arrests with rapid defibrillation by emergency medical technicians. **N Engl J Med** 302: 1379-1383, 1980.

FABIATO A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am J Physiol Cell Physiol** 245: C1-C14, 1983.

FADEEL B; XUE D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 44: 264-277, 2009.

FADOK VA; BRATTON DL; FRASCH SC; WARNER ML; HENSON PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ** 5: 551-562, 1998.

FEDOROV VV; NIKOLSKI VP; EFIMOV IR. Effect of electroporation on cardiac electrophysiology. In: LI, S (Ed.). **Electroporation Protocols**. New York: Humana Press, v.423, 2008. p. 433-448.

FOLEY PJ; TACKER WA; WORTSMAN J; FRANK S; CRYER PE. Plasma catecholamine and serum cortisol responses to experimental cardiac arrest in dogs. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 253: E283-E289, 1987.

FOODY JM; FARRELL MH; KRUMHOLZ HM. β -Blocker therapy in heart failure. **JAMA** 287: 883-889, 2002.

FUJINO H; WEST KA; REGAN JW. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. **J Biol Chem** 277: 2614-2619, 2002.

GAUTHIER C; TAVERNIER G; CHARPENTIER F; LANGIN D; LE MAREC H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. **J Clin Invest** 98: 556-562, 1996.

GERKE V; CREUTZ CE; MOSS SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 449-461, 2005.

GILMAN AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annu Rev Biochem** 56: 615-649, 1987.

GINSBURG KS; BERS DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. **J Physiol** 556: 463-480, 2004.

GOLDSTEIN S; FAGERBERG B; HJALMARSON A; KJEKSHUS J; WAAGSTEIN F; WEDEL H; WIKSTRAND J. Metoprolol controlled release/extended release in patients with severe heart failure: analysis of the experience in the MERIT-HF study. **J Am Coll Cardiol** 38: 932-938, 2001.

GOMES PAP; BASSANI RA; BASSANI JWM. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. **IEEE Trans Biomed Eng** 48: 630-636, 2001.

GUIMOND J; MAMARBACHI AM; ALLEN BG; RINDT H; HÉBERT TE. Role of specific protein kinase C isoforms in modulation of β 1- and β 2-adrenergic receptors. **Cell Signal** 17: 49-58, 2005.

GUYTON AC; HALL JE. **Textbook of Medical Physiology**. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. 1116 p.

HANOUNE J; DEFER N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41: 145-174, 2001.

HERLITZ J; EKSTRÖM L; WENNERBLUM B; AXELSSON Å; BÅNG A; HOLMBERG S. Adrenaline in out-of-hospital ventricular fibrillation. Does it make any difference? **Resuscitation** 29: 195-201, 1995.

HILWIG RW; KERN KB; BERG RA; SANDERS AB; OTTO CW; EWY GA. Catecholamines in cardiac arrest: role of alpha agonists, beta-adrenergic blockers and high-dose epinephrine. **Resuscitation** 47: 203-208, 2000.

HIRATA F; STRITTMATTER WJ; AXELROD J. Beta-adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and beta-adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. **PNAS** 76: 368-372, 1979.

HÖRNCHEN U; LUSSI C; SCHUTTLER J. Potential risks of high-dose epinephrine for resuscitation from ventricular fibrillation in a porcine model. **J Cardiothorac Vasc Anesth** 7: 184-187, 1993.

HUSSAIN M; DRAGO GA; BHOGAL M; COLYER J; ORCHARD CH. Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca^{2+} regulation in isolated ferret ventricular myocytes. **Pflugers Arch** 437: 529-537, 1999.

IDEKER RE; ZHOU X; KNISLEY SB. Correlation among fibrillation, defibrillation, and cardiac pacing. **Pacing Clin Electrophysiol** 18: 512-525, 1995.

IDONE V; TAM C; GOSS JW; TOOMRE D; PYPART M; ANDREWS NW. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca^{2+} -dependent endocytosis. **J of Cell Biol** 180: 905-914, 2008.

