UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Arritmogênese por Catecolaminas em Miocárdio Atrial e Ventricular de Ratos: Metodologia e Tipos de Adrenoceptores Envolvidos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Denile Cominato Boer Orientadores: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Curso: Engenharia Elétrica Área de concentração: Engenharia Biomédica

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

> Campinas 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Arritmogênese por Catecolaminas em Miocárdio Atrial e Ventricular de Ratos: Metodologia e Tipos de Adrenoceptores Envolvidos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Denile Cominato Boer Orientadores: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani DEB, FEEC, UNICAMP

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button DEB, FEEC, UNICAMP

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch Depto Fisiologia, IB, UNICAMP

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior Depto Farmacologia, FCM, UNICAMP

> Campinas 2006

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

B633a	Boer, Denile Cominato Arritmogênese por catecolaminas em miocárdio atrial e ventricular de ratos: metodologia e tipos de adrenoceptores envolvidos / Denile Cominato BoerCampinas, SP: [s.n.], 2006.
	Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana Almada Bassani Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.
	1. Arritmia. 2. Miocárdio. 3. Catecolaminas. 4. Adrenoceptores alfa. 5. Adrenoceptores beta. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Titulo em Inglês: Arrhythmogenesis by Catecholamines in Atrial and Ventricular Rat Myocardium: Methodology and Types of Adrenoceptors. Palavras-chave em Inglês: Atrial myocardium, Ventricular myocyte, Arrhythmias, Catecholamines, Adrenergic receptors, Electrical

stimulation, Concentration-effect curve.

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Vera Lúcia da Silveira Nantes Button, Regina Celia Spadari-Bratfisch e Heitor Moreno Júnior.

Data da defesa: 30/01/2006

De tudo ficaram três coisas: A certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. (Fernando Pessoa)

Dedico este trabalho a minha família: meus pais, José e Maria, minhas irmãs, Juliana e Camila, minha "filhinha": Marola, e a minha amiga inseparável: Cajá, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis. AMO VOCÊS!

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram com este trabalho:

Aos meus pais, Maria R. C. Boer e José Luiz Boer, por todo apoio e incentivo.

De maneira especial, agradeço a Dra. *Rosana Almada Bassani* que no papel de orientadora, demonstrou extrema paciência, dedicação, apoio e carinho. Ao Dr. *José Wilson Magalhães Bassani*, especialmente pelos ensinamentos e apoio.

Agradeço, também, aos Professores do Departamento de Engenharia Biomédica, aos engenheiros, técnicos e estagiários dos laboratórios de apoio a pesquisa básica e apoio ao desenvolvimento, especialmente a *Sra Elizângela S. Oliveira, Srta Mariana Mamede e Sra Ana Carolina Fantin*, pelo excelente apoio técnico e pela amizade franca de todos estes anos.

Aos amigos: Wei Lai, Pedro X. Oliveira, Nivaldo Zafalon Jr, Rafael A. Ricardo, Diogo, Matheus Erthal, Sergio, Larissa, Sandro Ferraz e Beatriz MR Carvalho, pela amizade e contribuições técnicas.

A amiga verdadeira, *Luciane C Alberici*, por todas "discussões" biológicas, pelas ajudas na busca de informações, referências, e nas correções deste trabalho, mas principalmente pela paciência, compreensão e carinho.

Apoio

Este trabalho teve o apoio da Fapesp (Proc.: 00/14595-6)

RESUMO

Embora haja demonstração de que a estimulação simpática tenha efeito facilitatório sobre a indução de atividade espontânea em miocárdio há controvérsia sobre a participação dos tipos de adrenoceptores na mediação deste efeito. No presente trabalho, descrevemos um método desenvolvido para determinação, em átrio esquerdo isolado (AE) de rato, da relação concentração-efeito para agentes que exercem efeito arritmogênico por aumento da mobilização celular de Ca²⁺. O método baseou-se na interposição de pausas estimulatórias, durante as quais registraram-se contrações espontâneas (CE), precedidas ou não por trens estimulatórios de alta fregüência (5 Hz). O protocolo estimulatório foi repetido na presença de diferentes concentrações de agonistas. Para cada concentração de agonista, a resposta arrítmica foi considerada como a soma dos números de CE/min, no total de preparações. Foi analisada também a resposta inotrópica, como sendo o incremento de forca ou encurtamento de pico, desenvolvidos em AE e miócitos ventriculares (MV), respectivamente. A relação foi ajustada por uma função sigmóide para cálculo de *Min* (i.e., valor da variável na ausência do agonista), *Rmax* (resposta máxima) e pD_2 (-log da concentração do agonista que produziu uma resposta igual a 50% de Rmax). Este método foi aplicado no estudo dos tipos de adrenoceptores envolvidos na resposta arrítmica a catecolaminas em AE e MV. A Rmax inotrópica à ativação de adrenoceptores $\alpha_1+\beta_1$ foi comparável àquela por ativação de apenas receptores β_1 , em ambos AE e MV. Já a ativação de adrenoceptores α_1 produziu uma Rmax inotrópica de apenas metade daguela observada pela estimulação $\alpha_1+\beta_1$. Da mesma forma, a resposta arrítmica foi semelhante para estimulação de adrenoceptores $\alpha_1+\beta_1$ e de apenas receptores β_1 . Entretanto, nenhuma resposta foi obtida pela estimulação de receptores adrenérgico do tipo α_1 . Estes resultados indicam que a estimulação de adrenoceptores α_1 , apesar de evocar uma resposta inotrópica positiva em ambos AE e MV, não é arritmogênica. A ativação do tipo β , por outro lado, parece ser a principal via para estimulação inotrópica simpática e na indução de arritmias. Além disso, concluímos que parece existir antagonismo funcional entre os subtipos de adrenoceptores β , manifestado por ações pró- e anti-arrítmicas dos subtipos β_1 e β_2 , respectivamente, em miocárdio (tanto atrial, quanto ventricular) de rato.

ABSTRACT

Although it has been shown that sympathetic stimulation facilitates the appearance of myocardial spontaneous activity, it is still not clear which types of adrenoceptors mediate this effect. In this study, we describe a method developed for determination, in isolated rat atria (AE), of the concentration-effect relationship for arrhythmogenic agents that act via promotion of cell Ca²⁺ overload. The method was based on the interposition of stimulatory rest periods, during which spontaneous contractions (CE) were recorded, preceded or not by high frequency (5 Hz) stimulus trains. The stimulation protocol was applied at each agonist concentration, and the arrhythmic response was taken as the sum of the number of CE/min in all preparations. The positive inotropic response was considered as the agonist-dependent increment of developed force or peak shortening in AE and isolated ventricular myocytes (MV), respectively. Concentration-effect curves were determined by fitting a sigmoid function, from which the following parameters were estimated: Min (i.e., value of the variable in the absence of the agonist), Rmax (maximal response) e pD_2 (-log of the molar agonist concentration that evokes a response equal to 50% of Rmax). This method was applied to investigate the adrenoceptor types involved in the mediation of catecholamine-induced arrhythmogenesis in AE and MV. Inotropic Rmax to activation of $\alpha_1+\beta_1$ adrenoceptors was comparable to that of activation of solely β_1 adrenoceptors in both AE and MV. However, Rmax to selective α_1 adrenoceptor activation was only half of that produced by $\alpha_1+\beta_1$ adrenoceptor stimulation. The arrhythmic responses to $\alpha_1+\beta_1$ and β_1 receptor stimulation were similar, but selective α_1 adrenoceptor activation was unable to evoke any spontaneous activity. The results indicate that α_1 adrenoceptors, although able to mediate stimulation in both AE and MV, are not involved in arrhythmogenesis. β adrenoceptor activation, thus, seems the main type involved in both inotropic and arrhythmic responses to catecholamines. In addition, our results point out a functional antagonism between β-adrenoceptor subtypes: i.e., pro- and anti-arrhythmic effects mediated by β_1 and β_2 -adrenoceptors, respectively in both atrial and ventricular rat myocardium.

Lista de Abreviaturas

0,5 Hz + 1 pausa: protocolo estimulatório com um único período de pausa de 1 min, com estimulação pré-pausa a 0,5 Hz

0,5 Hz + 3 pausas: protocolo estimulatório com três períodos de pausa de 1 min, com 30 s de estimulação pré-pausa a 0,5 Hz

5 Hz + 1 pausa: protocolo estimulatório com um único período de pausa de 1 min, com 30 s de estimulação pré-pausa a 5 Hz

5 Hz + 3 pausas: protocolo estimulatório com três períodos de pausa de 1 min, com 30 s de estimulação pré-pausa a 5 Hz

- AC adenilato ciclase
- ACh acetilcolina
- Adr adrenalina
- AE átrio esquerdo
- AEC acoplamento excitação-contração
- AMPc monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina
- ATP trifosfato de adenosina
- ATR atropina
- BUT butoxamina
- [Ca²⁺]_i concentração intracelular de Ca²⁺
- Caff cafeína
- CCD charge coupled device
- CE contrações espontâneas
- CR comprimento celular de repouso
- DAD pós-despolarização tardia
- DAG diacilglicerol
- DBV detector de borda de sinal de vídeo
- E_{ca} potencial de equilíbrio de Ca²⁺
- E_{Na} potencial de equilíbrio de Na⁺
- Erev potencial de reversão
- EAD pós-despolarização precoce

EC₅₀ - concentração efetiva que evoca uma resposta de amplitude de 50% da resposta máxima

EP - erro-padrão

FA - fibrilação atrial

FKBP12.6 - calstabilina

FV - fibrilação ventricular

- GDP difosfato de guanosina
- GTP trifosfato de guanosina
- IP3 1,4,5-inositoltrifosfato
- ISO isoproterenol
- [K]_o concentração extracelular de K⁺

LE50 - concentração de um dado agente químico que causa morte em 50% da população

estudada

- LED light emmiting diode
- Max valor máximo da variável atingido após saturação da resposta
- MET metoprolol
- MF miofilamentos
- Min valor basal da variável antes da adição do agonista
- MV miócito ventricular
- N número de experimentos
- NA noradrenalina
- NCX trocador Na⁺-Ca²⁺
- PA potencial de ação

pD2 - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta

- igual a 50% da resposta máxima
- PDE fosfodiasterases
- PHE fenilefrina
- PHT fentolamina
- PI3K fosfoinositídeo 3-quinase
- PKA proteína quinase A
- PKC proteína quinase C
- PKI proteína quinase inibidora de PKA
- PLC fosfolipase C
- PLB fosfolambam
- PLM fosfolemman
- PRO propranolol
- PTX toxina pertússica

Rmax - diferença entre Max e Min

- RS retículo sarcoplasmático
- RyR receptor de rianodina
- SAL salbutamol
- SERCA ATPase de Ca2+ do retículo sarcoplasmático
- Tnl troponina l
- VCR aparelho gravador de vídeo cassete
- V_m potencial de membrana

Sumário

1. Introdução	
1.1 – Função Geral do Coração	01
1.2 – Acoplamento Excitação-Contração	03
1.3 – Receptores Adrenérgicos em Átrios e Ventrículos	05
1.4 – Arritmias Cardíacas	08
1.5 – Atividade Elétrica Espontânea	09
1.6 – Mecanismos Responsáveis pela Facilitação de	
Atividade Espontânea por Catecolaminas	11
1.7 – Quantificação do Efeito Arritmogênico de Catecolaminas	14
2. Objetivos	17
3. Materiais e Métodos	
3.1 – Animais	18
3.2 – Átrios Esquerdos Isolados	18
3.3 – Miócitos Ventriculares Isolados	19
3.4 – Soluções e Fármacos Utilizados	22
3.5 – Metodologia Desenvolvida para Quantificação	
da Relação entre Concentração do Agonista e	
seu Efeito Arritmogênico	25
3.6 – Análise dos Resultados	27
4. Resultados	
4.1 – Quantificação da Relação entre Concentração	
do Agonista e Resposta Arritmogênica em	
Átrios Esquerdos Isolados de Rato	29
4.2 – Participação de Tipos e Subtipos de Adrenoceptores	
nas Respostas Arrítmica e Inotrópica a Catecolaminas	
em Átrios Esquerdos e Miócitos Ventriculares de Rato	37
5. Discussão e Conclusões	
5.1 – Método Desenvolvido para Determinação da	
Relação Concentração-Efeito Arritmogênico em	
Preparações Isoladas	53

3.2 – Amimogenese Cardiaca induzida por Calecolaminas.	57	
Adrenoceptores Alfa e Beta	57	
5.3 – Arritmogênese Cardíaca Induzida por Catecolaminas:		
Subtipos de Adrenoceptores Beta	59	
5.4 – Conclusões finais	64	
6. Referências bibliográficas		

Capítulo 1

Introdução

1.1 Função Geral do Coração

O coração é um órgão muscular cuja função é bombear o sangue para todo o corpo, levando nutrientes e removendo os produtos do metabolismo das células do organismo. É composto de quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, que funcionam como duas bombas ligadas em série e ejetam sangue para as circulações pulmonar e sistêmica. A comunicação entre as câmaras atriais e ventriculares é feita através de válvulas presentes no septo atrioventricular, que se abrem e fecham de acordo com o gradiente de pressão. A eficiência do bombeamento do coração requer atividade rítmica e coordenada dos átrios e ventrículos, segundo um padrão seqüencial de excitação e contração (Guyton, 1988; Opie, 1998).

O ritmo cardíaco normal depende de um sistema intrínseco de auto-excitação e condução, composto de estruturas celulares diferenciadas, capazes de gerar e propagar de forma organizada a atividade elétrica por todas as câmaras do coração. Quando este sistema funciona adequadamente, os ventrículos se contraem cerca de um sexto de segundo após os átrios (permitindo um enchimento adicional antes que o sangue seja bombeado para a circulação pulmonar e periférica), e todas as partes dos ventrículos se contraem em seu tempo, o que é essencial para uma geração eficaz de pressão nas câmaras ventriculares. (Opie, 1998).

No coração, a variação do potencial de membrana (V_m) na direção do potencial limiar ocorre devido à estimulação elétrica, fisiológica ou não, da célula. Embora as células miocárdicas sejam independentemente excitáveis, elas são interligadas por estruturas juncionais complexas (discos intercalados), onde se encontram conexões de baixa resistência (*gap junctions*, Garcia, 1997). Este tipo de junção, no qual as membranas de células adjacentes estão muito próximas e existem canais transcelulares formados por conexinas, permite que a ativação elétrica de uma célula se propague para outra por meio do acoplamento espacial de corrente (teoria dos circuitos locais, Aidley, 1989). A atividade elétrica desencadeia a atividade contrátil. O processo funcional que acopla a excitação elétrica da membrana (chamada *sarcolema*, no caso de células

musculares) e a subseqüente contração é denominado acoplamento excitação-contração (AEC). A atividade contrátil das células do coração é iniciada por uma forma de onda conhecida como potencial de ação (PA), que consiste de uma variação rápida de V_m a partir do valor diastólico de repouso (cerca de -85 mV). Durante o PA, ocorre rápida despolarização da membrana e reversão de V_m (que pode atingir um valor máximo de 20 a 40 mV), seguida de retorno ao potencial de repouso (Garcia, 1997).

As células de diferentes regiões do coração apresentam PA com formas de onda e cursos temporais diferentes. O PA típico dos miócitos ventriculares pode ser dividido em cinco fases (Figura 1.1): 1) <u>fase 0</u>: corresponde a uma rápida despolarização, devida ao aumento rápido da condutância da membrana ao Na⁺, com reversão de V_m; 2) <u>fase 1</u>: repolarização inicial e parcial; 3) <u>fase 2</u>: platô em torno de zero mV; 3) <u>fase 3</u>: repolarização final, durante a qual V_m retorna para o valor de repouso; 4) <u>fase 4</u>: fase diastólica (potencial de repouso), que dura até a ocorrência de um novo PA (Garcia, 1997; Bers 2001).



Figura 1.1: Potencial de ação típico de um miócito ventricular com suas respectivas fases: fase 0, despolarização rápida; fase 1, repolarização inicial; fase2, platô; fase 3, repolarização final; fase 4, potencial de repouso. Modificado de Bers (2001).

1.2 Acoplamento Excitação-Contração

O AEC inicia-se quando, devido à despolarização inicial da membrana, V_m atinge o limiar de excitação, que é o valor de V_m no qual ocorre abertura de um número crítico de canais de Na⁺ dependentes de tensão elétrica, presentes na membrana. A decorrente despolarização da membrana resulta na abertura de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes do sarcolema, especialmente do tipo L (ativados a partir de potenciais positivos a –30 mV; Bean, 1988). Quando ativados, estes canais conduzem uma corrente despolarizante que contribui para a manutenção da fase de platô do PA ventricular, bem como para a fase de despolarização do PA em células marcapasso nodais (Hagiwara *et al.*, 1988; Bers, 2001).

A Figura 1.2 ilustra os principais elementos celulares envolvidos no processo de AEC no músculo cardíaco. Durante a atividade elétrica, Ca²⁺ entra na célula por meio de canais de Ca²⁺ voltagem-dependente do sarcolema. Embora o influxo de Ca²⁺ através destes canais possa contribuir modestamente para aumentar a concentração citosólica de Ca²⁺ livre ([Ca²⁺]_i) durante um batimento (em miocárdio de mamíferos, o influxo responde por apenas 10% a 15% da elevação de [Ca²⁺]_i, Delbridge *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Bers, 2001), a principal fonte do Ca²⁺ ativador da contração é o retículo sarcoplasmático (RS), importante sítio de armazenamento de Ca²⁺ em células cardíacas. O RS apresenta em sua membrana canais de Ca²⁺ que são também chamados de receptores de rianodina (RyR), em virtude de sua capacidade de ligação com alta afinidade a este alcalóide. Através desses canais, que estão situados em imediata aposição ao sarcolema, ocorre liberação de grande quantidade de Ca²⁺ para o citosol (Scriven et al., 2000). O RyR miocárdico é ativado por Ca²⁺ na faixa de concentração micromolar (Coronado et. al., 1994; Fill e Copello, 2002), que é atingida no espaço subsarcolêmico durante um PA (Weber *et al.*, 2002). A co-localização de sítios identificados como canais de Ca²⁺ do tipo L do sarcolema e RyR na membrana do RS em miócitos ventriculares oferece a estes últimos um acesso privilegiado ao Ca²⁺ que entra na célula através dos primeiros. Este mecanismo, chamado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (*Ca*²⁺-*induced Ca*²⁺ *release*) é o mecanismo mais aceito para AEC no coração (Fabiato, 1983). O grande aumento de [Ca²⁺]_i devido à liberação de Ca²⁺ pelo RS favorece a interação do íon com a troponina C presente nos filamentos finos do sarcômero, pela ocupação dos sítios de ligação de Ca2+ dessa molécula. Isto permite que ocorra a interação entre actina e miosina, e, portanto, o desenvolvimento de tensão mecânica e o encurtamento dos miócitos.



Figura 1.2: Principais mecanismos participantes no acoplamento excitação-contração e relaxamento da célula cardíaca: retículo sarcoplasmático (RS); mitocôndria (Mito); trocador Na⁺-Ca²⁺ (NCX); ATPase de Ca²⁺ do sarcolema (ATP); ATPase de Ca²⁺ do RS (SERCA); miofilamentos (MF). Está também representado o fosfolamban (PLB), regulador endógeno de SERCA. Modificado de Oliveira, 2004.

Uma outra via de influxo de Ca²⁺ presente no sarcolema seria o trocador Na⁺-Ca²⁺ (NCX), um mecanismo de contra-transporte que pode transportar Ca²⁺ em ambos os sentidos (efluxo, modo direto; e influxo, modo reverso), dependendo do potencial de membrana e dos gradientes de concentração transmembrana de Na⁺ e Ca²⁺ (Blaustein e Lederer, 1999). Em condições fisiológicas, no entanto, o influxo de Ca²⁺ pelo NCX não parece ser importante para o AEC no coração, e o gatilho relevante do mecanismo de liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ parece ser a corrente de Ca²⁺ através de canais do tipo L (Näbauer *et al.*, 1989; Bouchard *et al.*, 1993; Sipido *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2002).

O relaxamento miocárdico, por outro lado, requer que Ca^{2+} se dissocie de seus sítios de ligação na troponina C, e isto só pode ocorrer se $[Ca^{2+}]_i$ retornar a seu valor diastólico, por remoção de Ca^{2+} do citosol. Há, no miócito cardíaco, diversos transportadores que removem Ca^{2+} do citosol para compartimentos intracelulares ou para o meio extracelular, a uma taxa dependente de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1.2). Em miocárdio de mamíferos, o relaxamento depende principalmente da captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), que é regulada pela proteína fosfolamban (PLB), e é responsável por 70% a 90% do fluxo de Ca^{2+} associado ao relaxamento. O NCX, operando no modo direto, tem participação de 7% a 30% do fluxo total de remoção do Ca^{2+} citosólico, dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento (Bers e Bridge, 1989; Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994a,b; Trafford *et al.*, 1997; Bers, 2001; Bassani e Bassani, 2002). Outras vias de transporte, tais como a ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e a captação mitocondrial de Ca^{2+} , não parecem desempenhar um papel substancial no relaxamento de contrações fisiológicas (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994a,b; Trafford *et al.*, 1997; Bers, 2001; Bassani e Bassani, 2002).

1.3 Receptores Adrenérgicos em Átrios e Ventrículos

A estimulação de receptores adrenérgicos por catecolaminas funciona como um dos mais importantes mecanismos regulatórios do desempenho cardiovascular, modulando freqüência e força de contração cardíaca, por alterar as propriedades funcionais de canais iônicos e de componentes do AEC. Os receptores adrenérgicos foram classificados como α (excitatórios) e β (inibitórios) por Ahlquist (1948), com base no seu papel funcional nos vasos sanguíneos, isto é, vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente. A série de potência de agonistas característica dos adrenoceptores α é: adrenalina (Adr) > noradrenalina (NA) >> isoproterenol (ISO), enquanto que, para adrenoceptores β , a série é: ISO > Adr > NA. Esta classificação de Ahlquist foi expandida por Lands et al (1967a,b), que reconheceram que cada um dos tipos de adrenoceptores, $\alpha \in \beta$, poderia ser categorizado em 2 subtipos distintos, com base nas potências relativas de agonistas. Estes tipos foram posteriormente subdivididos em α_1 e α_2 (Langer, 1974), e $\beta_1 e \beta_2$ (Lands *et al.*, 1967a,b).

Os adrenoceptores são glicoproteínas localizadas na membrana plasmática de células de vários tecidos, inclusive o miocárdico, onde predominam aqueles do tipo β . Ventrículos direitos e esquerdos de humanos possuem receptores do tipo α_1 numa densidade cerca de 1/8 daquela de adrenoceptores β . Em humanos, a densidade de

receptores α_1 é menor do que em outros mamíferos, como coelho, porco, cobaia, camundongo ou rato (Bristow *et al.*, 1988; Steinfath *et al.*, 1992; Brodde e Michel, 1999). Nesta última espécie, a densidade de receptores α_1 ventriculares é mais de 5 vezes maior do que nas demais espécies de mamíferos (Steinfath *et al.*, 1992). Entre os três subtipos dos adrenoceptores α_1 (α_{1A} , $\alpha_{1B} e \alpha_{1D}$), o primeiro é o mais abundante em tecido cardíaco humano (Price. *et al.*, 1994a,b; Brodde e Michel, 1999), mas no coração de rato, os receptores do subtipo α_{1B} são mais abundantes (Price. *et al.*, 1994 a,b; Wolff *et al.*, 1998). Por outro lado, receptores do subtipo α_2 estão ausentes no miocárdio de todas as espécies de mamíferos estudadas. Este subtipo tem localização eminentemente préjuncional, atuando na inibição pré-sináptica da liberação de NA das terminações simpáticas (Rump *et al.*, 1995 a,b).

As vias de transdução bioquímica funcionalmente associadas a adrenoceptores α e β envolvem o acoplamento do receptor a proteínas multiméricas ligantes de nucleotídeos de guanina (proteínas G), que atuam como chaves (*switch*) moleculares e sensores da ocupação dos receptores a elas acoplados. As proteínas G são constituídas de três subunidades (alfa, beta e gama), sendo a subunidade α a porção catalítica (i.e., possui atividade hidrolítica de trifosfato de guanosina, GTP). Diferentes receptores de membrana estão acoplados a proteínas G que contêm diferentes tipos de subunidades alfa (Gs, Gi, Gq, etc). Em estado de repouso, a subunidade α está ligada a uma molécula de difosfato de guanosina (GDP). Quando o complexo agonista-receptor acopla-se ao complexo trimérico da proteína G, ocorre a troca de GDP ligado à subunidade α por GTP o que faz com que a subunidade α se dissocie do complexo trimérico e se associe a outra enzima, mudando a atividade desta. Posteriormente, o GTP é hidrolisado em GDP e fosfato inorgânico, e a subunidade α volta a se associar com as demais subunidades da proteína G (Lefkowitz *et al.*, 1982; Limbird, 1984; Stiles *et al.*, 1984).

A resposta inotrópica positiva induzida pela estimulação de receptores adrenérgicos α_1 está associada à ativação da fosfolipase C (PLC), pela ação da subunidade α q da proteína G acoplada ao receptor. PLC hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (presente na membrana plasmática) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositoltrifosfato (IP3). Este, por sua vez, evoca liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares (RS), por sua ligação a sítios receptores de IP3, presentes em um tipo de canal de Ca²⁺ na membrana do RS, que é diferente do RyR. Por outro lado, DAG desempenha um papel na ativação da proteína quinase dependente de Ca²⁺ (PKC), cujos

6

substratos incluem o canal de Ca²⁺ do sarcolema tipo L, canal de K⁺ (Kv4.2), troponina I (presente nos filamentos finos do sarcômero) e o trocador Na⁺-H⁺. A estimulação da atividade deste trocador leva à alcalinização intracelular (pela extrusão do íon H⁺), que resulta num aumento da afinidade dos miofilamentos ao Ca²⁺. É possível que também ocorra aumento do influxo total de Ca²⁺ devido a prolongamento do PA pela inibição da corrente de K⁺ responsável pela fase de repolarização inicial (Endoh *et al.*, 1991; Terzic *et al.*, 1993; Patel e Campbell, 2005).

O conceito de homogeneidade da população de adrenoceptores β , isto é, a concepção de que somente um subtipo de receptor β existiria em um determinado tecido, foi desafiado quando Carlsson et al (1972) apresentaram evidência farmacológica de que ambos os subtipos 1 e 2 coexistiam em coração de gato. Minneman e et al (1979) demonstraram que 83% da população de adrenoceptores β no coração de rato são do subtipo β_1 e 17% do subtipo β_2 . Em corações humanos, a razão β_1 : β_2 está por volta de 60-70% : 30-40% em átrios, e 70-80% : 20-30% em ventrículos (Brodde, 1991).

A via de sinalização classicamente associada à ocupação de receptores β_1 e β_2 por agonistas consiste basicamente de: 1) formação do complexo agonista-receptor; 2) interação deste complexo com uma proteína G cuja subunidade α é do tipo α s (estimulatória), o que resulta no aumento da atividade catalítica da adenilato ciclase (AC) e conseqüente aumento da taxa de síntese de monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina (AMPc) por esta enzima; e 3) posterior ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) pelo nucleotídeo (Opie, 1998; Bers 2001).

A AC sintetiza AMPc a partir da hidrólise do ATP (trifosfato de adenosina). O AMPc atua como segundo mensageiro desta via, promovendo ativação da PKA pela dissociação da subunidade regulatória da unidade catalítica. Esta pode fosforilar diversas proteínas alvo envolvidas direta ou indiretamente no mecanismo do AEC, como: a) canal de Ca²⁺ do tipo L, aumentando a probabilidade de abertura do canal, o que possibilita uma maior entrada de Ca²⁺ na célula; b) PLB, o que remove a inibição sobre a SERCA, promovendo um aumento da taxa de recaptação de Ca²⁺ para o RS, e portanto, um aumento do conteúdo de Ca²⁺ nesta organela; c) troponina I (TnI), diminuindo a afinidade dos miofilamentos pelo Ca²⁺ do RS para o citosol (Bers, 2001; Saucerman *et al.*, 2003; Saucerman e McCulloch, 2004); e) inibidor endógeno I das fosfatases (fosfatases são enzimas que desfosforilam as fosfoproteínas), o que reduz a desfosforilação de substratos fosforilados por diferentes quinases, como a PKA (Carr *et al.*, 2002); e; f) o fosfolemman,

(PLM), que é uma subunidade regulatória da ATPase de Na⁺-K⁺ (principal mecanismo de extrusão de Na⁺), o que diminui a inibição da atividade da bomba por esta proteína regulatória (Bossuyt *et al.*, 2005).

1.4 Arritmias Cardíacas

O coração pode apresentar alterações do seu ritmo cardíaco normal, as chamadas arritmias, associadas a diversas condições, como, por exemplo, doença coronariana, doença de Chagas, doenças congênitas do sistema cardiovascular e eventos como acidentes traumáticos e choques elétricos. O principal problema gerado pelas arritmias é que elas afetam a eficiência de bombeamento do coração, podendo ser letais, principalmente as ventriculares (Opie, 1998; American Heart Association, 2005).

As arritmias podem ser classificadas pelo tipo de alteração do ritmo ou pela região do coração em que elas se manifestam. Os tipos de arritmias mais freqüentes incluem as taquicardias, caracterizadas pela freqüência maior que a normal (60 a 100 batimentos/min, em humanos), as bradicardias, com freqüências mais baixas do que a normal, e arritmias nas quais não há regularidade de ritmo. Quanto à localização podem ser classificadas como supraventriculares e ventriculares (Opie, 1998).

Dentre as arritmias cardíacas, as ventriculares representam um maior risco ao indivíduo, pois interferem diretamente no débito cardíaco e, portanto, na nutrição e oxigenação de todas as células do organismo, incluindo o próprio coração. A fibrilação ventricular (FV, ativação caótica e assíncrona das células ventriculares) é a arritmia responsável pela maioria das mortes súbitas em adultos. Nos Estados Unidos da América, a FV é a causa da maior parte das 340.000 mortes que ocorrem por ano em indivíduos portadores de doenças coronarianas (American Heart Association, 2005).

Apesar do seu menor potencial letal, a fibrilação atrial (FA) é mais comum em indivíduos sem doença cardíaca óbvia, afetando mais de 2,2 milhões de adultos norteamericanos (2-3% da população). Sua prevalência aumenta com o envelhecimento, chegando a 5% em pessoas acima de 60 anos e quase 10% em pessoas acima de oitenta anos (American Heart Association, 2005). A FA não é uma condição que, por si só, cause morte imediata, mas pode estar relacionado com alta incidência de fenômenos embólicos sistêmicos, os quais têm potencialmente conseqüências debilitantes irreversíveis e traumáticas, como deficiências neurológicas e até amputações (Lin *et al.*, 1996; Seidl *et al.*, 1998; Minamino *et al.*, 1999). Existe evidência de que a estimulação simpática possa estar relacionada ao aparecimento de arritmias. Durante o exercício ou na situação de insuficiência cardíaca, por exemplo, a estimulação dos nervos simpáticos pode aumentar as concentrações plasmáticas da NA em mais de 50 vezes e contribuir para o desenvolvimento de arritmias (Esler e Kaye, 2000). A ativação simpática pode ser importante também na geração de alguns tipos de FA em humanos, especialmente no período inicial após cirurgias. Há evidência de que pacientes que apresentam aumento da corrente de Ca²⁺ tipo L são mais propensos ao desenvolvimento de FA pós-cirúrgica, por favorecimento da sobrecarga miocárdica de Ca²⁺. Este aumento da corrente de Ca²⁺ pode ser resultado da estimulação β -adrenérgica em pacientes em condição pós-operatória (Nattel *et al.*, 2000). Sharifov et al (2004) demonstraram que a infusão direta de ISO e Adr na artéria do nodo sinoatrial de cães induz FA em 21% dos casos.

Catecolaminas desempenham um importante papel na indução de alterações do ritmo cardíaco. O efeito das catecolaminas parece ser causado pela ativação de receptores β -adrenérgicos e sua via de transdução pelo sistema AMPc-PKA. O aumento da taxa de despolarização espontânea diastólica em fibras cardíacas expostas a ação de catecolaminas endógenas ou exógenas pode levar ao desenvolvimento de taquiarritmias (Bhagat *et al.*, 1980). Kaumann e Sanders (1993) estudaram o envolvimento dos adrenoceptores β_1 e β_2 na indução de arritmias por catecolaminas endógenas em tecido isolado de átrio direito humano. Eles concluíram que tanto a NA, quanto a Adr, pode induzir arritmias atriais.

1.5 Atividade Elétrica Espontânea

Entre os mecanismos geradores de arritmias que causam anormalidades eletrofisiológicas relacionadas ao balanço de Ca²⁺, podem ser citados o automatismo ectópico e a atividade disparada. A diferença básica entre eles é a existência de um estímulo prévio (PA) à atividade disparada, enquanto o automatismo ocorre durante a fase de quiescência (diástole elétrica). No entanto, ambos os fenômenos se confundem no coração funcionante (Katzung e Morgenstern, 1977; Carmeliet, 1999; Bassani e Bassani, 2003).

Os focos ectópicos podem ser ocasionados por aumento da automaticidade de células marca-passo latentes ou do sistema de condução, ou ocorrência de automatismo disparado pela própria ativação elétrica em células miocárdicas, como no caso das pós-

despolarizações (*afterdepolarizations*). O aumento do automatismo em células que normalmente possuem despolarização diastólica espontânea pode ser ocasionado por estimulação β adrenérgica (Roden, 1996). Este automatismo pode ser gerado por modificação da dependência de voltagem para ativação e/ou inativação de canais iônicos, por estiramento, pelo estabelecimento de corrente de injúria (curto-circuito) nas bordas de regiões lesadas do miocárdio, e/ou em decorrência de liberação espontânea de Ca²⁺ do RS em condições de sobrecarga celular de Ca²⁺ (Bassani *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 2002; Bassani e Bassani, 2003; Shannon *et al.*, 2003).

Existem dois tipos principais de atividade disparada: a pós-despolarização precoce (*early after-depolarization*), que ocorre antes que se complete a repolarização da membrana durante um PA, e aquela tardia (*delayed after-depolarization*), que ocorre após retorno ao V_m diastólico (Bers, 2001). Pós-despolarizações precoces ocorrem geralmente quando há aumento da duração do PA e influxo de Ca²⁺ através de canais do sarcolema, que podem se reativar durante um platô/repolarização prolongado, ou, alternativamente, por correntes despolarizantes geradas pela extrusão de Ca²⁺. Por outro lado, a condição predisponente das pós-despolarizações tardias é a sobrecarga celular de Ca²⁺. Se a despolarização dos canais de Na⁺, é gerado um PA espontâneo, que pode ser propagado e iniciar um episódio de taquiarritmia sustentada, caso haja substrato para estabelecimento de circuitos reentrantes (Bassani e Bassani, 2003).

Uma importante influência sobre o ciclo de Ca²⁺ no miocárdio é a estimulação de receptores adrenérgicos, mediada por neurotransmissores simpáticos e catecolaminas circulantes. A ativação destes receptores pode alterar as propriedades dos componentes do AEC, devido a fosforilação dos próprios canais e transportadores de Ca²⁺ e/ou de proteínas regulatórias ligadas a eles, resultando em desenvolvimento de atividade espontânea.

Sob condições fisiológicas normais, o RS libera Ca²⁺ não apenas durante a sístole (em resposta ao influxo de Ca²⁺ durante o PA), mas também durante a diástole, embora a uma taxa consideravelmente menor (Bassani e Bers, 1995; Bassani *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 2002, Bassani e Bassani, 2003). O Ca²⁺ liberado pelo RS durante a diástole pode ter dois destinos: retornar à organela por meio de transporte pela SERCA, ou ser extruído através do sarcolema pelo NCX (Bassani e Bers, 1995). Esses transportadores, portanto, competem pelo mesmo substrato (Ca²⁺), e a fração de Ca²⁺ removida do meio intracelular pelo NCX depende das atividades relativas do trocador e da ATPase de Ca²⁺ do RS,

determinadas pela abundância das respectivas proteínas, bem como das condições que regem o transporte de Ca²⁺ por ambos os transportadores (Sutko *et al.*, 1986; Bers e Bridge, 1989; Bassani *et al.*, 1994b; 1995; Bassani e Bers, 1994). No caso do NCX, os principais determinantes são V_m e os potenciais de equilíbrio de Na⁺ (E_{Na}) e de Ca²⁺ (E_{ca}). A extrusão de Ca²⁺ pelo NCX é mais favorecida quanto menos negativo for seu potencial de reversão (E_{rev}) em relação a V_m (E_{rev} = 3 E_{Na} – 2 E_{Ca}, Mullins, 1981). Em valores diastólicos de V_m, o efluxo de Ca²⁺ pelo NCX é favorecido se houver aumento de [Ca²⁺]_i.

O transporte de Ca²⁺ pelo NCX é eletrogênico: para cada íon Ca²⁺ transportado, são transportados 3 íons Na⁺ em sentido contrário (Blaustein e Lederer, 1999) e isso gera o transporte transmembrana resultante de uma carga positiva, o que, no caso do trocador operando no modo efluxo de Ca²⁺, gera uma corrente de entrada que pode despolarizar a membrana até o potencial limiar de excitação (Schlotthauer e Bers, 2000). Há evidências de que a liberação de Ca²⁺ do RS e o subseqüente transporte eletrogênico de Ca²⁺ pelo NCX representam um mecanismo fisiológico que contribui para a geração da despolarização diastólica espontânea de células marcapasso nodais e, principalmente células marcapasso subsidiárias do átrio direito (Zhou e Lipsius, 1993; Bassani et al., 1997; Bogdanov et al., 2001). Neste último tipo celular, Ca²⁺ parece ser liberado do RS durante a diástole a uma taxa bem mais alta do que em miócitos atriais e ventriculares. (Bassani *et al.*, 1997). No entanto, na condição de sobrecarga de Ca²⁺, é possível detectar aceleração considerável da perda diastólica de Ca2+ do RS. Esta perda pode ser amplificada por prejuízo da função da SERCA, provavelmente em decorrência de acúmulo do Ca²⁺ liberado no espaço subsarcolêmico, que evocaria liberação adicional do íon pelo mecanismo de liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ (Bassani *et al.*, 1997, Shannon *et al.*, 2003). Nesta condição de sobrecarga de Ca2+, há evidências da geração de atividade espontânea em células miocárdicas tanto atrais, como ventriculares, pela extrusão via NCX (Pogwizd et al., 2001).

1.6 Mecanismos Responsáveis pela Facilitação de Atividade Espontânea por Catecolaminas

O papel da liberação diastólica de Ca²⁺ de um RS sobrecarregado tem sido considerado fundamental para a geração de atividade espontânea em células miocárdicas. Nessas circunstâncias, é comum o aparecimento de "ondas" de Ca²⁺, iniciadas em certas regiões do miócito e propagadas ao longo da célula, que são totalmente abolidas após inibição funcional do RS (Bassani e Bassani, 2003)

Balasubramaniam *et al.*, 2005). Experimentos realizados em nosso laboratório em miócitos ventriculares tratados com thapsigargin, bloqueador irreversível da ATPase de Ca²⁺ desta organela, mostraram total abolição de atividade espontânea, mesmo em condições indutoras de sobrecarga de Ca²⁺, como estimulação a alta freqüência na presença de catecolaminas (R.A. Bassani, resultados não publicados).

Zygmunt et al (1998) demonstraram que o agonista de adrenoceptores β , isoproterenol, pode induzir o aparecimento de pós-despolarizações tardias e atividade disparada, como resultado da ativação da corrente de entrada, via NCX, em miócitos ventriculares de cães. A influência relativa da ativação de receptores adrenérgicos α e β , por catecolaminas em elicitar pós-despolarização precoce (EADs) e tardias (DADs) também foi estudada por Priori e Corr (1990). Eles demonstraram que estimulação de adrenoceptores α resultou em prolongamento do PA, enquanto que o isoproterenol, em altas concentrações, evocou EADs e DADs. Este efeito foi abolido pela redução da concentração extracelular de Na⁺ extracelular, e por adição de rianodina e benzamil, o que mostra o envolvimento do RS e do NCX (operando em modo direto) na arritmogênese evocada pela estimulação β -adrenérgica.

Vários fatores afetam a taxa de liberação de Ca²⁺ (e/ou o balanço entre liberação e captação de Ca²⁺) pelo RS em miócitos cardíacos. Um dos fatores mais importantes é o próprio conteúdo de Ca²⁺ da organela: quanto maior a carga de Ca²⁺ do RS, maiores serão a quantidade de Ca²⁺ e a fração deste conteúdo liberada, tanto durante a sístole quanto na diástole (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000; Shannon *et al.*, 2002; Bassani e Bassani, 2003; Bassani *et al.*, 2004). Isso é o reflexo do balanço dinâmico funcional que ocorre entre a captação e a liberação de Ca²⁺ pelo RS, que atua de modo a manter o conteúdo de Ca²⁺ nessa organela relativamente constante (Lukyanenko *et al.*, 2001).

Um fator que pode estimular diretamente a liberação de Ca^{2+} do RS é a fosforilação dos RyR pela PKA. Essa quinase é ativada como resultado da ocupação de adrenoceptores β por mediadores simpáticos, ou da ativação de receptores serotoninérgicos por serotonina liberada de plaquetas (Yusuf *et al.*, 2003). Há sugestão de que, em condições de estimulação simpática moderada, o canal seja parcialmente fosforilado, o que pode favorecer a liberação sistólica de Ca²⁺ do RS e contribuir para a produção de efeito inotrópico positivo. Por outro lado, sob estimulação simpática massiva e/ou prolongada, ocorreria hiperfosforilação dos RyR, o que levaria à desestabilização do canal, com aumento do "vazamento" diastólico de Ca²⁺ da organela (Bers *et al.*, 2001;

Marx *et al.*, 2000; Bassani e Bassani, 2003). Este efeito seria mediado pela dissociação da calstabilina (FKBP12.6, proteína regulatória ligante de FK506), proteína acessória do complexo macromolecular do canal de Ca²⁺ do RS, do qual também fazem parte a própria PKA e fosfatases 1 e 2A. Estas últimas são enzimas que removem grupos fosfato de resíduos serina e treonina de substratos fosforilados. Há autores que propõem que a hiperfosforilação do RyR seja um evento que contribui para a geração de arritmias, pelo aumento do "vazamento" de Ca²⁺ do RS, durante a diástole (Scoote e Williams, 2002; Wehrens *et al.*, 2005).