IVORRA A. Tissue electroporation as a bioelectric phenomenon: basic concepts. In: RUBINSKY, B (Ed.). **Irreversible Electroporation**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 23-61.

IVORRA A; RUBINSKY B. Historical review of irreversible electroporation in medicine. In: RUBINSKY, B (Ed.). **Irreversible Electroporation**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1-21.

JACKSON MB; CHAPMAN ER. Fusion pores and fusion machines in Ca^{2+} -triggered exocytosis. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 35: 135-160, 2006.

JALIFE J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. **Annu Rev Physiol** 62: 25-50, 2000.

JIANG JL; PENG YP; QIU YH; WANG JJ. Adrenoreceptor-coupled signal-transduction mechanisms mediating lymphocyte apoptosis induced by endogenous catecholamines. **J Neuroimmunol** 213: 100-111, 2009.

JONASSEN AK; WERGELAND A; HELGELAND E; MJØS OD; BRAR BK. Activation of corticotropin releasing factor receptor type 2 in the heart by corticotropin releasing factor offers cytoprotection against ischemic injury via PKA and PKC dependent signaling. **Regul Pept** 174: 90-97, 2012.

JONES DL; KLEIN GJ; KALLOK MJ. Improved internal defibrillation with twin pulse sequential energy delivery to different lead orientations in pigs. **Am J Cardiol** 55: 821-825, 1985.

JONES JL; JONES RE; BALASKY G. Microlesion formation in myocardial cells by high-intensity electric field stimulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 253: H480-H486, 1987.

JONES JL; LEPESCHKIN E; JONES RE; RUSH S. Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 235: H214-H222, 1978.

JONES P; LODÉ N. Ventricular fibrillation and defibrillation. **Arch Dis Child** 92: 916-921, 2007.

KALUS JS; WHITE CM; CARON MF; GUERTIN D; McBRIDE BF; KLUGER J. The impact of catecholamines on defibrillation threshold in patients with implanted cardioverter defibrillators. **Pacing Clin Electrophysiol** 28: 1147-1156, 2005.

KASHIMA Y; MIKI T; SHIBASAKI T; OZAKI N; MIYAZAKI M; YANO H; SEINO S. Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. **J Biol Chem** 276: 46046-46053, 2001.

KEATING MT; SANGUINETTI MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. **Cell** 104: 569-580, 2001.

KHALIULIN I; PARKER JE; HALESTRAP AP. Consecutive pharmacological activation of PKA and PKC mimics the potent cardioprotection of temperature preconditioning. **Cardiovasc Res** 88: 324-333, 2010.

KIM C; CHENG CY; SALDANHA SA; TAYLOR SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. **Cell** 130: 1032-1043, 2007.

KINOSITA K; TSONG TY. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. **Nature** 268: 438-441, 1977.

KLAUKE N; SMITH G; COOPER JM. Regional electroporation of single cardiac myocytes in a focused electric field. **Anal Chem** 82: 585-592, 2010.

KLEE M; PLONSEY R. Stimulation of spheroidal cells - the role of cell shape. **IEEE Trans Biomed Eng** 23: 347-354, 1976.

KLEINBAUM DG. **Survival Analysis: A Self-Learning Text**. New York: Springer-Verlag, 1996. 324 p.

KNISLEY S; BLITCHINGTON T; HILL B; GRANT A; SMITH W; PILKINGTON T; IDEKER R. Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. **Circ Res** 72: 255-270, 1993.

KNISLEY SB; GRANT AO. Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol** 27: 1111-1122, 1995.

KOTNIK T; PUCIHAR G; REBERŠEK M; MIKLAVČIČ D; MIR LM. Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization. **Biochim Biophys Acta** 1614: 193-200, 2003.

KRAUTHAMER V; JONES JL. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. **Life Sci** 60: 1977-1985, 1997.

KROLL M; SWERDLOW C. Optimizing defibrillation waveforms for ICDs. **J Interv Card Electrophysiol** 18: 247-263, 2007.

LANDS AM; ARNOLD A; McAULIFF JP; LUDUENA FP; BROWN TG. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature** 214: 597-598, 1967a.

LANDS AM; LUDUENA FP; BUZZO HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. **Life Sci** 6: 2241-2249, 1967b.

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

LARSEN MP; EISENBERG MS; CUMMINS RO; HALLSTROM AP. Predicting survival from out-of-hospital cardiac arrest: a graphic model. **Ann Emerg Med** 22: 1652-1658, 1993.

LATIFI S; LIDSKY K; BLUMER JL. Pharmacology of inotropic agents in infants and children. **Prog Pediatr Cardiol** 12: 57-79, 2000.

LEE SW. Drugs in resuscitation: an update. **Singapore Med J** 52: 596-602, 2011.

LI HG; JONES DL; YEE R; KLEIN GJ. Defibrillation shocks increase myocardial pacing threshold: an intracellular microelectrode study. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 260: H1973-H1979, 1991.

LIMA KA. **Efeito da direção do campo elétrico sobre o limiar de estimulação de miócitos ventriculares isolados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1999. 92 p.

LIU S; ZHANG J; XIANG YK. FRET-based direct detection of dynamic protein kinase A activity on the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 404: 581-586, 2011.

MALMIVUO J; PLONSEY R. **Bioelectromagnetism - Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields**. New York: Oxford University Press, 1995. 512 p.

MANTEL N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. **Cancer Chemother Rep** 50: 163-170, 1966.

MATTICK P; PARRINGTON J; ODIA E; SIMPSON A; COLLINS T; TERRAR D. Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the I_f pacemaker current. **J Physiol** 582: 1195-1203, 2007.

McCUDDEN C; HAINS M; KIMPLE R; SIDEROVSKI D; WILLARD F. G-protein signaling: back to the future. **Cell Mol Life Sci** 62: 551-577, 2005.

McNEIL PL; KIRCHHAUSEN T. An emergency response team for membrane repair. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 499-505, 2005.

McNEIL PL; STEINHARDT RA. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. **Annu Rev Cell Dev Biol** 19: 697-731, 2003.

McNEIL PL; VOGEL SS; MIYAKE K; TERASAKI M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. **J Cell Sci** 113: 1891-1902, 2000.

MEREDITH IT; BROUGHTON A; JENNINGS GL; ESLER MD. Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. **N Engl J Med** 325: 618-624, 1991.

MIKLAVČIČ D; PUCIHAR G; MAČEK-LEBAR A; KRMEJ J; TOWHIDI L. The pulse intensity duration dependency for cell membrane electroporation. In: PAKHOMOV, AG; MIKLAVČIČ D; MARKOV MS (Ed.). **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 239-251.

MINNEMAN KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . **Pharmacol Rev** 40: 87-119, 1988.

MINNEMAN KP; HEGSTRAND LR; MOLINOFF PB. Simultaneous determination of beta-1 and beta-2-adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. **Mol Pharmacol** 16: 34-46, 1979.

MUÑIZ M; MARTÍN ME; HIDALGO J; VELASCO A. Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. **PNAS** 94: 14461-14466, 1997.

NAGATSU T. The catecholamine system in health and disease - relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci** 82: 388-415, 2006.

NEU WK; NEU JC. Mechanism of irreversible electroporation in cells: insight from the models. In: RUBINSKY, B (Ed.). **Irreversible Electroporation**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 85-122.

NEUNLIST M; TUNG L. Dose-dependent reduction of cardiac transmembrane potential by high-intensity electrical shocks. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 273: H2817-H2825, 1997.

NIKOLSKI VP; EFIMOV IR. Electroporation of the heart. **Europace** 7: S146-S154, 2005.

OLIVEIRA PX. **Campo elétrico letal e variação do potencial transmembrana em miócitos ventriculares de rato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004. 71 p.

OLIVEIRA PX; BASSANI RA; BASSANI JWM. Cytosolic Ca^{2+} accumulation in ventricular myocytes after stimulation with high-intensity electric fields. **Biophys J** 88 (suppl. 1): 1 (abstr. 1514), 2005.