A ativação da PKA pode favorecer o desenvolvimento de arritmias também por favorecer a sobrecarga de Ca²⁺ do RS, devido tanto a aumento do influxo de Ca²⁺ via canais voltagem-dependentes do sarcolema, quanto por aumento da velocidade de transporte de Ca²⁺ pela ATPase do RS. Este último efeito parece ser devido à fosforilação do PLB, cuja interação com a enzima diminui sua afinidade pelo substrato (Ca²⁺). Quando fosforilado, o PLB se dissocia da ATPase, o que aumenta a taxa de transporte de Ca²⁺ (Koss e Kranias, 1996; Opie, 1998; Bers *et al.*, 2001). O resultado final é aumento da concentração de Ca²⁺ no RS (Ginsburg e Bers, 2004), o que aumenta a taxa da liberação diastólica do íon (Shannon *et al.*, 2002).

Na literatura atual, parece não existir mais dúvidas quanto à importância da fosforilação da PLB e do canal de Ca²⁺ tipo L na regulação β -adrenérgica da resposta contrátil. Já o papel da fosforilação da RyR e da TnI ainda é controverso (Eisner e Trafford, 2000; Bers *et al.*, 2003; Konhilas *et al.*, 2003; Marks, 2003; Ginsburg e Bers, 2004; Saucerman e McCulloch, 2004). Por exemplo, Li et al (2002) demonstraram que o aumento da liberação diastólica espontânea de Ca²⁺ do RS sob condições de aumento da atividade da PKA poderia ser explicada totalmente pela fosforilação do PLB e conseqüente aumento da carga de Ca²⁺ do RS, sem o envolvimento da fosforilação de RyR, pois este efeito é abolido em animais transgênicos deficientes em PLB (*PLB-knockout*).

Em suma, há considerável evidência que catecolaminas podem facilitar o aparecimento de atividade espontânea miocárdica e arritmias, e que estes efeitos parecem estar associados à sobrecarga celular de Ca²⁺. Portanto, é importante que seja possível caracterizar estes efeitos com parâmetros clássicos rotineiramente utilizados para descrever a relação concentração-efeito para inotropismo e cronotropismo.

1.7 Quantificação do Efeito Arritmogênico de Catecolaminas

A caracterização do efeito pró-arrítmico dependente da concentração de um dado agente arritmogênico é importante na investigação dos mecanismos das arritmias, nos estudos sobre a susceptibilidade a arritmias em modelos animais de doenças cardiovasculares e para a pesquisa aplicada, como, por exemplo, no desenvolvimento de agentes antiarrítmicos por indústrias farmacêuticas.

Para que a eficácia (relacionada com a magnitude da resposta máxima evocada) de um agonista, e a sua potência (relacionada com a sensibilidade do tecido ao agonista) possam ser estimadas, é necessária a determinação da relação concentração-efeito, classicamente descrita por uma função sigmóide que relaciona a resposta evocada ao logaritmo da concentração molar do agonista.

Entretanto, a obtenção desta relação não é trivial. O padrão desta resposta é muito heterogêneo entre as preparações miocárdicas, e as curvas concentração-efeito arrítmico obtidas em preparações isoladas individuais em geral não podem ser aproximadas por uma função sigmóide. Isto provavelmente se deve ao fato de que, em preparações multicelulares, a atividade espontânea gerada em uma ou mais células deve ser propagada e levar à excitação de um grupo relativamente grande de células, para que a contração resultante tenha amplitude suficientemente grande para sua detecção.

Uma abordagem que tem sido usada (Grimm *et al.*, 1998) é a de considerar a ocorrência de episódios arrítmicos como um fenômeno "tudo-ou-nada", de modo semelhante ao utilizado para determinação de LE50 *in vivo* (i.e., concentração de um dado agente químico que causa morte em 50% da população estudada). Portanto, esta metodologia é populacional, implicando no uso de diferentes preparações para diferentes concentrações do agonista e, para cada concentração, um dado número de réplicas. Apesar desta metodologia permitir a determinação de uma curva concentração-efeito ajustada por uma sigmóide, ela apresenta duas grandes desvantagens: 1) requer um número muito grande de preparações para cada curva, o que implica no sacrifício de um grande número de animais experimentais; e 2) não leva em conta a severidade do efeito arrítmico, por não discriminar uma única contração espontânea de um trem de batimentos espontâneos. Além disso, sob estimulação elétrica contínua, é muitas vezes difícil distinguir uma contração espontânea de uma evocada pelo estímulo elétrico.

Em experimentos preliminares, observamos que a incidência e severidade de episódios de atividade espontânea em átrios esquerdos isolados de ratos é maior para maiores concentrações de catecolaminas, muito embora nos fosse impossível descrever a

relação concentração-efeito por uma função sigmóide na maioria das preparações individuais.

Se um dado agente arritmogênico exerce seu efeito pela ocupação de receptores (o que é plausível, no caso de catecolaminas), é razoável assumir que a relação concentração-efeito pode ser descrita pelo modelo da teoria da ocupação, segundo a qual assume-se que a ocupação de receptores pelos agonistas leva a um certo grau de estímulo que gera uma resposta proporcional a ele (ver Furchgott, 1972 e Kenakin, 1984, para revisões). Esta teoria se baseia na lei de ação das massas, que dita que a resposta fracional de um tecido (ou seja, a resposta expressa como uma fração da resposta máxima) é uma função não linear do estímulo causado por uma determinada ocupação fracional dos receptores (ou seja, de uma dada fração do total de receptores) pelo agonista. O estímulo, por outro lado, depende de características do tecido e do receptor (acoplamento deste aos sistemas de transdução química e alvos dos efetores têm acesso.

Assim, a resposta fracional (R/Rmax) pode ser descrita por:

$$R / Rmax = f {s} = f {e . [RA] / [Rt]} = f {e . [A] / ([A] + Ka)} Eq. 1$$

onde [Rt] é a concentração total de receptores e [RA] é a concentração de receptores ligados ao agonista; f é a função que relaciona o estímulo (s) e a ocupação fracional dos receptores ([RA] / [Rt]) ; *e* é a eficácia do agonista; Ka é a constante de dissociação da droga do receptor, no equilíbrio; [A] é a concentração do agonista na biofase (i.e., acessível aos receptores).

De acordo com este modelo, seria esperado que R/Rmax fosse uma função hiperbólica da concentração molar do agonista, ou uma função sigmóide do logaritmo desta. Assim, se tal função não é obtida para o efeito arritmogênico de catecolaminas em preparações miocárdicas isoladas, pode-se concluir que: a) a geração de arritmias não pode ser descrita pelo modelo da teoria da ocupação; ou, b) a metodologia utilizada para medição e análise desta resposta não é adequada (i.e, a mesma metodologia de simples observação, que é rotineiramente usada para determinação de respostas cronotrópica e inotrópica).

Neste contexto, desenvolvemos um método que envolve protocolos de estimulação elétrica e abordagem de análise, descrito no Capítulo 3 (Materiais e Métodos), que permitisse a quantificação do efeito arritmogênico de catecolaminas em

átrios e miócitos isolados de ratos, por meio de curvas concentração-efeito. Utilizando protocolos adequados, foi possível a obtenção de relações concentração-efeito arritmogênico clássicas, o que permitiu avaliar eficácia e potência de agonistas em tecido atrial esquerdo e miócitos ventriculares isolados de rato. Esta metodologia foi aplicada para caracterizar as contribuições de adrenoceptores α e β , e dos subtipos 1 e 2 deste último tipo, na arritmogênese produzida por catecolaminas nessas preparações.

Parte dos resultados apresentados neste estudo foi previamente publicada, como listado abaixo:

- BOER DC & BASSANI RA. Método para obtenção de curvas concentração-efeito a agentes arritmogênicos em miocárdio isolado. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, São José dos Campos, SP, Setembro de 2002. Anais, p.105 (resumo).
- 2) BOER DC, BASSANI JWM, BASSANI RA. Catecholamine-dependent spontaneous activity is mediated by β1-adrenoceptors in rat myocardium. XIII Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR), Latin American Section (Pre-Congress Satellite Meeting ISHR 2004). Puerto Iguazu, Argentina. Agosto de 2004 (resumo publicado em J Mol Cell Cardiol 37: 149, 2004).
- BOER DC & BASSANI RA. Quantitation of the dose-response relationship for arrhythmogenic agents in isolated cardiac tissue. *Brazilian Journal of Biomedical Engineering*, 20: 3-10, 2004 (artigo completo).

Capítulo 2

Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Desenvolver um método para quantificação da relação concentração-efeito arritmogênico de catecolaminas em preparações miocárdicas isoladas.
- Analisar a participação dos tipos e subtipos de receptores adrenérgicos na geração de arritmias induzidas por catecolaminas em tecido atrial esquerdo e miócitos ventriculares isolados de rato.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, adquiridos na condição SPF (*specific pathogen-free*) do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) na idade de 4 semanas. Estes animais foram mantidos até a idade de utilização (3-5 meses) no Biotério do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP (CEB/UNICAMP), em ambiente climatizado (20-22 °C), sob regime de iluminação de 12h:12h, com acesso à água filtrada e ração peletizada *ad libitum*, e suplementação vitamínica quinzenal. As trocas das camas das gaiolas (maravalha esterilizada por calor seco) foram feitas em dias alternados para minimizar o *stress* ambiental por acúmulo de vapor de amônia no interior da gaiola. Os animais não sofreram manipulação até o dia do sacrifício, exceto para limpeza e fornecimento da água e alimento.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – Instituto de Biologia – UNICAMP (protocolos no. 636-1 e 776-1).

3.2 Átrios Esquerdos Isolados

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito por Bassani e Bassani (1991). O animal foi sacrificado por exsanguinação após concussão cerebral, com imediata remoção do coração. Os átrios esquerdos (AE) foram dissecados e montados em câmara para tecido isolado contendo 20 ml da solução de Krebs-Henseleit a 36,5 °C, saturada com carbogênio (95% O₂ / 5% CO₂). Uma das extremidades do átrio foi fixada por um par de eletrodos de platina, conectados a um estimulador elétrico. A outra foi presa a um gancho de aço inoxidável conectado a um transdutor isométrico de tensão (mod. F-60, Narco Biosystems, Houston, TX, EUA), acoplado a um fisiógrafo (Narcotrace 40, Narco Biosystems, Houston, TX, EUA). O filtro do acoplador foi ajustado para a freqüência de corte de 10 Hz.

Os sinais de calibração foram obtidos antes e depois de cada experimento com o auxílio de um padrão de massa de 500 mg, para diferentes fatores de amplificação (S_{200} a S_{10}) do acoplador. Foram considerados válidos apenas aqueles experimentos em que os sinais de calibração inicial e final tiveram igual amplitude.

Após a montagem, iniciava-se a estimulação elétrica da preparação (pulsos bipolares de tensão, 1,2x o limiar, 5 ms de duração) na freqüência de 0,5 Hz. Cerca de 15 min depois, o músculo era estirado, com auxílio de um parafuso micrométrico, até o comprimento ótimo (i.e., aquele no qual a tensão ativa era máxima, com tensão passiva inferior a 0,5 gf). Em seguida, era observado um período de estabilização de 40 minutos, durante o qual o músculo era estimulado eletricamente a 0,5 Hz. O sinal de tensão desenvolvida durante todo experimento era registrado em papel milimetrado.

3.3 Miócitos Ventriculares Isolados

Os miócitos foram isolados por digestão enzimática do tecido ventricular, conforme descrito anteriormente (Bassani *et al.*, 1992; Bassani e Bassani, 2002). O método consistiu na perfusão do coração a 37° C em sistema de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit sem Ca²⁺ por 5 min. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,2-0,7 mg/ml de colagenase 1 (Worthington Biochem. Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 12–20 min, seguindo-se de perfusão com a solução de Tyrode sem Ca²⁺ por 2-5 min. Posteriormente, o tecido ventricular foi disperso e triturado na mesma solução de Tyrode, para dissociação das células. A suspensão de células foi submetida a repetidas lavagens, com aumento gradual da concentração extracelular de cálcio para 1 mM.

Os miócitos ventriculares (MV) foram depositados no fundo de uma câmara de perfusão (projetada e construída no CEB/UNICAMP; depósito de patente n°. PI 0302.403-2; Gomes, 1997), cujo fundo, formado por uma lamínula, era tratado com solução de colágeno para maior adesão das células. Passado o período de sedimentação (~15 min), as células foram perfundidas com solução de Tyrode modificada e estimuladas a 0,5 Hz (com pulsos bipolares de 5 ms de duração e 1,2 vez o limiar de estimulação) com um par de eletrodos de platina mergulhados na solução da câmara e conectados a um estimulador elétrico (projetado e construído no CEB – UNICAMP, OS 01.110). Os experimentos com MV foram realizados a 23° C.

Nas preparações de MV, foi utilizado um sistema compacto de microscopia (projetado e construído por Gomes, 1997; depósito de patente n°. Pl 9705.280-9) que utiliza iluminação com luz vermelha de um LED (light emmiting diode) de alta luminância (Super Bright LED Jumbo, 5000 mcd, 1.85 V, 20 mA, Archer, N. Cat. 276-086) alimentado por uma bateria de 9 volts. Este sistema está esquematizado na Figura 3.1, que mostra que a luz emitida pelo LED (item 1 na Figura 3.1) atravessa a amostra (câmara com as células, item 2), e atinge a objetiva (plana 40 X, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha, item 4). No bloco onde se encontra a objetiva, a luz é refletida pelo espelho refletor de vermelho (espelho dicróico, λ de reflexão = 580 nm, item 5) para uma câmera de vídeo (Oriental, Seul, Coréia do Sul, item 6). O sinal da câmera é enviado para um gravador de vídeocassete (VHS VC-1494 B, Sharp, Sharp do Brasil, Manaus, AM, item 7). A saída do gravador alimenta um detector de borda de sinal de vídeo (DBV, projetado e construído no CEB/UNICAMP; depósito de patente nº. PI 0300.834-7, item 8), acoplado a um monitor de vídeo (mod NUV M12BW, Nuvispec, Canadá, item 9). O DBV é um instrumento que, resumidamente, seleciona uma linha do sinal de vídeo e acompanha um nível de tensão elétrica correspondente à cor preta ou branca, conforme selecionado no painel. A tensão elétrica de saída é proporcional ao deslocamento de um ponto localizado em uma borda na cor escolhida, que, no caso do presente estudo, correspondeu à borda de uma célula cardíaca. Como esta borda se desloca durante cada contração, a variação do sinal de saída do DBV durante a atividade contrátil da célula corresponde ao encurtamento da mesma em resposta à estimulação elétrica.

O sinal de encurtamento celular detectado pelo DBV era adquirido por meio de uma placa de aquisição de dados (Cad 12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, item 10) à taxa de 100 Hz. Esta placa possui 32 canais e é composta por um conversor analógico digital de 12 bits com base de tempo interna de 2 MHz. A placa é conectada a um computador (AcerMate 486, 100 MHz com 16 MB de RAM, Acer do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), no qual o sinal era armazenado por meio do programa AqDados para DOS (versão 4.16, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, item 9). O sinal foi filtrado a 50 Hz para posterior análise. A imagem das células durante os experimentos foi gravada em vídeo-cassete, o qual permitia documentar todo o experimento e recuperar posteriormente o sinal de encurtamento celular. O comprimento da célula em repouso foi medido diretamente do monitor de vídeo, de acordo com calibração micrométrica.



Figura 3.1: Detalhe do sistema de microscopia: 1) LED jumbo vermelho; 2) câmara de perfusão com células; 3) *charriot* com movimento horizontal x,y e ajuste de foco; 4) objetiva; 5) espelho refletor de vermelho; 6) câmera de vídeo (CCD); 7) gravador de vídeo-cassete (VCR); 8) detector de borda de sinal de vídeo (DBV); 9) monitor de vídeo; 10) placa de aquisição (modificado de Oliveira, 2004).

Para determinar a ampliação da imagem pelo sistema de microscopia (para que o comprimento da célula pudesse ser medido diretamente no monitor de vídeo) e para calibrar o sinal de saída do DBV, foi utilizada uma gratícula-padrão com precisão de 10 μm (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Posicionada sobre o estágio do sistema de microscopia, a gratícula foi centralizada no monitor de vídeo e focalizada. Mediu-se na tela do monitor o comprimento real (L, em mm) correspondente a 100 μm da gratícula. Assim, a amplificação da imagem pelo sistema é dada pela razão L/0,1.

A calibração do sinal do DBV foi feita pela seleção de uma das bordas pretas formadas pelas marcações da gratícula e posterior deslocamento do ponto de acompanhamento da borda para a marcação vizinha (i.e., distante 10 μm da primeira). O sinal de saída do DBV (em mV) antes e depois do deslocamento foi medido em um osciloscópio (Tektronix 2230, Beaverton, Oregon, EUA) e adquirido pelo programa

Aqdados no computador. Portanto, a diferença da tensão elétrica de saída do DBV nestas posições do ponto de borda foi equivalente a um deslocamento de 10 μm.

3.4 Soluções e Fármacos Utilizados

3.4.1 Fármacos

Os agonistas (i.e., fármacos que produzem efeitos funcionais sobre a preparação por meio da interação com determinadas moléculas receptoras) para os quais foram obtidas curvas concentração-efeito foram:

- a) isoproterenol (ISO): catecolamina sintética que ativa receptores β-adrenérgicos de ambos os subtipos β₁ e β₂, porém, com potência maior do que as catecolaminas endógenas (Lands *et al.*, 1967a,b; Whalen e Lewis, 1999; Zou *et al.*, 1999);
- b) noradrenalina (NA): principal neurotransmissor das terminações simpáticas pósganglionares, que ativa receptores pós-juncionais dos subtipos α₁ e β₁ (Lands *et al.*, 1967b; Langer, 1974);
- c) fenilefrina (PHE): agonista sintético α-adrenérgico, não seletivo para subtipos destes receptores (Brodde e Michel, 1999);
- d) salbutamol (SAL): agonista parcial que ativa principalmente os receptores β₂ (Brodde e Michel, 1999; Handley, 1999; Yang, *et al.*, 1999).

Os agonistas foram adicionados de modo cumulativo à solução de banho (no caso de AE) ou de perfusão (no caso de MV), de modo a produzir um aumento logarítmico (0,5 ou 1 unidade logarítmica) em sua concentração molar (Bassani e Bassani, 1991). Após cada aumento da concentração do agonista, aguardou-se um período mínimo de 2 min para produção e estabilização de seu efeito sobre a preparação. O volume total de solução de agonista adicionado foi sempre menor que 4% do volume da solução de banho ou perfusão. A adição de agonistas era interrompida quando havia saturação da resposta ou quando aumento posterior da concentração do agonista requeria adição de mais de 5% do volume da solução de banho ou perfusão. As faixas de concentração dos agonistas utilizadas neste trabalho foram: 0,1 nM a 10 µM para ISO; 1 nM a 0,1 mM para NA e PHE; e 1 a 300 µM para SAL.

Em alguns experimentos, as curvas concentração-efeito foram determinadas na presença de antagonistas competitivos (i.e., fármacos que competem com o agonista pelo mesmo receptor). Nestes casos, observou-se, antes do início da curva, um período de 40

ou 10 min de incubação da preparação com o antagonista em AE ou MV, respectivamente. Foram empregados os seguintes antagonistas:

- a) Atropina (ATR): antagonista seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos (mas não seletivo para subtipos), utilizado rotineiramente na concentração de 0,1 μM durante a determinação das curvas a todos os agonistas em AE. Este antagonista foi empregado para bloqueio da ativação desses receptores por acetilcolina (ACh), cuja liberação espontânea pode ocorrer nesta preparação (Pappano e Volle, 1962; Bassani e De Moraes, 1987);
- b) Propranolol (PRO): antagonista de receptores β-adrenérgicos, não seletivo para seus subtipos, utilizado na concentração de 1 μM durante a determinação das curvas a NA e PHE (Tan e Summers, 1995; Brodde e Michel, 1999; Whitehurst *et al.*, 1999);
- c) Fentolamina (PHT): antagonista de receptores α-adrenérgicos, utilizado na concentração de 1 µM durante a determinação das curvas a NA (Langer, 1998);
- d) Metoprolol (MET): antagonista seletivo de receptores adrenérgicos do subtipo β₁, utilizado na concentração de 0,5 μM durante a determinação das curvas a ISO e SAL (Brynne *et al.*, 1998; Olbrich *et al.*, 1999);
- e) Butoxamina (BUT): antagonista seletivo de receptores adrenérgicos do subtipo β₂, utilizado na concentração de 0,3 μM durante a determinação das curvas a ISO (Levy, 1966);

Em alguns experimentos, a curva ao ISO ou à NA foi obtida na presença de SAL (10 μ M), para promover ativação constante de adrenoceptores do subtipo β_2 . Nestes casos, observou-se um período de 2 min de exposição a este agonista antes do início da curva. Tanto no caso de antagonistas, como no do SAL, a concentração do fármaco foi mantida a mesma durante todo o experimento.