OLIVEIRA PX; BASSANI RA; BASSANI JWM. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. **IEEE Trans Biomed Eng** 55: 2635-2642, 2008.

O'NEILL RJ; TUNG L. Cell-attached patch clamp study of the electropermeabilization of amphibian cardiac cells. **Biophys J** 59: 1028-1039, 1991.

ONUMA EK; HUI SW. A calcium requirement for electric field-induced cell shape changes and preferential orientation. **Cell Calcium** 6: 281-292, 1985.

ORRENIUS S; ZHIVOTOVSKY B; NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4: 552-565, 2003.

OSHIYAMA NF; BASSANI JWM; BASSANI RA. Configuração do potencial de ação em miócitos ventriculares isolados de ratos neonatos e adultos. **I Simpósio Brasileiro de Eletrofisiologia Celular**. Proceedings, p. 40 (abstr.), 2012.

PENNA LB; BASSANI RA. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. **Stress** 13: 73-82, 2010.

QU Z. Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 290: H255-H263, 2006.

RANJAN R; THAKOR NV. Electrical stimulation of cardiac myocytes. **Ann Biomed Eng** 23: 812-821, 1995.

RAPOPORT SI. Mechanical properties of the sarcolemma and myoplasm in frog muscle as a function of sarcomere length. **J Gen Physiol** 59: 559-585, 1972.

RAPOPORT SI. The anisotropic elastic properties of the sarcolemma of the frog semitendinosus muscle fiber. **Biophys J** 13: 14-36, 1973.

RICARDO RA; OLIVEIRA PX; BASSANI RA; BASSANI JWM. Compact cell image projector: application to study the relationship between stimulus interval and contraction amplitude in isolated rat cardiomyocytes. **Braz J Biom Eng** 22: 151-160, 2006.

ROBINSON KR. The responses of cells to electrical fields: a review. **J Cell Biol** 101: 2023-2027, 1985.

ROGER VL; GO AS; LLOYD-JONES DM; ADAMS RJ; BERRY JD; BROWN TM; CARNETHON MR; DAI S; DE SIMONE G; FORD ES; FOX CS; FULLERTON HJ; GILLESPIE C; GREENLUND KJ; HAILPERN SM; HEIT JA; HO PM; HOWARD VJ; KISSELA BM; KITTNER SJ; LACKLAND DT; LICHTMAN JH; LISABETH LD; MAKUC DM; MARCUS GM; MARELLI A; MATCHAR DB; McDERMOTT MM; MEIGS JB; MOY CS; MOZAFFARIAN D; MUSSOLINO ME; NICHOL G; PAYNTER NP; ROSAMOND WD; SORLIE PD; STAFFORD RS; TURAN TN; TURNER MB; WONG ND; WYLIE-ROSETT J. Heart disease and stroke statistics - 2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation** 123: e18-e209, 2011.

ROGER VL; GO AS; LLOYD-JONES DM; BENJAMIN EJ; BERRY JD; BORDEN WB; BRAVATA DM; DAI S; FORD ES; FOX CS; FULLERTON HJ; GILLESPIE C; HAILPERN SM; HEIT JA; HOWARD VJ; KISSELA BM; KITTNER SJ; LACKLAND DT; LICHTMAN JH; LISABETH LD; MAKUC DM; MARCUS GM; MARELLI A; MATCHAR DB; MOY CS; MOZAFFARIAN D; MUSSOLINO ME; NICHOL G; PAYNTER NP; SOLIMAN EZ; SORLIE PD; SOTOODEHNIA N; TURAN TN; VIRANI SS; WONG ND; WOO D; TURNER MB. Heart disease and stroke statistics - 2012 update: a report from the American Heart Association. **Circulation** 125: e2-e220, 2012.

ROMERO LM. Fight or flight responses. In: MICHAEL, DB; JANICE M (Ed.). **Encyclopedia of Animal Behavior**. Oxford: Academic Press, 2010. p. 710-714.

ROTHHUT B. Participation of annexins in protein phosphorylation. **Cell Mol Life Sci** 53: 522-526, 1997.

SANCHEZ-CHAPULA J. Effects of metoprolol on action potential and membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 345: 342-348, 1992.

SAULIS G. Kinetics of pore formation and disappearance in the cell during electroporation. In: PAKHOMOV, AG; MIKLAVČIČ D; MARKOV MS (Ed.). **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 213-237.

SAULIS G; VENSLAUSKAS MS; NAKTINIS J. Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. **J Electroanal Chem** 321: 1-13, 1991.

SAVILL J; FADOK V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature** 407: 784-788, 2000.

SCHAPIRE AL; VALPUESTA V; BOTELLA MA. Plasma membrane repair in plants. **Trends Plant Sci** 14: 645-652, 2009.

SEINO S; SHIBASAKI T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. **Physiol Rev** 85: 1303-1342, 2005.

SHARMA V; TUNG L. Spatial heterogeneity of transmembrane potential responses of single guinea-pig cardiac cells during electric field stimulation. **J Physiol** 542: 477-492, 2002.

SHEN SS; STEINHARDT RA. The mechanisms of cell membrane resealing in rabbit corneal epithelial cells. **Curr Eye Res** 30: 543-554, 2005.

SHEN SS; TUCKER WC; CHAPMAN ER; STEINHARDT RA. Molecular regulation of membrane resealing in 3T3 fibroblasts. **J Biol Chem** 280: 1652-1660, 2005.

SIMON JP; IVANOV IE; ADESNIK M; SABATINI DD. The production of post-Golgi vesicles requires a protein kinase C-like molecule, but not its phosphorylating activity. **J Cell Biol** 135: 355-370, 1996.

SKELIN M; RUPNIK M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca^{2+} primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. **Cell Calcium** 49: 89-99, 2011.

SMITH KC; NEU JC; KRASSOWSKA W. Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. **Biophys J** 86: 2813-2826, 2004.

SOARES GS. **Comprometimento contrátil do tecido cardíaco isolado após estimulação com campo elétrico de alta intensidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003. 64 p.

SORIANO DC; BASSANI RA; BASSANI JWM. Instrumentation for measurement of intracellular Ca^{2+} concentration: effects of beta-adrenergic stimulation on isolated cardiac myocytes. **Braz J Biom Eng** 23: 123-130, 2007.

SPAETH CS; BOYDSTON EA; FIGARD LR; ZUZEK A; BITTNER GD. A model for sealing plasmalemmal damage in neurons and other eukaryotic cells. **J Neurosci** 30: 15790-15800, 2010.

SPAETH CS; SPAETH EA; WILCOTT R; FAN JD; ROBISON T; BITTNER GD. Pathways for plasmalemmal repair mediated by PKA, Epac and cytosolic oxidation in rat B104 cells in vitro and rat sciatic axons ex vivo. **Dev Neurobiol** (Accepted, unedited articles published online for future issues), 2011.

STEENDIJK P. Optimizing the shape of defibrillation shocks. **Crit Care Med** 37: 2482-2483, 2009.

STEINBERG SF. The molecular basis for distinct β -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. **Circ Res** 85: 1101-1111, 1999.

STEINFATH M; CHEN YY; LAVICKY J; MAGNUSSEN O; NOSE M; ROSSWAG S; SCHMITZ W; SCHOLZ H. Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. **Br J Pharmacol** 107: 185-188, 1992.

STEINHARDT R; BI G; ALDERTON J. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. **Science** 263: 390-393, 1994.

TANG W; WEIL MH; SUN S; POVOAS HP; KLOUCHE K; KAMOHARA T; BISERA J. A comparison of biphasic and monophasic waveform defibrillation after prolonged ventricular fibrillation. **Chest** 120: 948-954, 2001.

TAREK M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. **Biophys J** 88: 4045-4053, 2005.

TEISSIÉ J; GOLZIO M; ROLS MP. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. **Biochim Biophys Acta** 1724: 270-280, 2005.