Neste trabalho, procurou-se distinguir os efeitos mediados por diferentes tipos e subtipos de adrenoceptores pelo uso de combinações específicas de agonistas e antagonistas. Na Tabela 3.1, encontram-se as combinações de fármacos e os tipos/subtipos de receptores cuja ativação se pretendeu selecionar. No caso de AE, algumas preparações foram usadas para obtenção de mais de uma curva, com diferentes combinações de agonista e antagonista.
Tabela 3.1 - Tipos e subtipos de adrenoceptores cuja ativação foi preferencialmente selecionada pela respectiva combinação de agonistas e antagonistas. β_2 : estimulação tônica.

Tipo (subtipo) de	Agonista	Antagonista/agonista
adrenoceptor		presentes
$\beta_1 + \alpha_1$	bitartarato de (±) NA	-
β ₁	bitartarato de (±) NA	metanosulfato de PHT
α ₁	bitartarato de (±) NA	cloridrato de (±) PRO
α ₁	cloridrato de (-) PHE	cloridrato de (±) PRO
$\beta_1 + \beta_2$	cloridrato de (-) ISO	-
β ₁	cloridrato de (-) ISO	cloridrato de BUT
β ₁ + <i>β</i> ₂	cloridrato de (-) ISO	hemisulfato de SAL
β2	cloridrato de (-) ISO	tartarato de (±) MET
β ₂	hemisulfato de SAL	tartarato de (±) MET
$\alpha_1 + \beta_1 + \beta_2$	bitartarato de (±) NA	hemisulfato de SAL

3.4.2 Soluções

Para preparações de AE, foi utilizada solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): 115 NaCl; 4,5 KCl; 25 NaHCO₃; 2,5 CaCl₂; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 11,1 glicose; 1 ácido ascórbico; pH 7,4 a 36,5 °C sob saturação com carbogênio. Para isolamento de MV, foi utilizada solução de Krebs-Henseleit modificada, na qual ácido ascórbico e CaCl₂ foram omitidos, e a concentração de MgSO₄ foi elevada para 3 mM.

Nos experimentos com MV foi utilizada solução de Tyrode modificada, com a seguinte composição (mM): 140 NaCl; 6 KCl; 1,2 MgCl₂; 5 HEPES (ácido hidroxietil-piperazina-N"-2-etano-sulfônico); 11,1 glicose; 1 CaCl₂; pH 7,4 a 23 °C.

Para o preparo destas soluções, utilizaram-se sais de padrão analítico e água deionizada. Para soluções de isolamento de MV, usou-se água tipo I (resistividade > 18 $M\Omega$.cm).

Soluções-estoques dos agonistas (20 mM ISO e NA, mais 10 mM ácido ascórbico; 40 mM PHE; 15 mM SAL) e antagonistas (10 mM ATR (sulfato), PRO e BUT; 4 mM PHT e 15 mM MET) foram preparadas com água deionizada e mantidas a -20 °C. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente por diluição seriada das soluções-estoques do agonistas em água deionizada, e mantidas a 4 °C em banho de gelo. Quando empregada, a cafeína foi dissolvida diretamente na solução de Krebs-Henseleit (0,5 mM). Os fármacos foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.5 Metodologia Desenvolvida para Quantificação da Relação entre Concentração do Agonista e seu Efeito Arritmogênico

O método proposto baseou-se na computação de contrações espontâneas (CE) desenvolvidas durante períodos de observação estabelecidos, quando a estimulação elétrica da preparação era interrompida. Após a realização de experimentos preliminares, fixou-se a freqüência estimulatória basal em 0,5 Hz e a duração do período de observação em 1 min. Foram testadas variações do protocolo estimulatório, tais como o número de períodos de observação, e a aplicação de trem de alta freqüência (5 Hz) *vs.* a manutenção da freqüência estimulatória basal antes da(s) pausa(s) estimulatória(s). Um determinado protocolo foi utilizado antes do início da curva e a cada concentração do agonista, de modo a se empregar o mesmo protocolo ao longo de todo o experimento. Os protocolos testados foram:

- a) um único período de pausa de 1 min, com pré-estimulação a 0,5 Hz (Figura 3.2A);
- b) um único período de pausa de 1 min, precedido por um trem de pulsos a 5 Hz com 30 s de duração (Figura 3.2B);
- c) três períodos de pausa de 1 min, intercalados por 30 seg de estimulação à freqüência basal (0,5 Hz) (Figura 3.2C); e
- d) três períodos de pausa de 1 min, intercalados por 30 s de estimulação a 5 Hz (Figura 3.2D);

Para teste, todos os 4 protocolos foram aplicados a cada preparação, num conjunto de 4 AEs, durante a determinação de curvas concentração-efeito à NA. Após análise dos resultados obtidos (vide item 4.1, Capítulo 4), definiu-se um único protocolo a ser empregado em experimentos subseqüentes com AE. Este protocolo foi aquele ilustrado no painel D da Figura 3.2, ou seja, 3 períodos de observação de 1 min intercalados por estimulação a 5 Hz por 30 s. Nos experimentos com MV, utilizou-se o protocolo ilustrado no painel C da Figura 3.2, ou seja, também 3 pausas, porém

precedidas por estimulação à freqüência basal. Após a aplicação do protocolo, a preparação era estimulada à freqüência basal (0,5 Hz) até estabilização da amplitude das contrações.



Figura 3.2: Protocolos estimulatórios testados em AE, nos quais foram utilizadas 1 (A e B) ou 3 pausas estimulatórias (C e D), precedidas por estimulação elétrica a 0,5 (A e C) ou 5 Hz (B e D), por 30 s. As contrações espontâneas (CE) foram computadas exclusivamente durante as pausas. Estão indicados a tensão desenvolvida (escala 0,4 gf) e os pulsos estimulatórios aplicados à preparação.

Em cada preparação, foram analisados os efeitos arritmogênico e inotrópico dos agonistas. O protocolo estimulatório era aplicado inicialmente na ausência do agonista (após o período de estabilização, inclusive na presença de outros fármacos, como antagonistas e SAL, quando usados) e na presença de cada concentração do agonista. Durante os períodos de pausa (e somente neles), foram computadas CEs, cuja freqüência média (CEs/min) foi utilizada para quantificação da resposta arrítmica ao agonista.

Durante a estimulação basal e imediatamente antes da aplicação da primeira pausa estimulatória (ou do primeiro trem de 5 Hz em AE), foi medida a amplitude das contrações atriais (tensão isométrica ativa de pico, em gf) ou desenvolvidas por MV (encurtamento de pico, como % do comprimento celular de repouso, % CR) para quantificação do efeito inotrópico do agonista.

3.6 Análise dos Resultados

Usou-se o programa Prism (versão 3.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para ajuste da função não linear sigmóide descrita pela Eq. 3.1 aos pontos experimentais da curvas que relacionam as respostas arrítimica e inotrópica ao logaritmo da concentração molar do agonista.

$$R = \frac{Min + (Max - Min)}{1 + 10^{(\log EC50 - [A])}}$$
 (Eq. 3.1)

onde [A] é o logaritmo da concentração molar do agonista. Desta curva foram extraídos os seguintes parâmetros:

- a) mínimo (Min): valor basal da variável (i.e, antes da adição do agonista);
- b) máximo (Max): valor máximo da variável atingido após saturação da resposta ao agonista. A resposta máxima ao agonista (Rmax) consiste da diferença entre Max e Min;
- c) pD₂: o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax.

Em AE, é complicada a obtenção da relação concentração-efeito arritmogênico devido à alta variabilidade de resposta entre preparações. Por esta razão, a resposta arrítmica a cada concentração do agonista foi computada como a soma das CE nos três períodos de observação, nos conjuntos das preparações, da qual extraiu-se o valor médio de CE/min por preparação. Posteriormente, este conjunto de pontos médios foi analisado. O mesmo procedimento foi usado em MV. No caso destes, no entanto, a variabilidade é menor e é possível a obtenção de curvas para células individuais, cuja média e

coeficiente de variação dos parâmetros são semelhantes àqueles obtidos por análise da curva média. Isto demonstrou a validade deste último tipo de análise.

A relação entre concentração e efeito inotrópico foi estimada em preparações individuais, nas quais a resposta a cada concentração do agonista era a diferença entre a amplitude de contração e o valor Min. Para este efeito, utilizou-se a mesma função e foram determinados os mesmo parâmetros que para análise da resposta arrítimica ao agonista.

Os dados estão apresentados como média acompanhada pelo respectivo erropadrão (EP), ou dos limites do intervalo de confiança para 95%.

Os valores de amplitude de contração e dos parâmetros da curva concentraçãoefeito foram comparados por teste *t* de Student, ou por análise de variância monofatorial, seguida (em caso de significância estatística) por comparação de médias pelo teste *t* de Bonferroni. O nível de significância estatística foi estabelecido como p \leq 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Quantificação da Relação entre Concentração do Agonista e Resposta Arritmogênica em Átrios Esquerdos Isolados de Rato

4.1.1. *Teste do Método Proposto: Protocolos Estimulatórios Aplicados na Presença de NA* Para teste do protocolo estimulatório mais adequado para a obtenção de curvas concentração-efeito arritmogênico em AE, utilizamos como agonista a NA, e testamos a variação da freqüência estimulatória pré-pausa (0,5 e 5 Hz) bem como, o número de períodos de observação (i.e., 1 ou 3 pausas estimulatórias de 1 min de duração). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1 e na Figura 4.1. A análise de variância demonstrou que o número máximo de CE (Max) e a sensibilidade à NA (estimada pelo seu pD₂) foram significativamente afetados pelo tipo de protocolo estimulatório (p < 0,001). Em experimentos preliminares tentou-se a estimulação pré-pausa a 10 Hz (resultados não apresentados), mas nesta condição a preparação mostrou uma rápida deterioração, provavelmente porque a difusão de oxigênio no tecido é um fator limitante para a manutenção de atividade contrátil em altas freqüências.

Quando utilizamos apenas um período de observação e estimulação pré-pausa de 0,5 Hz, foi possível ajustar a relação concentração-efeito a uma função sigmóide ($R^2 = 0,969$) para o *pool* de átrios estudados. No entanto, a resposta máxima obtida foi de baixa amplitude (~100 CE), e todos os pontos experimentais encontravam-se no início da curva (segmento não linear da curva, que está mostrada apenas parcialmente na Figura 4.1). Na tentativa de favorecer sobrecarga de Ca²⁺ antes da pausa (e, portanto, facilitar o aparecimento de atividade espontânea), testamos a aplicação de um trem de estímulos elétricos de 5 Hz durante 30 s antes da pausa estimulatória. A razão para isso é o aparente envolvimento da sobrecarga de Ca²⁺ na geração de atividade espontânea miocárdica (Marbán *et al.*, 1986; Merillat *et al.*, 1990; Bassani *et al.*, 1997; Bassani e Bassani, 2003). Nesta condição, obtivemos um aumento da resposta máxima em aproximadamente 3 vezes (p < 0,05). Porém, apesar do ajuste da função sigmóide aos pontos experimentais ter sido satisfatório (R² = 0,982), estes ainda se restringiram à parte

inicial da curva ajustada e, portanto, não havia confirmação experimental da Max obtida no ajuste, o que lança dúvida sobre a confiabilidade dos parâmetros obtidos.

Tabela 4.1 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico da noradrenalina (NA), em átrios esquerdos isolados de ratos determinados pelo ajuste de uma função sigmóide (veja as curvas e pontos experimentais na Figura 4.1). Os parâmetros obtidos do ajuste foram: Min: número de contrações espontâneas na ausência do agonista; Max: valor máximo de resposta arrítmica; e pD₂: o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Max. Min e Max estão expressos como o número total de contrações espontâneas (CE) em todos os períodos de observação, por átrio (para detalhes, ver o capítulo de Material e Métodos), num conjunto de 4 átrios. O valor de R^2 indica a qualidade do ajuste da função aos pontos experimentais ($R^2 = 1$ para um ajuste perfeito). Cada preparação foi submetida a todos os seguintes protocolos de estimulação elétrica: a) um único período de pausa de 1 min, com pré-estimulação a 0,5 Hz (0,5 Hz + 1 pausa); b) um período de pausa de 1 min, com pré-estimulação a 5 Hz (5 Hz + 1 pausa); c) três períodos de pausa de 1 min, intercalados por 30 s de préestimulação a 0,5 Hz (0,5 Hz + 3 pausas); e d) três períodos de pausa de 1 min, intercalados por 30 s de pré-estimulação a 5 Hz (5 Hz + 3 pausas). Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos erros padrão da média (EP). No caso de Min, estão ainda apresentados entre parênteses os limites do intervalo de confiança para 95%. ** p < 0,01; *** p < 0,001; vs 5 Hz + 3 pausas (teste de Bonferroni).

PROTOCOLO	0,5 Hz +	5 Hz +	0,5 Hz +	5 Hz +
	1 pausa	1 pausa	3 pausas	3 pausas
Min (CE/átrio)	-0,1 ± 0,1 (-0.2 – 0.0)	1,3 ± 1.5 (-1.0 – 3.6)	-21,1 ± 35,0 (-76.8 – 34.7)	-15,1 ± 22,5 (-50.9 – 20.7)
Rmax (CE/átrio)	101 ± 6 ***	304 ± 15 ***	577 ± 72	651 ± 48
pD ₂	3,787 ± 0,039 ***	4,286 ± 0,056 **	5,316 ± 0,250	$\textbf{5,263} \pm \textbf{0,145}$
R ²	0,969	0,982	0,964	0,987

Posteriormente, testamos aumentar a amostragem de CE por aumento do número de períodos de observação de 1 para 3, visto que, por tratar-se de um fenômeno discreto e aparentemente probabilístico, a amostragem cumulativa e mais ampla de CE poderia, por si só, tornar mais confiável a estimativa de Max. Nas duas condições de estimulação pré-pausa (com 0,5 e 5 Hz), Max aumentou significativamente (p < 0,001) em comparação a apenas 1 período de observação. Além disso, o uso de 3 períodos de observação levou a um desvio da curva à esquerda (evidenciado por um aumento considerável do pD₂; p<

0,001 para 0,5 Hz e p < 0,01 para 5 Hz), o que resultou na distribuição dos pontos experimentais ao longo de toda a faixa de concentrações que evocavam resposta abaixo da saturação. No caso particular de 3 pausas, Max e pD_2 foram independentes da freqüência estimulatória pré-pausa (p > 0.05).



Figura 4.1 – Curvas concentração-efeito para a resposta arrítmica evocada por NA, obtidas em átrios esquerdos isolados de ratos, com diferentes protocolos de estimulação elétrica: 1 (símbolos cheios) ou 3 (símbolos vazios) períodos de observação, precedidos por estimulação a 0,5 (triângulo) ou 5 (quadrado) Hz. A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como a média do número de contrações espontâneas (CE) por átrio no total dos períodos de observação. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de NA. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.1.

Seria desejável que o protocolo estimulatório a ser utilizado, embora capaz de favorecer o aparecimento de arritmia na presença de agonistas de adrenoceptores, não fosse arritmogênico *per se*. Para teste da arritmogenicidade intrínseca dos protocolos, determinamos o número de CE por eles evocadas na ausência dos agonistas.

Na ausência de NA, nenhum dos protocolos apresentou arritmogenicidade intrínseca. Os valores médios de CE/átrio foram: zero, $0,2 \pm 0,2$; $0,25 \pm 0,25 e 1,5 \pm 1,2$ para os protocolos 0,5 Hz + 1 pausa, 5 Hz + 1 pausa, 0,5 Hz + 3 pausas e 5 Hz + 3 pausas, respectivamente. Estes valores foram comparáveis entre si (p = 0,388) e nenhum deles foi diferente de zero. Observe que estes são valores reais, e não os valores Min obtidos pelo ajuste da curva, apresentados na Tabela 4.1. Estes últimos, do mesmo

modo, não dependeram do protocolo (p = 0,844) e não diferiram estatisticamente de zero em qualquer protocolo (como observado pela inclusão de zero nos intervalos de confiança para 95%).

A partir destes testes, foram definidos os protocolos de estimulação a serem aplicados em todos os experimentos subseqüentes. Tanto para AE, como para MV, usouse três pausas estimulatórias, intercaladas por 30 s de estimulação, no entanto, com diferentes freqüências de estimulação pré-pausa: 5 Hz em AE e 0,5 Hz em MV. No caso de MV, há que se considerar que, na temperatura na qual os experimentos foram realizados (23 °C), as células não conseguem acompanhar a estimulação a 5 Hz. Por ter sido estabelecido um período fixo de observação para todos experimentos subseqüentes, a resposta arrítmica passou a ser sempre expressa como número médio de CE/min.

4.1.2. Curva Concentração-Efeito Arritmogênico: Resposta ao ISO

Definido o método para obtenção da resposta arrítmica a NA, analisou-se em tecido atrial o efeito arritmogênico de outro agonista adrenérgico, ISO, que atua apenas em receptores do tipo β . Como podemos ver pelos resultados mostrados na Tabela 4.2 (coluna da esquerda) e na Figura 4.2, apesar do bom ajuste de uma função sigmóide aos pontos (R² = 0,953), curiosamente obtivemos um valor de Max insignificante, quando comparado ao obtido com NA (1 *vs* ~215 CE/min), com o mesmo protocolo (5 Hz + 3 pausas).

Para testar se esta baixa reatividade seria realmente devida à reduzida arritmogenicidade intrínseca do ISO, usou-se algumas manobras para potencializar o efeito do agonista de aumentar a carga celular de Ca²⁺. A primeira delas consistiu no acréscimo 0,5 mM de cafeína à solução de Krebs-Henseleit, com o propósito de estimular a liberação de Ca²⁺ do RS durante a pausa estimulatória, pois a cafeína aumenta a probabilidade de abertura dos canais de Ca²⁺ do RS (Rousseau e Meissner, 1989). Portanto, espera-se que a cafeína, por facilitar o "vazamento" de Ca²⁺ do RS, potencialize o efeito arritmogênico do ISO.

A outra abordagem foi avaliar o efeito de despolarização parcial da membrana por aumento da concentração extracelular do íon K⁺ de 5,7 para 7,0 mM por adição de KCI. Com base na equação de Nernst (Hille, 1992), estima-se que este aumento da concentração de KCI modifique V_m de -85,4 para -79,9 mV, aproximando-o do valor limiar de excitação. Consideremos o efeito da despolarização da membrana sob um outro ponto de vista: a extrusão de Ca²⁺ pelo NCX é um processo dependente de V_m, pois a força eletromotriz para este transporte pode ser traduzida pela diferença entre E_{rev} e V_m (Blaustein e Lederer, 1999). Calculamos que, sob nossas condições experimentais, e assumindo [Na⁺] e [Ca²⁺] intracelulares como 14 mM e 0,1 μ M, respectivamente (Ferraz *et al.*, 2001), E_{rev} seria -75,2 mV. Portanto, a pequena despolarização causada pelo aumento de [KCI] reduziria a força eletromotriz para extrusão de Ca²⁺ pelo NCX em mais de 50% (de 10,2 para 4,7 mV). Como resultado, na presença de 7 mM KCl, seria esperada uma acumulação progressiva de Ca²⁺ e aumento da carga celular deste íon, em virtude da diminuição do efluxo do íon a cada contração. Assim, seria esperado que cafeína e a adição de KCl teriam efeitos semelhantes de aumentar o "vazamento" de Ca²⁺: a primeira, agindo diretamente nos canais de Ca²⁺ do RS, e o segundo, aumentando a carga celular de Ca²⁺ do RS, Bassani *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 2002).

A Figura 4.2 e a Tabela 4.2 mostram as curvas concentração-efeito e seus parâmetros obtidos com as abordagens descritas acima.

Tabela 4.2 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico do isoproterenol, em AE, na ausência (controle) e presença de 0,5 mM de cafeína (Caff), e após aumento da concentração extracelular de KCI de 5,7 (controle) para 7 mM (7 mM KCI). Foi utilizado o protocolo 5 Hz + 3 pausas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.2, e os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1, porém Min e Max estão expressos como número médio de CE/min. N indica o número de experimentos. Foram usados 16 átrios para a curva controle. A seguir, foi determinada nova curva na presença de cafeína ou de 7 mM KCI, em 11 e 5 destes átrios, respectivamente. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001 *vs* controle (teste de Bonferroni).

GRUPO (N)	CONTROLE (N = 16)	Caff 0,5 mM (N = 11)	7 mM KCl (N = 5)
Min (CEs/min)	0,21 ± 0,03	-4,2 ± 11,2	6,2 ± 8,6
Max (CEs/min)	$0,93\pm0,11$	121 ± 13 ***	142 \pm 16 ***
pD ₂	$\textbf{5,727} \pm \textbf{0,246}$	7,709 \pm 0,301 ***	$\textbf{5,782} \pm \textbf{0,276}$
R ²	0,953	0,939	0,929



Figura 4.2 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito da resposta arrítmica ao isoproterenol (ISO), em AE, na ausência (controle, N = 16) e presença de 0,5 mM de cafeína (Caff, N = 11), e após aumento da concentração de KCI de 5,7 para 7 mM (7 mM KCI, N = 5). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como a média de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. As curvas correspondem aos resultados mostrados na Tabela 4.2.

Podemos observar que ambas as intervenções foram capazes de produzir um aumento considerável e comparável da Max ao ISO (p < 0,001, análise de variância), embora a potência do agonista tenha sido afetada diferentemente pelos tratamentos (p < 0,001). Os resultados destes experimentos sugerem que, embora ISO possa ser arritmogênico, seu efeito parece estar atenuado em condições controles. ISO é um agonista que apresenta marcante efeito inotrópico positivo em tecido atrial, produzindo uma resposta inotrópica máxima comparável àquela evocada pela NA (Bassani e Bassani, 1991). Assim, seria de se esperar que ambos os agonistas estimulassem de modo semelhante o carregamento de Ca²⁺ em células miocárdicas. Portanto, existe a possibilidade de que algum mecanismo, presente no AE, atenue seletivamente seu efeito facilitador do automatismo.

É importante observar que, para cafeína, mas não para aumento de [K]_o, houve um aumento de cerca de 2 unidades logarítmicas do pD₂ do ISO (p < 0,001). É provável que este efeito tenha se devido à inibição pela cafeína das fosfodiesterases que degradam o

AMPc, o segundo mensageiro da via de sinalização β-adrenérgica. Este efeito inibitório, característico das metilxantinas, potencializaria os efeitos resultantes da estimulação de síntese de AMPc, o que se traduziria em maior sensibilidade ao agonista (Butcher e Sutherland, 1962).

Em AE, pode ocorrer apreciável liberação espontânea de ACh de terminações para-simpáticas (Pappano e Volle, 1962; Bassani *et al.*, 1987), e este neurotransmissor tipicamente antagoniza os efeitos mediados pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Bers, 2001). Por este motivo, investigamos o efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos por ATR (0,1 μ M) sobre a resposta arrítmica à NA e ao ISO. O tratamento com ATR (na ausência de agonistas) não afetou a geração de atividade espontânea pelo protocolo estimulatório, em 25 átrios (0,21 ± 0,13 e 0,22 ± 0,14 CE/min, na ausência e presença de ATR, respectivamente; p = 0,959), ou a força de contração (284 ± 27 e 308 ± 27 gf, na ausência e presença de ATR, respectivamente; p = 0,533).

A Tabela 4.3 e Figura 4.3A mostram que o efeito de ATR sobre Max dependeu do agonista utilizado (p = 0,030 para interação agonista x tratamento, análise de variância bifatorial). O tratamento com ATR aumentou ~6,5 vezes a Max a ISO (p < 0,01, teste t post-hoc), enquanto que, no caso da NA, este parâmetro não foi afetado significativamente. No entanto, independente do tratamento, Max em resposta à NA foi maior que em resposta ao ISO (p < 0,001 para efeito do agonista). O valor pD₂ da NA foi inalterado por ATR. Já no caso do ISO, embora um aumento de mais de 2,5 unidades logarítmicas tenha ocorrido no valor médio de pD₂ na presença de ATR, esta diferença não foi estatisticamente significante (p = 0,139 para interação agonista x tratamento, na análise de variância bifatorial), provavelmente devido ao alto EP desta variável na ausência de ATR (veja Tabela 4.3).

Como podemos ver, o bloqueio dos receptores muscarínicos produziu um aumento da reatividade ao ISO (tanto da resposta arrítmica absoluta, quanto da sensibilidade), mesmo na ausência de outros procedimentos que pudessem aumentar a carga celular de Ca²⁺. Este resultado, portanto, confirma a possibilidade levantada anteriormente, ou seja, que ISO apresente menor eficácia arritmogênica devido a algum mecanismo presente no AE que contribui para suprimir seu efeito. Estes resultados indicam que a liberação espontânea de ACh das terminações parassimpáticas no AE isolado parece antagonizar o efeito arritmogênico do ISO. Em vista dos presentes resultados, todos os demais experimentos com AE foram realizados durante incubação contínua com 0,1 μM de ATR.

Tabela 4.3 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico da noradrenalina (NA) e do isoproterenol (ISO), em AE, na ausência (controle) e presença de 0,1 μ M de atropina (+ ATR), utilizando o protocolo 5 Hz + 3 pausas, para ambos agonistas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.3. Os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1. Min e Max estão expressos como número médio de CEs/min. N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. ** p < 0,01 vs. ISO controle.

AGONISTA	NA		ISO	
GRUPO (N)	CONTROLE (N = 4)	+ ATR (N = 13)	CONTROLE (N = 27)	+ ATR (N = 12)
Min (CEs/min)	-5,4 ± 8,9	-2,7 ± 4,6	0,2 ± 0,1	-1,7 ± 4,3
Max (CEs/min)	192 ± 21	161 ± 11	13 ± 18	87 ± 6 **
pD ₂	5,308 ± 0,217	$5{,}338 \pm 0{,}135$	$\textbf{4,319} \pm \textbf{0,745}$	$7,125 \pm 0,177$
R ²	0,965	0,987	0,996	0,976



Figura 4.3 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arrítmico da NA (A) e do ISO (B), na ausência (controle) e presença de 0,1 μ M de atropina (ATR), em AE. A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como a média, por átrio, das CEs/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar do agonista. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.3.

Deve-se observar, porém, que, mesmo na presença de ATR, a Max ao ISO foi cerca de 50% daquela a NA, o que indica que ISO parece ser intrinsecamente menos arritmogênico que NA. Também intrigante foi a observação de que o efeito da ATR restringiu-se ao ISO, não sendo evidente para a NA (p > 0.05, para ambos os parâmetros). Ambos agonistas ativam adrenoceptores β_1 ; a principal diferença entre alvos destes agonistas seria a ocupação adicional de receptores α pela NA e de receptores β_2 pelo ISO. Assim, seria possível, a princípio, que a arritmogênese produzida por NA fosse relacionada predominantemente a sua ação sobre adrenoceptores α_1 , cuja via de transdução mostra menos convergência com a via dos receptores muscarínicos do que a via de adrenoceptores β (i.e., modulação da síntese de AMPc). Para investigar esta possibilidade, foram realizados experimentos para determinação da participação dos tipos de adrenoceptores $\alpha \in \beta$ no efeito pró-arrítmico da NA.

4.2 Participação de Tipos e Subtipos de Adrenoceptores nas Respostas Arrítmica e Inotrópica a Catecolaminas em Átrios Esquerdos e Miócitos Ventriculares de Rato

Para este estudo, foram utilizados como principais agonistas NA, que ativa os adrenoceptores α_1 e β_1 (Lands *et al.*, 1967; Langer, 1974), e ISO, que ativa adrenoceptores dos subtipos β_1 e β_2 (Lands *et al.*, 1976a,b; Whalen e Lewis, 1999; Zou *et al.*, 1999). Para isolar os tipos e subtipos de receptores, foram empregados antagonistas seletivos, aos quais as preparações permaneceram expostas antes e durante a obtenção das curvas concentração-efeito. Durante todos os experimentos, inclusive aqueles na ausência de bloqueadores de adrenoceptores, as preparações atriais foram tratadas com ATR (0,1 μ M).

4.2.1 Participação dos Receptores Adrenérgicos $\alpha_1 \mathbf{X} \beta_1$

Para esta parte do estudo, os agonistas foram: NA e fenilefrina (PHE), a qual, diferentemente da NA, ativa apenas adrenoceptores α , mas não β , até a faixa micromolar de concentrações (Brodde e Michel, 1999). Adrenoceptores α e β foram bloqueados pelos antagonistas seletivos, fentolamina (PHT, 1 μ M) e propranolol (PRO, 1 μ M), respectivamente. Experimentos preliminares mostraram que 1 μ M PHT suprimiu efetivamente a resposta contrátil à NA em tiras de aorta isolada de rato, onde esta resposta é totalmente mediada por adrenoceptores do tipo α (W. Lai e R.A. Bassani,

resultados não publicados). PHT e PRO, nas concentrações utilizadas, não afetaram significativamente a força desenvolvida por AE ($326 \pm 30 e 335 \pm 29$ gf na ausência e presença de PHT, respectivamente, N = 8, p = 0,981; $325 \pm 58 e 287 \pm 49$ gf na ausência e presença de PRO, respectivamente, N = 15, p = 0,658). Em MV, também não foi observado efeito significativo dos antagonistas sobre o encurtamento de pico ($2,94 \pm 0,30$ e $2,87 \pm 0,16$ % de CR, na ausência e presença de PHT, respectivamente, N = 13, p = 0,598; $2,74 \pm 0,51$ e $2,65 \pm 0,69$ % CR, na ausência e presença de PRO, respectivamente, N = 18, p = 0,918). Do mesmo modo, o número de CE/min não foi alterado por estes antagonistas na ausência de agonistas em AE ($0,6 \pm 0,4 e 2,1 \pm 1,9$ CE/min na ausência e presença de PRO, respectivamente, N = 8, p = 0,453; $0,4 \pm 0,2$ e $0,2 \pm 0,2$ CE/min na ausência e presença de PRO, respectivamente, N = 15, p = 0,652) e em MV ($1,5 \pm 0,4 e 2,5 \pm 1,3$ CE/min na ausência e presença de PHT, respectivamente, N = 13, p = 13, p = 0,469; e 1,4 \pm 0,5 e 1,3 \pm 0,7 CE/min na ausência e presença a de PRO, respectivamente, N = 18, p = 0,908).

Na Tabela 4.4 e na Figura 4.4A, está apresentada a resposta arrítmica à NA em AE, na ausência e na presença 1µM de PHT (usado com o objetivo de minimizar o efeito da ativação de receptores do tipo α). Pode-se observar que nem Max e nem pD₂ foram alterados por PHT (p = 0,727 e p = 0,355, respectivamente, teste t de Student). Por outro lado, quando adrenoceptores β foram bloqueados por PRO, notamos que não foi evocada resposta arrítmica significativa, quer pela NA, quer pela PHE (não houve convergência do ajuste). Os valores apresentados na Tabela 4.4 correspondem às médias dos valores reais na ausência dos agonistas (Min) e na presença de 0,1 mM (Max) dos mesmos. Como pode ser visto, mesmo nesta alta concentração, nenhum dos agonistas aumentou a freqüência de CE na presença de PRO (p = 0,337 e 1,000 *vs* valor na ausência do agonista, para NA e PHE, respectivamente, teste t de Student).

Estes resultados indicam, portanto, que a estimulação da via mediada por adrenoceptores α não está envolvida no efeito arritmogênico da NA, o qual parece depender exclusivamente da ocupação de adrenoceptores β no tecido atrial esquerdo do rato.

Tabela 4.4 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico da NA e da PHE, na ausência (controle) e presença de antagonistas em AE. NA + 1 μ M PHT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 ; NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO: estimulação seletiva de adrenoceptores α_1 . Foi utilizado o protocolo 5 Hz + 3 pausas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.4, e os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1. Min e Max estão expressos como o número médio de CE/min. Para as curvas na presença de PRO, estão apresentados os valores reais na ausência (Min) e presença de 0,1 mM de NA ou PHE (Max). N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP.

GRUPO (N)	NA (N = 13)	NA + PHT (N = 10)	NA + PRO (N = 5)	PHE + PRO (N = 10)
Min (CEs/min)	-2,7 ± 4,6	2,2 ± 2,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Max (CEs/min)	161 ± 11	155 ± 13	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,1
pD ₂	5,338 ± 0,135	5,151 ± 0,141	_	_
R ²	0,987	0,968	Ajuste não convergiu	Ajuste não convergiu



Figura 4.4 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arrítmico da NA e da PHE, na ausência e presença de antagonistas, em AE. **A**: NA + 1 μ M PHT (estimulação seletiva β_1); **B**: NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO (estimulação seletiva α_1). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como a média do número de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de NA ou PHE. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.4.

As mesmas combinações de fármacos foram testadas em MV, no entanto, na ausência de ATR, uma vez que esta preparação é desprovida de qualquer tipo de inervação.

Pelos resultados na Tabela 4.5 e na Figura 4.5A, podemos observar que em MV, assim como em AE, Max à NA não foi afetada pelo bloqueio de adrenoceptores α por PHT (p = 0,378, teste t de Student). Porém, o tratamento com PHT causou aumento da sensibilidade à NA, caracterizado por um aumento do pD₂ de 0,8 unidades logarítmicas (p < 0,001, teste t de Student). De modo semelhante ao observado em AE, NA não evocou resposta arrítmica significativa durante o bloqueio de adrenoceptores β por PRO (não houve convergência do ajuste, Figura 4.5B). Os valores apresentados na tabela correspondem às médias dos valores reais na ausência dos agonistas (Min) e na presença de 0,1 mM (Max) dos mesmos. Assim como em AE, esta concentração de agonista não aumentou a freqüência de CE na presença de PRO (p = 1,000 e 0,728 *vs* valor na ausência do agonista, para NA e PHE, respectivamente, teste t de Student).

Tabela 4.5 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico da NA e da PHE, na ausência (controle) e presença de antagonistas, em MV. NA + 1 μ M PHT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 ; NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO: estimulação seletiva de adrenoceptores α_1 . Foi utilizado o protocolo 0,5 Hz + 3 pausas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.5, e os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1. Min e Max estão expressos como o número médio de CE/min. Para as curvas na presença de PRO, foram utilizados os valores reais na ausência (Min) e presença de 0,1 mM de NA ou PHE (Max). N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001 *vs* NA (teste t de Student).

GRUPO (N)	NA (N = 5)	NA + PHT (N = 13)	NA + PRO (N = 8)	PHE + PRO (N = 10)
Min (CEs/min)	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,8	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Max (CEs/min)	$9,2\pm0,5$	8,8 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2
pD ₂	6,643 ± 0,190	7,436 ± 0,083***	_	_
R ²	0,938	0,987	Ajuste não convergiu	Ajuste não convergiu



Figura 4.5 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arrítmico da NA e da PHE, na ausência e presença de antagonistas, em MV. **A**: NA + 1 μ M PHT (estimulação seletiva β_1). **B**: NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO (estimulação seletiva α_1). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como a média do número de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de NA ou PHE. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.5.

O conjunto desses resultados indica, portanto, que a ativação e receptores α_1 adrenérgicos não é arritmogênica tanto em miocárdio atrial, quanto ventricular, de rato.

Para investigar se a ausência de resposta arritmogênica para ativação de receptores do tipo α seria associada a uma possível ausência de efeito inotrópico mediado por este tipo de receptor, determinamos a resposta inotrópica a NA e PHE nas mesmas preparações usadas para determinação da resposta arrítmica. Os parâmetros e as curvas concentração-efeito inotrópico, em AE estão apresentados na Tabela 4.6 e na Figura 4.6.

É importante ressaltar que os valores de pD_2 para a resposta inotrópica a NA e ao ISO em AE apresentados aqui não correspondem aos valores típicos relatados na literatura (entre 7 e 8, e entre 8 e 9, respectivamente, Bassani e Bassani, 1991; Silveira *et al.*, 2003). Isto se deve aparentemente à aplicação dos trens de 5Hz, como mostrado em experimentos preliminares. No entanto, uma análise comparativa ainda é possível, já que o mesmo protocolo foi usado em todos os experimentos.

Tabela 4.6 – Parâmetros das curvas concentração-efeito inotrópico da NA e da PHE, na ausência (controle) e presença de antagonistas, em AE. NA + 1 μ M PHT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 ; NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO: estimulação seletiva de adrenoceptores α_1 (curvas apresentadas na Figura 4.6). Os parâmetros obtidos do ajuste foram: Min: força de contração na ausência do agonista; Rmax: resposta inotrópica máxima (Rmax = Max - Min); e pD₂: logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax. Min e Rmax estão expressos como tensão desenvolvida (gf). N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. ** p < 0,01; * p < 0,05 *vs* NA (teste de Bonferroni).

GRUPO (N)	NA (N = 13)	NA + PHT (N = 8)	NA + PRO (N = 5)	PHE + PRO (N = 10)
Min (gf)	2,0 ± 0,6	3,0 ± 1,2	$2,0\pm1,1$	0,6 ± 0,3
Rmax (gf)	154 ± 10	172 ± 16	83 ± 7 **	97 ± 6
pD ₂	5,770 ± 0,166	$5,331 \pm 0,226$	6,526 ± 0,309 *	5,064 ± 0,064
R ²	0,951	0,910	0,849	0,992



Figura 4.6 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico da NA e da PHE, na ausência e presença de antagonistas, em AE. **A**: NA + 1 μ M PHT (estimulação seletiva β_1); **B**: NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO (estimulação seletiva α_1). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como aumento da tensão desenvolvida (gf). No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de NA ou PHE. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.6.

A análise de variância demonstrou que tanto a Rmax, quanto o pD₂ da NA foram afetados pela presença de antagonistas (p = 0,001 e p = 0,011, respectivamente; análise de variância). Observamos que a exposição a 0,1 μ M PHT não alterou significativamente os valores de Rmax e de pD₂ para NA em AE (p > 0,05, Figura 4.6A). Durante bloqueio de adrenoceptores β por PRO, observou-se resposta inotrópica significativa tanto a NA, quanto a PHE, embora Rmax tenha correspondido a 50-60% daquela à NA na ausência de antagonistas (p< 0,01), ou durante o bloqueio de adrenoceptores α por PHT (Figura 4.6B). Os valores de Rmax inotrópica na presença de PRO foram comparáveis para NA e PHE, (p = 0,179, teste t de Student). O valor de pD₂ da NA na presença de PRO foi maior do que na ausência da antagonista (p < 0,05).

A análise da resposta inotrópica também foi estendida para as preparações ventriculares, como mostrado na Tabela 4.7 e na Figura 4.7. Os resultados em MV foram semelhantes aos obtidos em AE. Tanto Rmax, quanto pD₂ foram afetados pela presença de antagonistas (p < 0,001, para ambos parâmetros, análise de variância). O bloqueio de adrenoceptores α por PHT não alterou os parâmetros analisados (p > 0,05, para Rmax e pD₂), enquanto o bloqueio de adrenoceptores β por PRO (Figura 4.7B) reduziu significativamente o valor de Rmax (p < 0,001) e deslocou a curva para direita, com uma redução do valor do pD₂ em mais de uma unidade logarítmica (p < 0,001). Na presença de 1 μ M de PRO, observamos que a Rmax à NA foi dobro daquela à PHE (p < 0,001, teste t de Student).

Estes resultados em AE e MV indicam, portanto, que a estimulação de adrenoceptores α evoca uma resposta inotrópica positiva, embora de menor magnitude do que a reposta β -adrenérgica, sem que seja produzido qualquer efeito arritmogênico.

Tabela 4.7 – Parâmetros das curvas concentração-efeito inotrópico da NA e da PHE, na ausência (controle) e presença de antagonistas, em MV. NA + 1 μ M PHT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 ; NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO: estimulação seletiva de adrenoceptores α_1 . As curvas estão apresentadas na Figura 4.7, e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Min: encurtamento de pico (em porcentagem do comprimento celular em repouso diastólico, % CR) na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica (Rmax = Max - Min), expressa do mesmo modo que Min; e pD₂: o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax. N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001 *vs* NA (teste de Bonferroni). §§§ p < 0,001 *vs* NA+PRO (teste t de Student).

GRUPO (N)	NA (N = 5)	NA + PHT (N = 13)	NA + PRO (N = 8)	PHE + PRO (N = 10)
Min (% CR)	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Rmax (% CR)	5,0 ± 0,2	5,4 ± 0,1	2,2 \pm 0,2 ***	1,0 \pm 0,1 ^{§§§}
pD ₂	6,946 ± 0,159	$\textbf{7,262} \pm \textbf{0,082}$	5,725 ± 0,269 ***	5,838 ± 0,281
R ²	0,958	0,987	0,878	0,869



Figura 4.7 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico da NA e da PHE, na ausência e presença de antagonistas, em MV. **A**: NA + 1 μ M PHT (estimulação seletiva β_1); **B**: NA + 1 μ M PRO e PHE + PRO (estimulação seletiva α_1). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como aumento do encurtamento celular de pico (encurtamento, em % CR). No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de NA ou PHE. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.7.

4.2.2 Participação dos Receptores Adrenérgicos $\beta_1 X \beta_2$

Na secção 4.1.2 deste capítulo, observamos que, mesmo na presença de ATR, Max do efeito arritmogênico do ISO em AE foi cerca de 50% daquele da NA. Este resultado, portanto, sugere que ISO apresente menor eficácia arritmogênica que NA. Por outro lado, a maior eficácia aparente da NA não poderia ser explicada pela presença de um forte componente da resposta arritmogênica mediada por adrenoceptores α , pois observamos que a estimulação deste tipo de receptores foi incapaz de evocar arritmogênese em nossos experimentos (secção 4.2.2). Uma possibilidade para explicar a diferença entre as respostas arritmogênicas a NA e ao ISO seria um efeito anti-arrítmico da ativação de receptores do subtipo β_2 pelo último agonista (mas não pelo primeiro), que antagonizaria a ação francamente pró-arrítmica da via acoplada a receptores do subtipo β_1 (estimulada por ambas os agonistas).

Para investigar esta possibilidade, utilizamos como agonista, além da NA e do ISO, o salbutamol (SAL), que ativa adrenoceptores β_2 preferencialmente a receptores β_1 (Brodde e Michel, 1999; Handley, 1999; Yang, *et al.*, 1999). Receptores dos subtipos β_1 e β_2 foram bloqueados pelos antagonistas seletivos metoprolol (MET, 0,5 μ M, utilizado em apenas alguns experimentos com AE) e butoxamina (BUT, 0,3 µM), respectivamente. Além disso, alguns experimentos foram realizados durante exposição contínua a 10 µM SAL, para promover estimulação tônica de adrenoceptores do subtipo β_2 . BUT, MET e SAL não afetaram significativamente a força de contração em AE (288 ± 21 e 330 ± 14 gf na ausência e presença de BUT, respectivamente, N = 6, p = 0,221; 302 ± 58 e 289 ± 59 gf na ausência e presença de MET, respectivamente, N = 3, p = 0.883; 264 ± 27 e 294 ± 35 gf na ausência e presença de SAL, respectivamente, N = 8, p = 0,508). De modo semelhante, o encurtamento de pico em MV também não foi afetado $(1,1 \pm 0,2 e 1,0 \pm 0,1)$ % CR, na ausência e presença de BUT, respectivamente, N = 5, p = 0,667; 1,5 ± 0,4 e 1,6 ± 0,4 % CR, na ausência e presença de SAL, respectivamente, N = 7, p = 0,863). O número de CE/min não foi alterado por estes fármacos na ausência de agonistas em AE $(0.5 \pm 0.4 \text{ e } 0.9 \pm 0.5 \text{ CE/min}$ na ausência e presença de BUT, respectivamente, N= 6, p = 0,546; 0,3 ± 0,4 e 0,5 ± 0,3 CE/min na ausência e presença de MET, respectivamente, N= 3, p = 0,710; 0,5 ± 0,3 e 0,4 ± 0,2 CE/min na ausência e presença de SAL, respectivamente, N= 6, p= 0,787) e em MV (0,5 \pm 0,4 e 0,1 \pm 0,1 CE/min na ausência e presença de BUT, respectivamente, N = 6, p = 0,355; 0,6 \pm 0,5 e 0,4 \pm 0,1 CE/min na ausência e presença a de SAL, respectivamente, N = 6, p = 0,703).

Para investigar se a estimulação de adrenoceptores β_2 é arritmogênica, foram realizados alguns poucos experimentos utilizando como agonista ISO ou SAL, na presença de 0,5 μ M de MET (bloqueador seletivo β_1). Os resultados, apresentados na Figura 4.8, mostram que a ativação deste subtipo de receptor por qualquer um dos agonistas evoca uma resposta arrítmica desprezível (não houve convergência das curvas). O número de CE/min foi de 0,1 ± 0,1 e 18,7 ± 15,9 antes da adição do ISO e na presença de 10 μ M ISO, respectivamente (N = 3, p = 0,304). Este último valor correspondeu a apenas cerca de 20% daquele na presença da mesma concentração de ISO, na ausência de MET. Para SAL, a resposta foi menor ainda: de 0,2 ± 0,2 e 1,5 ± 1,2 CE/min antes da adição de SAL e na presença de 300 μ M SAL, respectivamente (N = 3, p = 0,321). Estes resultados indicam, que a estimulação de adrenoceptores β_2 não é arritmogênica.



Figura 4.8 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arrítmico do ISO e SAL, em AE, na ausência e presença de 0,5 μ M MET (antagonista de adrenoceptores β_1). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como número médio de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO ou SAL. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP.

As curvas concentração-efeito para as respostas arrítmicas evocadas em AE pelo ISO na ausência e presença de BUT (i.e., estimulação preferencial do subtipo β_1), bem como na ausência e presença de SAL (i.e., estimulação tônica do subtipo β_2) e os

respectivos parâmetros estão na Figura 4.9 e na Tabela 4.8, respectivamente. Os experimentos foram realizados na presença de ATR (0,1 μ M).

Tabela 4.8 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico do ISO, na ausência e presença de antagonistas e SAL, em AE. ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . ISO + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . As curvas estão apresentadas na Figura 4.9. Os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1. Min e Max estão expressos como número médio de CE/min. N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. ** p < 0,01; * p < 0,05 *vs* ISO (teste de Bonferroni).

GRUPO (N)	ISO (N = 12)	ISO + BUT (N = 6)	ISO + SAL (N = 6)
Min (CEs/min)	-1,6 ± 4,2	-0,7 ± 9,3	-0,2 ± 2,2
Max (CEs/min)	87 ± 6	122 ± 15 *	38 ± 4 **
pD ₂	7,125 ± 0,177	6,986 ± 0,285	6,848 ± 0,228
R ²	0,976	0,937	0,959

A análise de variância demonstrou que a Max (CE/min) foi significativamente afetada pela presença de BUT ou SAL (p < 0,001). Pode-se observar que o bloqueio de adrenoceptores β_2 com BUT causou um aumento de 40% em Max (p < 0,05, Figura 4.9A). Por outro lado, quando mantivemos constante a estimulação de adrenoceptores β_2 pelo tratamento contínuo com 10 μ M de SAL (Figura 4.9B), notamos Max caiu em mais de 50% (p < 0,01). A análise de variância demonstrou que a sensibilidade ao ISO (estimada pelo seu pD₂) não foi afetada pela presença de BUT ou SAL (p = 0,669).



Figura 4.9 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmogênico do ISO, na ausência e presença de antagonistas e SAL, em AE. **A:** ISO + 0,3 μ M BUT (estimulação seletiva β_1). **B:** ISO + 10 μ M SAL (estimulação tônica β_2). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como número médio de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.8.

Também testamos o envolvimento de adrenoceptores $\beta_1 e \beta_2$ na resposta arrítmica em MV. O tratamento com 0,3 µM BUT, para minimizar a estimulação de adrenoceptores β_2 pelo ISO, levou a um aumento de quase duas vezes de Max (Tabela 4.9 e Figura 4.10A, p < 0,001) e redução do valor de pD₂ (p = 0,028). Por outro lado, quando a resposta a NA foi determinada durante estimulação contínua de adrenoceptores β_2 por 10 µM SAL, houve uma redução significativa (p < 0,001, teste t de Student), da ordem de 40%, de Max, bem como deslocamento da curva para a direita, com redução de pD₂ em mais de 0,5 unidade logarítmica (p = 0,016).

Determinamos também a resposta inotrópica a ISO e NA nas mesmas preparações usadas para a avaliação do efeito arritmogênico. Os parâmetros e as curvas concentração-efeito inotrópico em AE estão apresentados na Tabela 4.10 e na Figura 4.11. A análise de variância demonstrou que a resposta Rmax foi significativamente afetada pela presença de BUT ou SAL (p < 0,001). Foi observada redução de Rmax na presença de BUT (p < 0,001), enquanto que o tratamento com SAL aumentou este parâmetro em ~30% (p < 0,01) No entanto, assim como no caso da resposta arrítmica, o pD₂ não sofreu alteração significativa (p = 0,731).

Tabela 4.9 – Parâmetros das curvas concentração-efeito arritmogênico do ISO e da NA, na ausência e presença de BUT e SAL, respectivamente, em MV. ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . NA + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . As curvas estão apresentadas na Figura 4.10. Os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.1 Min e Max estão expressos como o número médio CE/min. N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001; * p < 0,05 *vs* controle com o mesmo agonista (teste t de Student).

GRUPO (N)	ISO (N = 14)	ISO + BUT (N = 6)	NA (N = 5)	NA + SAL (N = 6)
Min (CEs/min)	$\textbf{0,9}\pm\textbf{0,1}$	0,1 ± 0,2 ***	1,3 ± 0,6	$\textbf{0,5}\pm\textbf{0,1}$
Max (CEs/min)	4,6 ± 0,2	9,0 ± 0,2 ***	9,2 ± 0,5	5,6 ± 0,2 ***
pD ₂	7,485 ± 0,108	7,076 ± 0,058 *	6,643 ± 0,190	6,076 ± 0,077 *
R ²	0,979	0,994	0,938	0,991



Figura 4.10 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arrítmico do ISO e da NA, na ausência e presença de BUT e SAL, respectivamente, em MV. **A:** ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . **B:** NA + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como número médio de CE/min. No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO ou NA. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.10 – Parâmetros das curvas concentração-efeito inotrópico do ISO, na ausência e presença de BUT e SAL, em AE. ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . ISO + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . As curvas estão apresentadas na Figura 4.11. Os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.6. Min e Rmax estão expressos como tensão desenvolvida (gf). N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001; ** p < 0,01 *vs* ISO (teste de Bonferroni).

GRUPO (N)	ISO (N = 8)	ISO + BUT (N = 6)	ISO + SAL (N = 6)
Min (gf)	27 ± 14	13 ± 7	-0.9 ± 11
Rmax (gf)	418 ± 25	240 ± 11***	548 ± 20 **
pD ₂	6,745 ± 0,150	6,870 ± 0,117	6,735 ± 0,083
R ²	0,983	0,989	0,995



Figura 4.11 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do ISO, na ausência e presença de BUT e SAL, em AE. **A:** ISO + 0,3 μ M BUT (estimulação seletiva β_1). **B:** ISO + 10 μ M SAL (estimulação tônica β_2). A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como aumento da tensão desenvolvida (gf). No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.10.

Os parâmetros e as curvas concentração-efeito inotrópico obtidas em MV podem ser vistos na Tabela 4.11 e na Figura 4.12. Assim como no caso de AE, observamos que BUT (Figura 4.12A) causou redução da Rmax a ISO em mais de 3 vezes (p < 0,001, teste t de Student) e também reduziu consideravelmente o valor do pD₂ do agonista (p < 0,001). O tratamento com SAL (Figura 4.12B) reduziu a Rmax inotrópica à NA em mais de 50% (p < 0,001, teste t de Student), bem como o valor pD₂ (p = 0,042), de modo diferente do que ocorreu em AE, onde Rmax foi aumentada e o pD₂ não foi afetado.

Tabela 4.11 – Parâmetros das curvas concentração-efeito inotrópico do ISO e da NA, na ausência e presença de antagonistas de BUT e SAL, respectivamente, em MV. ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . NA + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . As curvas estão apresentadas na Figura 4.12. Os parâmetros obtidos do ajuste foram os mesmos descritos na legenda da Tabela 4.7. Min e Rmax estão expressos como porcentagem do comprimento celular em repouso (% CR). N indica o número de experimentos. Os valores médios de cada parâmetro estão acompanhados dos respectivos EP. *** p < 0,001; * p < 0,05 *vs* controle com o mesmo agonista (teste t de Student).

GRUPO (N)	ISO (N = 10)	ISO + BUT (N = 5)	NA (N =5)	NA + SAL (N = 7)
Min (% CR)	0,02 ± 0,13	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,17	0,13 ± 0,10
Rmax (% CR)	6,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1 ***	5,0 ± 0,2	2,1±0,1 ***
pD ₂	7,908 ± 0,067	6,777 ± 0,083 ***	6,946 ± 0,159	$6,486 \pm 0,123$ *
R ²	0,993	0,987	0,958	0,992



Figura 4.12 – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do ISO e da NA, na ausência e presença de BUT e SAL, respectivamente, em MV. **A**: ISO + 0,3 μ M BUT: estimulação seletiva de adrenoceptores β_1 . **B**: NA + 10 μ M SAL: estimulação tônica de adrenoceptores β_2 . A resposta (eixo das ordenadas) está expressa como aumento do encurtamento celular de pico (encurtamento, em % CR). No eixo das abscissas, está o logaritmo da concentração molar de ISO ou NA. Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o EP. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.11.

Capítulo 5

Discussão

5.1 Método Desenvolvido para Determinação da Relação Concentração-Efeito Arritmogênico em Preparações Isoladas

No presente trabalho, foi desenvolvida uma abordagem alternativa àguela descrita por Grimm et al (1998) para determinação da relação concentração-efeito arritmogênico em preparações cardíacas isoladas. Essa abordagem, desenvolvida inicialmente para tecido atrial esquerdo, foi baseada na criação de protocolos estimulatórios que permitissem discernir e computar episódios de atividade espontânea na ausência e presença de diferentes concentrações de agonistas. Para tanto, usou-se 1 ou 3 pausas estimulatórias, intercaladas por períodos de estimulação elétrica. Durante estes períodos, aplicou-se, em alguns casos, estimulação a uma fregüência 10 vezes maior que a basal, para favorecer sobrecarga de Ca²⁺, implicada na geração de arritmias cardíacas (Marbán et al., 1986; Merillat et al., 1990; Bassani et al., 1997). Assim, o efeito desta estimulação era sobreposto ao aumento da mobilização celular deste íon causado por agonistas adrenérgicos (portanto, a estimulação elétrica seria sinérgica com a estimulação adrenérgica para facilitar o aparecimento de atividade espontânea). O mecanismo provável da relação entre sobrecarga de Ca²⁺ e arritmogênese parece ser a geração de corrente despolarizante pela extrusão, via NCX, de Ca²⁺ liberado do RS durante a diástole a uma taxa maior, em razão do aumento do conteúdo de Ca2+ nesta organela (Bassani et al., 1995; Shannon et al., 2000; Bassani et al., 2002; Shannon et al., 2002; Bassani e Bassani, 2003).

Quando usado apenas um período de pausa, observamos que a estimulação prépausa a 5 Hz causou um aumento significativo em ambas eficácia e potência arritmogênicas aparentes da NA. Deve-se ressaltar que a freqüência de 5 Hz não é inferior aos valores medidos *in vivo* em ratos acordados, inclusive em nosso laboratório (Morimoto *et al.*, 2004; J.P.E. Alonso e J.M.W. Bassani, resultados não publicados). Considerando os protocolos com apenas 1 período de observação, é importante notar que o aumento da freqüência pré-pausa de 0,5 para 5 Hz, apesar de favorecer aumento da carga de Ca²⁺, não mostrou arritmogenicidade intrínseca na ausência de NA, embora tenha facilitado a manifestação do efeito arritmogênico da NA.

No entanto, o fator chave do protocolo estimulatório foi a distribuição dos períodos de observação. A interposição de 3 períodos de observação, de 1 min de duração cada, permitiu a obtenção de curvas que seguem satisfatoriamente o modelo da teoria de ocupação de receptores, e das quais foi possível determinar os parâmetros que caracterizam a reatividade do tecido para este efeito particular, em contraste com os resultados pouco confiáveis obtidos com o uso de apenas 1 período de observação. Experimentos preliminares (Boer e Bassani, 2004) revelaram que o uso de 3 pausas de 1 min resultava num total de CE maior do que o uso de um único período de observação com duração de 3 min, porque a maioria das CE ocorre durante os 30-40 s iniciais da pausa estimulatória. Isto deve ocorrer possivelmente porque a extrusão de Ca²⁺ durante a diástole, principalmente via NCX, leva a uma depleção progressiva do estoque de Ca²⁺ do RS (Bassani e Bers, 1994). Por outro lado, não seria recomendável incluir muitos períodos de observação (além de 3), porque o prolongamento da exposição da preparação ao agonista poderia modificar a resposta ao subsegüente aumento da concentração de NA, devido a dessensitização dos receptores, induzida pelo agonista (Bristow et al., 1988b; Brodde et al., 1989).

Nossos resultados em AE indicam que, com o uso de 3 períodos curtos de observação, valores de Max e pD₂ da NA foram independentes da freqüência do trem estimulatório pré-pausa; portanto, o efeito da estimulação a 5 Hz restringiu-se ao protocolo de 1 pausa. É interessante observar que a distribuição do número de CEs pelos 3 períodos de observação sucessivos, na presença do agonista, não foi igual para diferentes fregüências pré-pausa. Quando os átrios eram estimulados a 5 Hz antes da pausa, o número de CE distribuía-se equilibradamente nos 3 períodos de observação (33 \pm 3%, 31 \pm 4% e 36 \pm 4% do número total de CE durante o primeiro, segundo e terceiro períodos, respectivamente). Entretanto, quando o tecido era estimulado em 0,5 Hz antes da pausa, o número de CE foi muito menor durante o primeiro período de observação, aumentando nos períodos subseqüentes (4 ± 2%, 38 ± 11% e 58 ± 12% do número total de CE, durante o primeiro, segundo e terceiro períodos, respectivamente). Assim, a aplicação sucessiva de períodos de observação parece facilitar a manifestação do efeito arritmogênico da NA, não só pelo aumento da amostragem, mas também pela potencialização do efeito da NA. É possível que o efeito arritmogênico da NA seja mais lento para se desenvolver do que seu efeito inotrópico positivo, o qual se estabiliza depois de 2 min de incubação com o agonista. Porém, apesar do período de incubação ter sido o mesmo, o aumento progressivo do número de CE não foi observado quando a estimulação pré-pausa foi de 5 Hz. Isto pode ter ocorrido porque o aumento inicial da carga de Ca²⁺, provocado pelo primeiro trem estimulatório de 5 Hz, facilitaria a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares durante a pausa (o que é arritmogênico, Bassani *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 2002), acelerando assim a instalação do efeito arritmogênico do agonista.

Outro ponto importante neste método foi a forma de processamento dos dados. Mesmo com o protocolo 5 Hz + 3 pausas, nem todas as preparações atriais mostraram uma relação concentração-efeito passível de ajuste por uma função sigmóide. Mesmo quando tal relação era observada, o valor de Max variou entre preparações individuais em até 3 ordens de magnitude. Assim, ao invés de obtermos a média dos parâmetros estimados com ajuste de curvas individuais (como é usual), procedemos a um único ajuste com as respostas combinadas do *pool* de AE. Deste ajuste, foi possível obter os valores médios e de EP dos parâmetros que caracterizam a relação entre a concentração do agonista e a resposta arrítmica. A grande variabilidade da resposta entre átrios parece ser devida à necessidade de propagação da ativação elétrica gerada espontaneamente para uma massa crítica de miocárdio, de modo a gerar uma contração mensurável. Em MV, preparação na qual esta restrição não se aplica, foi possível obtermos curvas individuais com muito menor variabilidade dos parâmetros. Mais importante, os valores médios destes parâmetros obtidos de curvas individuais foram comparáveis aos calculados usando o ajuste único das respostas da população de células, o que indica a validade do uso da abordagem populacional em AE.

É interessante comparar os valores de pD₂ da NA para inotropismo e arritmogênese em AE de rato. Neste trabalho o valor pD₂ para a resposta arrítmica foi da ordem de 5 (i.e., a concentração efetiva para 50% da resposta máxima, EC₅₀, estava faixa micromolar), que é um valor bem menor do que aquele para a resposta inotrópica, previamente determinado no mesmo tipo de preparação, entre 7 e 8 (EC₅₀ na faixa de centésimo de micromolar, Bassani e Bassani, 1991; Moura, 2002; Silveira *et al.*, 2003; os valores para inotropismo aqui relatados não se prestam à esta comparação, veja a seguir). Como mostrado na Figura 4.1, o efeito arritmogênico da NA começou a se desenvolver na presença de 1 μ M NA, concentração na qual a resposta inotrópica está próxima do seu máximo. Isto mostra a larga margem de segurança dos efeitos da NA, já que arritmogênese requer uma concentração do agonista cerca de 100 vezes maior do que aquelas efetivas para estimulação do inotropismo.

É importante destacar que os valores pD₂ para a resposta inotrópica a NA e a ISO em AE no presente estudo foram atipicamente baixos, comparados aos descritos anteriormente, inclusive em nosso laboratório, (Bassani e Bassani, 1991; Moura, 2002; Silveira *et al.*, 2003), aparentemente devido à aplicação dos trens de 5Hz. Portanto, os valores pD₂ para inotropismo em AE apresentados neste trabalho devem ser considerados apenas para efeito de comparação (já que o mesmo protocolo foi usado para todos os experimentos com um dado tipo de preparação), e não podem ser tomados como uma expressão da potência do agonista para este tipo de efeito. Para experimentos com AE nos quais a análise da resposta inotrópica seja fundamental, ainda é possível utilizar o método desenvolvido, omitindo-se a estimulação pré-pausa a 5 Hz já que mostramos que a resposta arrítmica à NA não dependeu da freqüência pré-pausa quando 3 pausas foram utilizadas. No nosso caso, optamos pelo uso do trem de 5 Hz por segurança para maximização do efeito arritmogênico, especialmente do ISO.

O método desenvolvido, além de efetivo, apresentou as seguintes vantagens:

- a) Do ponto de vista experimental, é de simples execução, e pode ser utilizado em outras preparações miocárdicas multicelulares, tais como músculo papilar, trabéculas e tiras de tecido atrial e ventricular;
- b) Requer relativamente um número bem menor de preparações (5-8) do que a abordagem de amostragem populacional, o que está em acordo com a política mundial de racionalização do uso de animais experimentais.
- c) Permite que seja levada em conta a severidade do efeito arritmogênico para cada concentração do agonista.
- d) Apesar da presente aplicação ter sido restrita a agonistas adrenérgicos, o método pode ser utilizado para outros agentes químicos que possam evocar efeito arrítmico por aumento da carga celular de Ca²⁺ ou outro mecanismo que cause geração de atividade espontânea (embora não se aplique a agentes pró-arrítmicos que favoreçam o aparecimento de reentrância da onda de excitação). Mais ainda, o método pode ser utilizado na indústria farmacêutica, para teste de agentes anti-arrítmicos em desenvolvimento para possível uso clínico.

5.2 Arritmogênese Cardíaca Induzida por Catecolaminas: Adrenoceptores Alfa e Beta

No tecido cardíaco, NA exerce seus efeitos pela ocupação de receptores adrenérgicos dos tipos α e β , e há evidência de que ambos os tipos parecem contribuir para a resposta inotrópica positiva a NA e Adr em miocárdio de mamíferos (e.g., Skomedal et al., 1988; Jahnel et al., 1992). A ativação de adrenoceptores a parece envolver, entre outros fatores, a hidrólise de fosfolípides de inositol da membrana e a modulação da atividade da PKC. O efeito inotrópico positivo tem sido associado à alcalinização citoplasmática (via estimulação do trocador Na⁺-H⁺ pela PKC). Também tem sido relatado aumento da amplitude do transiente de Ca²⁺ (Fedida et al., 1993; Térzic et al., 1993, Bers, 2001), possivelmente causado por prolongamento do PA devido à modulação de correntes iônicas transmembrana (Ertl et al., 1991). A ativação da via βadrenérgica, por outro lado, parece envolver um aumento da síntese de AMPc e conseqüente ativação da PKA. Esta enzima fosforila substratos não apenas no sarcolema, como por exemplo, o canal de Ca2+ do tipo L (causando, assim como a estimulação α adrenérgica, aumento do influxo de Ca²⁺), mas também substratos intracelulares, como o PLB (o que causa aumento do conteúdo de Ca²⁺ do RS), promovendo, assim, marcantes alterações no ciclo celular de Ca²⁺ (Bers, 2001).

Como conseqüência da estimulação conjunta de receptores α - e β -adrenérgicos, há um aumento do influxo de Ca²⁺, bem como um aumento da captação de Ca²⁺ pelo RS. Isto pode levar a aumento da carga de Ca²⁺ do RS e da taxa de liberação diastólica de Ca²⁺ do RS, o que resultaria na geração de corrente despolarizante via NCX. Como vimos, este último efeito tem sido associado com arritmogênese em miocárdio de mamíferos, e parece ser o mecanismo básico do efeito pró-arrítmico da NA (Bassani *et al.*, 1997; Zygmunt *et al.*, 1998; Pogwizd *et al.*, 1999; Schlotthauer e Bers, 2000).

Nossos resultados apontam envolvimento apenas da via β -adrenérgica na arritmogênese induzida por NA. A estimulação seletiva de adrenoceptores α (i.e., durante bloqueio de adrenoceptores β por PRO), quer pela NA, quer pelo agonista seletivo PHE, foi incapaz de produzir atividade espontânea em AE ou MV. Observamos que a estimulação de adrenoceptores α evoca uma resposta inotrópica positiva em ambas a preparações, embora de menor magnitude do que a reposta β -adrenérgica, sem que seja produzido qualquer efeito arritmogênico. De acordo com nossos resultados, o componente α -adrenérgico da resposta inotrópica à NA não parece ser de grande

relevância em átrio e ventrículo de rato, já a resposta ao neurotransmissor foi praticamente a mesma durante bloqueio de adrenoceptores α , mas foi marcantemente deprimida pelo bloqueio de adrenoceptores β . Não podemos descartar a possibilidade de que esta redução do efeito inotrópico e abolição do efeito arritmogênico da NA envolva um efeito estabilizante de membrana pelo PRO, dado que Doggrell (1990) observou perda de excitabilidade em AE na presença deste antagonista ($\leq 1 \mu$ M). Por outro lado, tal efeito não parece ter sido importante nos presentes experimentos, já que 1 μ M PRO causou apenas uma pequena redução ($\leq 10\%$), não significativa, na amplitude de contrações em AE e MV.

Em ventrículo de mamíferos normais, a resposta inotrópica máxima à ativação de receptores α_1 é tipicamente menor que a resposta β -adrenérgica máxima, atingindo ~30% desta no rato (Sjaastad *et al.*, 2003), ~50% em coelho (Aass *et al.*, 1983) e 15-35 % em humanos (Taguchi *et al.*, 1998). Nossos resultados, que mostram que a resposta inotrópica máxima de MV à NA na presença de PRO foi cerca de 50% daquela na presença de PHT, estão, portanto, consistentes com estudos anteriores. Em MV expostos a PRO, a Rmax inotrópica à NA foi 2 vezes maior que aquela ao agonista seletivo de adrenoceptores α_1 , PHE. Estudos anteriores também encontraram uma resposta inotrópica máxima α_1 -adrenérgica de menor magnitude para a PHE do que para a NA (Skomedal *et al.*, 1997), possivelmente, porque o primeiro trata-se de um agonista parcial (Taguchi *et al.*, 1998). No entanto, esta diferença não foi observada em AE.

Entretanto, em ratos com insuficiência cardíaca congestiva, a estimulação de adrenoceptores α_1 parece ter uma participação relativa maior na resposta inotrópica, o que pode ter um papel compensatório à atenuação da resposta β -adrenérgica, que se encontra deprimida nesta condição (Sjaastad *et al.*, 2003). Além disso, em miocárdio humano com insuficiência cardíaca, a NA é aparentemente equipotente e possui a mesma eficácia para a resposta inotrópica de ambos os tipos de adrenoceptores (Skomedal *et al.*, 1997, 2001). Maior participação de adrenoceptores α_1 na resposta inotrópica ao neurotransmissor tem importante papel protetor, uma vez que, como observada no presente trabalho, a estimulação destes receptores não tem efeito arritmogênico.

A falta de efeito arritmogênico da via α -adrenérgica também foi observada em miócitos ventriculares de cão, nos quais a estimulação seletiva destes receptores foi incapaz de produzir pós-despolarizações, embora causasse prolongamento do PA. Por outro lado, a estimulação seletiva de adrenoceptores β mostrou-se efetiva na indução de

EAD e DAD na mesma preparação, de forma dependente da função do SR e do NCX (Zygmunt *et al.*, 1998).

É possível que exista alguma correlação entre a resposta inotrópica e a arrítmica, ou seja, que a ausência de arritmogênese pela estimulação α -adrenérgica esteja associada à sua baixa eficácia inotrópica. Uma possibilidade plausível é que o grau de aumento da mobilização de Ca²⁺ causado pela estimulação destes receptores seja bem menor do que aquele causado pela ativação de adrenoceptores β . No primeiro caso, grande parte do efeito inotrópico parece se dever a sensibilização dos miofilamentos ao Ca²⁺ pela alcalinização citosólica, o que não requer aumento da carga celular do íon (Térzic *et al.*, 1993). Além disso, o modesto aumento do PA, já que o efeito da PKC sobre canais de Ca²⁺ do tipo L é tipicamente pequeno ou mesmo negativo (van der Heyden *et al.*, 2005). Já o efeito inotrópico positivo agudo da estimulação da via β -adrenérgica é totalmente dependente do mobilização celular de Ca²⁺, o qual é considerável. Particularmente, o aumento da mobilização de Ca²⁺ pelo RS parece ser um fator primordial, tanto para o efeito inotrópico, quanto para a arritmogênese (Zygmunt *et al.*, 1998; Bassani e Bassani, 2003 Balasubramaniam *et al.*, 2005).

5.3 Arritmogênese Cardíaca Induzida por Catecolaminas: Subtipos de Adrenoceptores Beta

Nossos resultados mostraram que, mesmo na presença de ATR, a resposta arrítmica máxima ao ISO foi cerca de 50% daquele à NA em AE. O mesmo foi observado em MV, na ausência de ATR (Tabela 4.9). Estes resultados, portanto, sugerem marcante diferença na eficácia arritmogênica destes agonistas. A maior eficácia aparente da NA não poderia ser explicada pela existência de um forte componente da resposta arritmogênica mediado por adrenoceptores α , pois a estimulação seletiva deste tipo de receptores foi totalmente incapaz de evocar atividade espontânea, quer em AE, quer em MV. Uma possibilidade para explicar essa diferença seria um antagonismo funcional entre a ação pró-arrítmica da via acoplada a adrenoceptores β_1 (ativados por ambos os agonistas) e uma possível ação anti-arrítmica mediada pela ocupação de adrenoceptores β_2 pelo ISO apenas, resultando em menor eficácia arritmogênica do que a ativação de apenas adrenoceptores do subtipo β_1 pela NA.
Na ausência de antagonistas, a razão da Max arrítmica a ISO e NA foi 0,5 em MV, mas bem mais baixa (~0,07) em AE. A princípio, esta discrepância poderia ser devida a diferenças dependentes da região do coração quanto à densidade de adrenoceptores, seu acoplamento com as respectivas vias de sinalização e/ou mecanismos efetores destas vias. Alternativamente, poderia haver algum fator característico da preparação atrial que contribuísse para favorecer a ação arritmogênica da NA e/ou deprimir aquela do ISO. Sabe-se que, em AE, pode ocorrer apreciável liberação espontânea de ACh de terminações para-simpáticas (Pappano e Volle, 1962; Bassani et al., 1987), e que este neurotransmissor tipicamente antagoniza os efeitos mediados pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Bers, 2001). Quando tratamos a preparação com ATR, bloqueando os receptores colinégicos muscarínicos, a Max do ISO aumentou consideravelmente, mas a resposta da NA não se alterou (a razão de Rmax passou de 0.07 para ~0.55). ACh poderia também agir em receptores muscarínicos pré-juncionais presentes nas terminações simpáticas do tecido, inibindo a liberação de NA endógena. Porém, se este fosse um fator importante, esperaríamos que ATR aumentasse a resposta também a NA (e.g., potência), o que não ocorreu: o aumento de potência e eficácia aparente restringiuse a ISO. Outra possibilidade seria que a estimulação de receptores β_2 -adrenérgicos préjuncionais das terminações para-simpáticas atriais pelo ISO, mas não pela NA, facilitaria a liberação de ACh. Este tipo de regulação pré-juncional também existe em terminações simpáticas, porém neste caso, parece ocorrer uma rápida dessensitização, de modo que seria esperado predomínio do efeito da ACh liberada (De Haas et al., 1999). Assim, a ATR atenuaria o efeito antagônico da ACh endógena, propiciando um aumento do efeito arritmogênico do ISO, mas não da NA. Alternativamente, mas não exclusivamente, estes resultados possam ser explicados por um possível sinergismo na ativação de Gi pela estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos pela ACh, e pela ocupação de adrenoceptores β_2 pelo ISO, o que atenuaria de modo significativo a influência arritmogênica da via acoplada a receptores β_1 e Gs. Há indicação de que o acoplamento de adrenoceptores β_2 a Gi seja capaz de deprimir o efeito inotrópico mediado por estimulação β-adrenérgica (Brodde *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2004).

As vias de transdução bioquímica acopladas a adrenoceptores β cardíacos têm recebido grande atenção recentemente. Tem sido proposto que, em miocárdio ventricular, os receptores do subtipo β_2 se acoplem tanto a Gs quanto a Gi, ao passo que receptores β_1 se acoplariam apenas a Gs (Xiao *et al.*, 1995, 1999a,b, 2004). Evidência para o

60

acoplamento dual de adrenoceptores β_2 a Gs e Gi foi relatada tanto no coração de rato, como de cão (Xiao *et al.*, 1995, 1999a,b, 2000, 2004; Kuschel *et al.*, 1999). Kilts et al (2000) e Lonardo et al (2005) também encontraram evidência do acoplamento de receptores adrenérgicos do subtipo β_2 a Gi em átrio direito humano. No entanto, Santos et al (2005) detectaram envolvimento de Gi na resposta β -adrenérgica cronotrópica atrial de ratos apenas após denervação sinoaórtica. Se existe de fato acoplamento de adrenoceptores β_2 a Gi, seria esperado que a estimulação destes receptores evocassem um efeito inotrópico positivo de menor magnitude do que aquele produzido pela estimulação β_1 , devido ao seu efeito dual sobre AC e sobre os níveis de AMPc. Isto tem sido confirmado experimentalmente (Xiao *et al.*, 1999b; McConville *et al.* 2005). Em ventrículo de rato, há indicação de que a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) seja um importante efetor acoplado a Gi, envolvido na atenuação do efeito inotrópico associado a Gs (Cheley *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2002; Xiao *et al.* 2004).

A modulação da força contrátil por estimulação de receptores β_1 parece envolver basicamente mecanismos dependentes de AMPc. Entretanto, os mecanismos acionados pela ocupação de receptores do subtipo β_2 são menos conhecidos. Apesar de haver relato de que estes últimos receptores sejam mais efetivos para estimulação de AC do que adrenoceptores β_1 (Bristow *et al.*, 1989), a relação entre o aumento da concentração intracelular de AMPc e a resposta inotrópica é menos evidente (Xiao et al., 1994, 1999a). Isto levou à proposta de que os receptores do subtipo β_2 possam exercer seu efeito inotrópico por outros mecanismos, além da via da AC-AMPc. (Kuznetsov et al., 1995). Chen et al (1998) sugeriram que os receptores β_2 se localizem bem próximos dos canais de Ca²⁺ na membrana celular (cuja função é estimulada por esta via), e que seu efeito sobre a via Gs/AMPc/PKA seja compartimentalizado apenas para alvos no sarcolema, enquanto que o efeito da ativação de receptores β_1 seria bem mais difuso e atingiria alvos intracelulares, como o PLB. Em experimentos com ventrículo canino, mostrou-se que a estimulação de receptores β_2 produz um aumento do transiente de Ca²⁺, atribuído ao aumento da corrente de Ca²⁺ através de canais do tipo L, mas não aumento da concentração intracelular global de AMPc e de fosforilação do PLB (Altschuld et al., 1995; Kuschel et al., 1999). O tratamento com PKI (inibidor de PKA), entretanto, reverteu os efeitos da estimulação de β_2 -adrenérgica, o que confirma a proposta de compartimentalização sarcolêmica desta via de sinalização (Zhou et al., 1997; Kuschel et *al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999b).

Em experimentos com miócitos ventriculares de ratos tratados com toxina pertússica (PTX, que bloqueia a função de proteínas G contendo a subnidade α i), a ativação de receptores do subtipo β_2 produziu um efeito inotrópico positivo de maior magnitude e associado a fosforilação da PLB, assemelhando-se aos efeitos da estimulação β_1 (Xiao *et al.*, 1995, 1999; Kuschel *et al.*, 1999). Entretanto, PTX não potencializou a acumulação global de AMPc (Zhou *et al.*, 1997) ou a atividade de PKA (Kuschel *et al.*, 1999), o que sugere que o antagonismo associado à ativação de Gi envolva um mecanismo posterior à ativação de PKA, possivelmente a ativação de fosfatases (Kuschel *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 1993).

As restrições espacial e funcional da via β_2 -Gs-AMPc-PKA têm sido explicadas pelo acoplamento adicional deste subtipo de receptor a Gi. Neste processo, a restrição da fosforilação a alvos do sarcolema parece envolver a PI3K, ativada pelas subunidades β e γ da proteína G que contém G α i (Jo *et al.*, 2002). Esta quinase antagonizaria os efeitos da PKA por meio do aumento da atividade de fosfatases, tanto diretamente, por fosforilação das mesmas, quanto indiretamente, via fosforilação e subseqüente inativação do inibidor endógeno I de fosfatases. Estes autores mostraram que a inibição da PI3K em miócitos ventriculares de ratos adultos aumentou consideravelmente a fosforilação do PLB pela PKA durante ativação de adrenoceptores β_2 . Um outro mecanismo proposto para compartimentalização da atividade da PKA, seria a estimulação de fosfodiesterases (PDE), que degradam AMPc (Hohl e Li, 1991; Jurevicius e Fischmeister, 1996), possivelmente de modo dependente de Gi e PI3K (Patrucco et al., 2004; Kerfant et al., 2005).

Olhando mais especificamente o problema da geração de atividade espontânea em tecido cardíaco, há controvérsias quanto ao papel de adrenoceptores do subtipo β_2 , que tem sido considerado tanto de geração, quanto de proteção. Por exemplo, Kaumann e Sanders (1993), estudando tecido atrial isolado de humanos, observaram facilitação da geração de arritmias por NA e Adr na presença de bloqueadores dos receptores adrenérgicos do subtipo β_1 . Billman et al (1997) descreveram, em coração isquêmico de cão, a supressão de FV por antagonistas de adrenoceptores β_2 . Por outro lado, os resultados descritos por Sosunov et al (2000) apontam para o contrário: uma influência anti-arrítmica deste subtipo. Neste estudo, eles encontraram que a incidência de atividade disparada induzida por ISO em coração de cães mostrou-se aumentada na presença de ICI118551, um antagonista seletivo de adrenoceptores β_2 . Além disso, zinterol (agonista seletivo de adrenoceptores β_2) mostrou-se muito menos efetivo na produção de atividade elétrica anormal do que o ISO, o que sugere que a ativação de adrenoceptores β_2 , além de ser pouco arritmogênica, parece antagonizar o efeito pró-arrítmico mediado por adrenoceptores β_1 . Grimm et al (1998) relataram que o bloqueio de Gi por PTX potencializa o efeito arritmogênico do ISO em músculo papilar de rato.

Nossos resultados sugerem não só que a ativação de adrenoceptores β_2 não seja pró-arrítmica (veja Figura 4.9), mas também que estes receptores atuem antagonizando a ação arritmogênica de catecolaminas em miocárdio atrial e ventricular de rato. Esta última conclusão se baseia numa série de observações: a) NA, que não atua em receptores β_2 , tem maior eficácia aparente que ISO em ambas as preparações; b) o bloqueio destes receptores por BUT aumentou consideravelmente a resposta arrítmica máxima ao ISO, particularmente em MV; e c) a estimulação tônica de receptores deste subtipo por SAL reduziu de modo significativo (~40%) a resposta arrítmica máxima a ISO e NA em AE e MV, respectivamente.

Apesar dos efeitos da estimulação de adrenoceptores do subtipo β_2 representarem somente um pequeno componente da resposta inotrópica positiva a catecolaminas em condições fisiológicas normais, estes receptores podem assumir um papel importante como um mecanismo de suporte em condições de insuficiência cardíaca e no envelhecimento (Bohm *et al.*, 1990, 1994a,b, 1995; Brodde *et al.*, 1995), quando ocorre uma regulação negativa seletiva para o subtipo β_1 (Bristow *et al.*, 1988; Steinberg, 1999). Há também indicação de aumento da função de receptores β_2 na mediação das respostas cronotrópica e inotrópica positivas do tecido atrial do rato durante a adaptação ao *stress* (Callia e De Moraes, 1984; Bassani e De Moraes, 1988; Bassani e Bassani, 1993; Vanderlei *et al.*,1996; Moura, 2002), quando pode ocorrer redução da reatividade à estimulação do subtipo β_1 (Callia e De Moraes, 1984; Bassani e De Moraes, 1987). Embora o neurotransmissor simpático NA atue apenas sobre receptores do subtipo β_1 , receptores β_2 podem ser ativados *in vivo* pela Adr, tanto circulante (neurohormônio), quanto co-liberada com NA nas terminações simpáticas (Ramey e Goldstein, 1957).

Seria interessante especular se o favorecimento da sinalização via receptores β_2 no coração (ativados pelo neuro-hormônio Adr), observado durante adaptação ao *stress* e na insuficiência cardíaca poderia ter um papel protetor, pois, embora produzindo um efeito inotrópico de menor magnitude, demandaria menor consumo de oxigênio (McConville *et al.*, 2005), reduziria o risco de morte celular (Cheley *et al.*, 2000) e antagonizaria a ação

arritmogênica da estimulação β_1 (Sosunov *et al.*, 2000; presentes resultados). Cheley et al (2000) encontraram evidência de que a estimulação de adrenoceptores β_2 em miócitos cardíacos de ratos neonatos confere proteção contra apoptose induzida por isquemia. O envolvimento da Gi e PI3K neste efeito foi confirmado pela observação de que a inibição de qualquer uma destas proteínas reverteu o efeito anti-apoptótico.

Como dito anteriormente, tem sido observado que a estimulação de receptores adrenérgicos β_2 , via acoplamento a Gi, não leva a fosforilação da PLB e, portanto, não deve levar a aumento da carga de Ca²⁺ do RS. A inibição de Gi ou da PI3K permite o aumento da fosforilação da PLB por estimulação β - adrenérgica e potencializa os efeitos inotrópico (Xiao *et al.*, 1995, 1999a, 2004; Kuschel *et al.*, 1999) e arritmogênico (Grimm *et al.*, 1998) desta estimulação. Há evidência de aumento do conteúdo de Ca²⁺ do RS no coração de camundongos deficientes em PI3K (Kerfant *et al.*, 2005), alteração classicamente associada ao desenvolvimento de atividade espontânea dependente de sobrecarga de Ca²⁺ (Marbán et al., 1986; Bassani et al., 1997; Bassani e Bassani, 2003). Isto sugere que o envolvimento do aumento da mobilização de Ca²⁺ pelo RS tenha um importante papel na geração de atividade espontânea evocada por agonistas de adrenoceptores β .

Nossos resultados não mostram paralelismo óbvio entre as respostas inotrópica e arritmogênica durante estimulação preferencial de adrenoceptores dos subtipos β_1 e β_2 . Por exemplo, embora a estimulação tônica de adrenoceptores β_2 por incubação contínua com SAL tenha produzido o mesmo efeito depressor da resposta arrítmica a ISO e NA em AE e MV, os efeitos sobre a resposta inotrópica foram discordantes nos dois tipos de preparação. Outro caso é o do bloqueio destes receptores por BUT: observamos efeitos opostos sobre as respostas máximas arrítmica e inotrópica. No entanto, isto não invalida a possibilidade de que o efeito pró-arrítmico de catecolaminas seja determinado por modificação da função de proteínas-alvo específicas, entre as muitas envolvidas na produção do efeito inotrópico positivo. Esta possibilidade está sob investigação mais detalhada em nosso laboratório.

5.4 Conclusões Finais

O método proposto para a quantificação da relação concentração-efeito de agentes pró-arrítmicos em miocárdio isolado de rato mostrou-se efetivo.

Com relação à análise dos tipos de adrenoceptores envolvidos na mediação do efeito arritmogênico de catecolaminas em miocárdio de rato, concluímos que:

- a) Em ambos átrio e ventrículo, a ocupação de adrenoceptores α é aparentemente menos eficaz do que a de adrenoceptores β na produção de efeito inotrópico positivo.
- b) A arritmogênese por catecolaminas em miocárdio atrial e ventricular envolve unicamente adrenoceptores β_1 . A ativação de receptores adrenérgicos α e β_2 não têm qualquer efeito arritmogênico.
- c) Adrenoceptores do subtipo β₂ parecem mediar antagonismo da ação pró-arrítmica da ocupação de receptores β₁. Esta ação anti-arrítmica está presente tanto no átrio esquerdo, quanto no ventrículo.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

Aass H, Skomedal T, Osnes JB. Demonstration of an alpha adrenoceptor-mediated inotropic effect of norepinephrine in rabbit papillary muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 226: 572-78, 1983.

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

Aidley DJ. *The Physiology of Excitable Cells*. 3^a ed., Cambridge University Press, New York, USA, 1989. 534 p.

Altschuld RA, Starling RC, Hamlin RL, Billman GE, Hensley J, Castillo L, Fertel RH, Hohl CM, Robitaille PM, Jones LR. Response of failing canine and human heart cells to $\beta_{2^{-}}$ adrenergic stimulation. *Circulation* 92: 1612-8, 1995.

American Heart Association, 2005. www.americanheart.org

Balasubramaniam R, Chawla S, Grace AA, Huang CL. Caffeine-induced arrhythmias in murine hearts parallel changes in cellular Ca²⁺ homeostasis. *Am J Physiol* 289: H1584-93, 2005.

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: speciesdependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476: 279-93, 1994a.

Bassani JWM, Yuan WL, Bers DM. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 268: C1313-C1319, 1995.

Bassani JW, Bassani RA, Rocha-e-Silva Jr M. Chronotropic and inotropic effects of hyperosmotic solutions on right and left atria isolated from the rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 20: 471-5, 1987.

Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ reloading in mammalian ventricular myocytes. *J Physiol* 559: 591-607, 2004.

Bassani RA, Bassani JWM. Reduced responsiveness to noradrenaline in isolated rat atria exposed to hyperosmotic solutions. *Gen Pharmacol 22*: 151-157, 1991.

Bassani RA, Bassani JWM. Effects of escapable and inescapable foot-shock on rat atrial β -adrenoceptors. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 869-875, 1993.

Bassani RA, Bassani JWM. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am J Physiol* 282: H2406-H2413, 2002.

Bassani RA, Bassani JWM. Papel do Ca²⁺ na geração de arritmias cardíacas: quando a hierarquia é subvertida. *Rev Soc Cardiol Est SP* 5: 693-706, 2003.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures. *J Physiol* 453: 591-608, 1992.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *J Physiol* 476: 295-308, 1994b.

Bassani RA, Bassani JWM, Lipsius SL, Bers DM. Diastolic Ca efflux in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes. *Am J Physiol* 273: H886-H892, 1997.

Bassani RA, Bers DM. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest potentiation of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1335-1347, 1994.

Bassani RA, Bers DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J* 68: 2015-2022, 1995.

Bassani RA, De Moraes S. Sub-sensitivity to beta-agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. *Gen Pharmacol* 18: 473-477, 1987.

Bassani RA, De Moraes S. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta2-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 316-321, 1988.

Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51: 367- 84, 1988.

Bers DM. *Excitation-contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordretch, The Netherlands, 2001. 427 p.

Bers DM, Bridge JHB. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum Ca-pump: ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res* 65: 334-42, 1989.

Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ Res* 93: 487–490, 2003.

Bhagat BD, Rao PS, Dhalla NS. Role of catecholamines in the genesis of arrhythmias. *Adv Myocardiol* 2: 117-32, 1980.

Billman GE, Castillo LC, Hensley J, Hohl CM, Altschuld RA. β_2 -adrenergic receptor antagonists protect against ventricular fibrillation. *Circ Res* 96: 1914-192, 1997.

Blaustein M, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79: 763-854, 1999.

Boer DC, Bassani RA. Quantitation of the dose-response relationship for arrhythmogenic agents in isolated cardiac tissue. *Brazilian J Biomed Engin* 20: 125-132, 2004.

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchanger: nolecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* 88: 1254-58, 2001.

Bohm M, Eschenhagen T, Gierschik P, Larisch K, Lensche H, Mende U, Schimitz W, Schnabel P, Scholz H, Steinfath M, Erdmann E. Radioimmunochemical quantification of Gi in right and left ventricles from patients with ischemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure. *J Mol Cell Cardiol* 26: 133-149, 1994a.

Bohm M, Gierschik P, Jacobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E. Increase of Gi in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82: 1249-1265, 1990.

Bohm M, Kirchmayr R, Erdmann E. Myocardial Gi-protein levels in patients with hypertensive cardiac hypertrophy, ischemic heart disease and cardiogenic shock. *Cardiovasc Res* 30: 611-618, 1995.

Bohm M, Lohse MJ. Quantification of beta-adrenoceptors and β -adrenoceptor kinase on protein and mRNA levels in heart failure. *Eur Heart J* 15: 30-34, 1994b.

Bossuyt J, Ai X, Moorman JR, Pogwizd SM, Bers DM. Expression and phosphorylation of the na-pump regulatory subunit phospholemman in heart failure. *Circ Res* 97: 558-65, 2005.

Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Role of sodium-calcium exchange in activation of contraction in rat ventricle. *J Physiol* 472: 391-413, 1993.

Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, Hoffman BB. Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 1039-45, 1988a.

Bristow MR, Port JD, Hershberger RE, Gilbert EM, Feldman AM. The β -adrenergic receptor-adenylate cyclase complex as a target for therapeutic intervention in heart failure. *Eur Heart J* 10: 45-54, 1989.

Bristow MR, Sandoval AB, Gilbert EM, Deisher T, Mibone W, Rasmussen R. Myocardial α and β -adrenergic receptors in heart failure: is cardiac-derived noradrenaline the regulatory signal? *Eur Heart J* 9: 35-40, 1988b.

Brodde OE. β_1 - and β_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 receptores in the human heart. *Pharmacol Rev* 51: 651-681, 1999.

Brodde OE, Zerkowski HR, Borst HG, Maier W, Michel MC. Drug- and disease-induced changes of human cardiac β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Eur Heart J* 10: 38-44, 1989.

Brodde O, Zerkowski HR, Schranz D, Broede-Sitz A, Michelreher M, Schafer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, Oelert H. Age-dependent changes in the β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenyl cyclase system in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 20-26, 1995.

Brynne L, Karlsson MO, Paalzow LK. Concentration-effect relationship of I-propranolol and metoprolol in spontaneous hypertensive rats after exercise-induced tachycardia. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1152-1158, 1998.

Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3'-5'-phosphate in biological materials. *J Biol Chem* 237: 1244-1250, 1962.

Callia ML, De Moraes S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 450-454, 1984.

Carlsson E, Ablad B, Brandstrom A, Carlsson B. Differentiation blockade of chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. *Life Sci* 11: 953-958, 1972.

Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 79: 917-1017, 1999.

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y. Type I phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22: 4124–4135, 2002.

Cheley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao R-P, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT. The β_2 adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through Gidependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87: 1172-79, 2000.

Chen Y, Xiao R-P, Lakatta EG. Localized signaling pathway that couples β_{2-} but not β_{1-} adrenergic stimulation to L –type calcium channel activation. *J Mol Cell Cardiol.* 30: A128, 1998.

Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol.* 266: C1485-C1504, 1994.

De Haas JRA, Terpstra JS, Zwaag MVD, Kockelbergh PGE, Roffel AF, Zaagsma J. Facilitatory β_2 -adrenoceptors on cholinergic and adrenergic nerve endings of the guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.* 276: L420-L425, 1999.

Delbridge LM, Bassani JWM, Bers DM. Steady-state twitch Ca²⁺ fluxes and cytosolic Ca²⁺ buffering in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 270: C192-C199, 1996.

Doggrell AS. The membrane stabilizing and beta 1-adrenoceptor blocking activity of (+)and (-)-propranolol on the rat left atria. *Gen Pharmacol*.21: 677-80, 1990.

Eisner D, Trafford A. No role for the ryanodine receptor in regulating cardiac contraction? *News Physiol Sci* 15: 275–279, 2000.

Endoh M, Hiramoto T, Ishihata A, Takanashi M, Inui J. Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 68: 1179-90, 1991.

Ertl R, Jahnel U, Nawrath H, Carmeliet E, Vereecke J. Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular heart muscle preparations from rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 574-581, 1991.

Esler M, Kaye D. Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: the role of norepinephrine kinetics. *Heart Fail Rev* 5: 17-25, 2000.

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

Fedida D, Braun AP, Giles WR. α_1 -adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol Rev* 73: 469-487, 1993.

Ferraz SA, Bassani JWM, Bassani RA. Rest-dependence of twitch amplitude and sarcoplasmic reticulum calcium content in the developing rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33: 711-722, 2001.

Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82: 893-922, 2002.

Furchgott RF. Classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, vol. 33. H. Blaschko and E. Muscholl (eds.), Berlin: Springer-Verlag, p. 283-335, 1972.

Garcia EA. Biofísica. Sarvier, São Paulo, SP, 1997.

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* 15: 463-80, 2004.

Gomes PAP. Aplicação de Técnicas de Engenharia no Estudo de Células Cardíacas Isoladas: Medição de $[Ca^{2+}]_i$ e Limiar de Estimulação. Tese de Doutoramento. Faculdade

de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 1997.

Grimm M, Gsell S, Mittmann C, Nose M, Scholz H, Weil J, Eschenhagen T. Inactivation of Gi α proteins increases arrhythmogenic effects of β -adrenergic stimulation in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1917-1928, 1998.

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM. Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 16-22, 1993.

Guyton AC. Coração. *In: Fisiologia Humana*. Guanabara Koogan 6ª. ed., Rio de Janeiro, RJ, p. 128-176, 1988.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 359: 233-53, 1988.

Handley D. The asthma-like pharmacology and toxicology of (S)-isomers of β -agonists. *J Allergy Clin Immunol* 104: S69-S76, 1999.

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Ass. Inc., Massachusetts, USA, 1992. 607 p.

Hohl CM, Li QA. Compartmentation of cAMP in adult canine ventricular myocytes. Relation to single-cell free Ca²⁺ transients. *Circ Res* 69: 1369-79, 1991.

Jahnel U, Kaufmann B, Rombusch M, Nawrath H. Contribution of both α - and β adrenoceptors to the inotropic effects of catecholamines in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346: 665-672, 1992.

Jo S, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao R. Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartimentalizes the concurrent Gs signaling during β_2 -adrenergic stimulation. *Circ Res* 91: 46-53, 2002.

Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 295-9, 1996.

Katzung BG, Morgenstern JA. Effects of extracellular potassium on ventricular automaticity and evidence for a pacemaker current in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 40: 105-11, 1977.

Kaumann AJ, Sanders L. Both β_1 - and β_2 -adrenoceptors mediate catecholamine-evoked arrhythmias in isolated human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348: 536-40, 1993.

Kenakin TP. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev* 36: 165-222, 1984.

Kerfant BG, Gidrewicz D, Sun H, Oudit GY, Penninger JM, Backx PH. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium release and load are enhanced by subcellular cAMP elevations in PI3K γ -deficient mice. *Circ Res* 96: 1079-1086, 2005.

Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM. β_2 -adrenergic and several other G protein–coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i. *Circ Res* 87: 705–709, 2000.

Konhilas JP, Irving TC, Wolska BM, Jweied EE, Martin AF, Solaro RJ, de Tombe PP. Troponin I in the murine myocardium: influence on length-dependent activation and interfilament spacing. *J Physiol* 547: 951–961, 2003.

Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79: 1059-1063, 1996.

Kuriyama H, Suzuki H. Adrenergic transmissions in the guinea-pig mesenteric artery and their cholinergic modulations. *J Physiol* 317: 383-96, 1981.

Kuschel M, Zhou Y, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakatta EG, Xiao R. G_i protein-mediated functional compartmentalization of cardiac β_2 -adrenergic signaling. *J Biol Chem* 274: 22048–22052, 1999a.

Kuschel M, Zhou Y, Spurgeon HA, Bartel S, Karezewski PZS, Krause E, Lakatta EG, Xiao R. β_2 -adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. Circulation 99: 2458-2465, 1999b.

Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF. β_2 -adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76: 40-52, 1995.

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown Jr TG. Differentiation of receptor systems activted by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 596-598, 1967a.

Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptor responsive to isoproterenol. *Life Sci* 6: 2241-9, 1967b.

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

Langer SZ. Nomenclature and state of the art on α_1 -adrenoceptors. *Eur Urol* 33: 2-6, 1998.

Lefkowitz RJ, Caron MG, Michel T, Stadel JM. Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the β -adrenergic receptor and adenylate-cyclase. *Fed Proc* 41: 2664-2670, 1982.

Levy B. The adrenergic blocking activity of N- tert-butilmethoxamine (butoxamine). *J Pharmacol Exp Ther* 151: 413-22, 1966.

Limbird LE. GTP and Na⁺ modulate receptor-adenyl-cyclase coupling and receptormediated function. *Am J Physiol* 247: E59-68, 1984.

Lin HJ, Wolf PA, Hayes MK, Beiser AS, Kase CS, Benjamin EJ, D'Agostino RB. Stroke severity in atrial fibrillation - the Framingham study. *Stroke 27*: 1760-1764, 1996.

Li Y, Kranias E, Mignery G, Bers D. Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 90: 309–316, 2002.

Lonardo G, Cerbai E, Casini S, Giunti G, Bonacchi M, Battaglia F, Fiorani B, Stefano PL, Sani G, Mugelli A. Pharmacological modulation of the hyperpolarization-activated current (I_f) in human atrial myocytes: focus on G protein-coupled receptors. *J Mol Cell Cardiol* 38: 453-60, 2005.

Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and release by luminal Ca^{2+} -sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 81: 785-798, 2001.

Marbán E, Robinson SW, Wier WG. Mechanisms of arrhythmogenic delay and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J Clin Invest* 78: 1185-1192, 1986.

Marks AR. A guide for the perplexed: towards an understanding of the molecular basis of heart failure. *Circulation* 107: 1456–1459, 2003.

Marx OS, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayraman T, Burkhoff D, Rosemblit N. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from calcium release channels: defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-76, 2000.

McConville P, Spencer RG, Lakatta EG. Temporal dynamics of inotropic, chronotropic, and metabolic responses during β_1 - and β_2 -AR stimulation in the isolated, perfused rat heart. *Am J Physiol.* 289: E412–E418, 2005.

McCloskey DT, Rokosh DG, O'Connell TD, Keung CK, Simpson PC, Baker AJ. Alpha(1)– adrenoceptor subtypes mediate negative inotropy in myocardium from $\alpha_{(1A/C)}$ knockout and wild type mice. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1007–17, 2002.

Merillat JC, Lakatta EG, Hano O, Guarnieri T. Role of Ca²⁺ channel in the initiation and maintenance of ventricular fibrillation. *Circ Res* 67: 1115-1123, 1990.

Minamino T, Kitakase M, Asanuma H, Ueda Y, Koretsune Y, Kuzuya T, Hori M. Plasma adenosine levels and platelet activation in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 83: 194-198, 1999.

Minneman KP, Hegstrand LRK, Molinoff PB. Simultaneous determination of β_1 -and β_2 adrenoceptores in tissues containing both subtypes. *Mol Pharmacol* 16: 34-46, 1979.

Morimoto K, Kurahashi Y, Shintani-Ishida K, Kawamura N, Miyashita M, Uji M, Tan N, Yoshida K. Estrogen replacement suppresses stress-induced cardiovascular responses. Am J Physiol 287: H1950-H1956, 2004

Moura AL. Sensibilidade a Agonistas β -Adrenérgicos em Átrio Esquerdo Isolado de Ratos Submetidos a Estresse. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2002.

Mullins, LJ. Ion Transport in Heart. Raven Press, New York, 1981, 136 p.

Näbauer M, Callewart G, Cleemann L, Morad M. Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244: 800-803, 1989.

Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrilation. Very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol* 62: 51–77, 2000.

Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM. Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265: H257-66, 1993.

Olbrich A., et al. Different effects of the β -adrenoceptor antagonists celiprolol and metoprolol on vascular structure and function in long-term type I diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 193-203, 1999.

Oliveira PX. *Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato*. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2004.

Opie LH. *The Heart: Physiology, from Cell to Circulation*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publ., 1998. 637 p.

Pappano AJ, Volle RL. The reversal by atropine of ganglionic blockade produced by acetylcholine or methacholine. *Life Sci* 12: 677-82, 1962.

Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569: 7-39, 2005.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI $3K\gamma$ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell.* 118: 375–387, 2004.

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na⁺/ Ca²⁺ exchange expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* 85: 1009-1019, 1999.

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual β -adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88: 1159-67, 2001.

Price DT, Chari RS, Berkowitz DE, Meyers WC, Schwinn DA. Expression of α_1 -adrenergic receptor subtype mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells: implications for α_1 -adrenergic subtype classification. *Mol Pharmacol* 46: 221-226, 1994a.

Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D, Schwinn DA. Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human α -adrenergic physiology. *Mol Pharmacol* 45: 171-175, 1994b.

Priori SG, Corr PB. Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol* 258: H1796-805, 1990.

Ramey ER, Goldstein MS. The adrenal cortex and the sympathetic nervous system. *Physiol Rev.* 37: 155-95, 1957.

Roden DM. lonic mechanisms for prolongation of refractoriness and their proarrhythmic and antiarrhythmic correlates. *Am J Cardiol.* 78: 12-6, 1996.

Rousseau E, Meissner G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-relase channel: activation by caffeine. *Am J Physiol* 256: H328-333, 1989.

Rump LC, Bohmann C, Schaible U, Schollhorn J, Limberger N. α_{2C} -adrenoceptormodulated release of noradrenaline in human right atrium. *Br J Pharmacol* 116: 2617-24, 1995a.

Rump LC, Riera-Knorrenschild G, Schwertfeger E, Bohmann C, Spillner G, Schollmeyer P. Dopaminergic and α-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. J *Cardiovasc Pharmacol* 26: 462-70, 1995b.

Santos IN, Sumitame M, Caceres VM, Moreira MF, Krieger MH, Spadari-Bratfisch RC. Evidence for two atypical conformations of β -adrenoceptors and their interaction with Gi proteins. *Eur J Pharmacol* 513: 109-18, 2005.

Saucerman JJ, Brunton LL, Michailova AP, McCulloc AD. Modeling β -adrenergic control of cardiac myocyte contractility *in silico*. *J Biol Chem* 278: 47997–48003, 2003.

Saucerman JJ, McCulloc AD. Mechanistic systems models of cell signaling networks: a case study of myocyte adrenergic regulation. *Prog Biophys Mol Biol.* 85: 261–278, 2004.

Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release causes myocyte depolarization: underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res* 87: 774-80, 2000.

Scoote M, Williams AJ. The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. *Cardiovasc Res* 56: 359–372, 2002.

Scriven DRL, Dan P, Moore EDW. Distribution of proteins implicated in excitationcontraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79: 2682-91, 2000.

Seidl K, Hauer B, Schwick NG, Zellner D, Zahn R, Senges J. Risk of thromboembolic events in patients with atrial flutter. *Am J Cardiol* 82: 580-583, 1998.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Potentiation of fractional SR Ca release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys J* 78: 334-43, 2000.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship. *Circ Res* 91: 594-600, 2002.

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. Circ Res 93: 592-4, 2003.

Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol* 43: 483–490, 2004.

Silveira AC, Gilioli R, Oliveira ES, Bassani RA. Subsensitivity to β -adrenergic in atria from rats infested with *Syphacia* sp. *Lab Animals* 37: 63-67, 2003.

Sipido KR, Maes M, Van der Werf F. Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na⁺-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum: a comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode $Ca^{2+}-Ca^{2+}$ exchange. *Circ Res* 81: 1034- 1044, 1997.

Sjaastad I, Schiander I, Sjetnan A, Qvigstad E, Bokenes J, Sandnes D, Osnes J-B, Sejersted OM, Skomedal T. Increased contribution of α_{1-} vs. β -adrenoceptor-mediated

inotropic response in rats with congestive heart failure. *Acta Physiol Scand* 177: 449-458, 2003.

Skomedal T, Aass H, Geiran O, Osnes JB. Differential effects of cocaine on the positive inotropic effect of noradrenaline mediated by α 1- and β -adrenoceptors in failing human myocardium. *Eur J Pharmacol* 419: 223-30, 2001.

Skomedal T, Borthne K, Aass H, Geiran O, Osnes JB. Comparison between α