TERASAKI M; MIYAKE K; McNEIL PL. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca^{2+} -dependent vesicle-vesicle fusion events. **J Cell Biol** 139: 63-74, 1997.

THAKUR P; STEVENS DR; SHENG Z-H; RETTIG J. Effects of PKA-mediated phosphorylation of snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. **J Neurosci** 24: 6476-6481, 2004.

THAN A; YE F; XUE R; ONG JW; POH CL; CHEN P. The crosstalks between adipokines and catecholamines. **Mol Cell Endocrinol** 332: 261-270, 2011.

TIELEMAN DP. The molecular basis of electroporation. **BMC Biochem** 5: 1-12, 2004.

TOGO T; ALDERTON JM; BI GQ; STEINHARDT RA. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. **J Cell Sci** 112: 719-731, 1999.

TOGO T; KRASIEVA TB; STEINHARDT RA. A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. **Mol Biol Cell** 11: 4339-4346, 2000.

TOULLEC D; PIANETTI P; COSTE H; BELLEVERGUE P; GRAND-PERRET T; AJAKANE M; BAUDET V; BOISSIN P; BOURSIER E; LORIOLE F. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. **J Biol Chem** 266: 15771-15781, 1991.

TOVAR O; TUNG L. Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 263: H1128-H1136, 1992.

TOVAR OH; JONES JL. Epinephrine facilitates cardiac fibrillation by shortening action potential refractoriness. **J Mol Cell Cardiol** 29: 1447-1455, 1997.

TRAYANOVA N. Concepts of ventricular defibrillation. **Philos Transact A Math Phys Eng Sci** 359: 1327-1337, 2001.

TSAI MS; TANG W; SUN S; WANG H; FREEMAN G; CHEN WJ; WEIL MH. Individual effect of components of defibrillation waveform on the contractile function and intracellular calcium dynamics of cardiomyocytes. **Crit Care Med** 37: 2394-2401, 2009.

TSONG TY. Electroporation of cell membranes. **Biophys J** 60: 297-306, 1991.

TUNG L. Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle. **Proc IEEE** 84: 366-378, 1996.

TUNG L; SLIZ N; MULLIGAN M. Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. **Circ Res** 69: 722-730, 1991.

TUNG L; TOVAR O; NEUNLIST M; JAIN SK; O'NEILL RJ. Effects of strong electrical shock on cardiac muscle tissue. **Ann N Y Acad Sci** 720: 160-175, 1994.

TURAKHIA M; TSENG ZH. Sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapy. **Curr Probl Cardiol** 32: 501-546, 2007.

VAN UITERT I; LE GAC S; VAN DEN BERG A. The influence of different membrane components on the electrical stability of bilayer lipid membranes. **Biochim Biophys Acta** 1798: 21-31, 2010.

VERHOVEN B; SCHLEGEL RA; WILLIAMSON P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **J Exp Med** 182: 1597-1601, 1995.

VETTER FJ; SIMONS SB; MIRONOV S; HYATT CJ; PERTSOV AM. Epicardial fiber organization in swine right ventricle and its impact on propagation. **Circ Res** 96: 244-251, 2005.

VIANA MA. **Projeto, construção e testes de um desfibrilador multidirecional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011. 78 p.

VOSTRIKOV V; GORBUNOV B; GUSEV A; GUSEV D; ITKIN G; KONYSHEVA E; MAMEKIN K; NESTERENKO I; SELISHCHEV S; TELYSHEV D. Comparative study of efficiency of trapeziform, rectilinear, and quasi-sinusoidal gurvich–venin bipolar defibrillation pulses based on high-resistance experimental animal simulation. **Biom Eng** 44: 201-205, 2011.

WALCOTT GP; KILLINGSWORTH CR; IDEKER RE. Do clinically relevant transthoracic defibrillation energies cause myocardial damage and dysfunction? **Resuscitation** 59: 59-70, 2003.

WALCOTT GP; MELNICK SB; CHAPMAN FW; JONES JL; SMITH WM; IDEKER RE. Relative efficacy of monophasic and biphasic waveforms for transthoracic defibrillation after short and long durations of ventricular fibrillation. **Circulation** 98: 2210-2215, 1998.

WEAVER JC. Molecular basis for cell membrane electroporation. **Ann N Y Acad Sci** 720: 141-152, 1994.

WEAVER JC; CHIZMADZHEV YA. Theory of electroporation: a review. **Bioelectrochem Bioenerg** 41: 135-160, 1996.

WESTERMANN P; KNOBLICH M; MAIER O; LINDSCHAU C; HALLER H. Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. **Biochem J** 320: 651-658, 1996.

WINKLE R; MEAD R; RUDER M; SMITH N; BUCH W; GAUDIANI V. Effect of duration of ventricular fibrillation on defibrillation efficacy in humans. **Circulation** 81: 1477-1481, 1990.

WOLF H; ROLS MP; BOLDT E; NEUMANN E; TEISSIÉ J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. **Biophys J** 66: 524-531, 1994.

WOODHOUSE SP; LEWIS-DRIVER D; ELLER H. Catecholamines during cardiopulmonary resuscitation for cardiac arrest. **Resuscitation** 24: 263-272, 1992.

WORTSMAN J; FRANK S; CRYER PE. Adrenomedullary response to maximal stress in humans. **Am J Med** 77: 779-784, 1984.

XIANG YK. Compartmentalization of β -adrenergic signals in cardiomyocytes. **Circulation Research** 109: 231-244, 2011.

YABE S; SMITH W; DAUBERT J; WOLF P; ROLLINS D; IDEKER R. Conduction disturbances caused by high current density electric fields. **Circ Res** 66: 1190-1203, 1990.

ZIMMERMANN D; ZHOU A; KIESEL M; FELDBAUER K; TERPITZ U; HAASE W; SCHNEIDER-HOHENDORF T; BAMBERG E; SUKHORUKOV VL. Effects on capacitance by overexpression of membrane proteins. **Biochem Biophys Res Commun** 369: 1022-1026, 2008.

ZIMMERMANN U; PILWAT G; RIEMANN F. Dielectric breakdown of cell membranes. **Biophys J** 14: 881-899, 1974.

ZIPES DP; FISCHER J; KING RM; DEB. NICOLL A; JOLLY WW. Termination of ventricular fibrillation in dogs by depolarizing a critical amount of myocardium. **Am J Cardiol** 36: 37-44, 1975.

ANEXO - CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

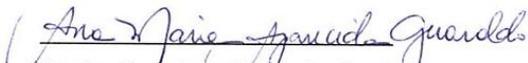
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

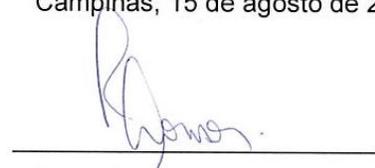
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos: Vulnerabilidade de miócitos cardíacos ao efeito letal de campos elétricos de alta intensidade: efeito da estimulação β -adrenérgica" (protocolo nº 2490-1 (B)), sob a responsabilidade de José W.M. Bassani e Rosana A. Bassani / Jair Trapé Goulart, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de agosto de 2011.

Campinas, 15 de agosto de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alenso
Secretária Executiva

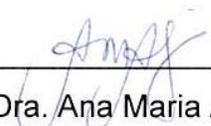
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

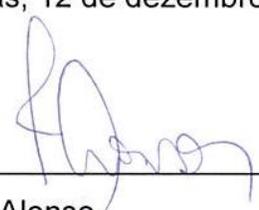
Certificamos que o projeto "**B. Vulnerabilidade de miócitos cardíacos ao efeito letal de campos elétricos de alta intensidade: efeito da estimulação beta-adrenérgica**" (protocolo nº **2587-1 (B)**), sob a responsabilidade de **José W.M. Bassani / Rosana A. Bassani / Jair Trapé Goulart**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **12 de dezembro de 2011**.

Campinas, 12 de dezembro de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva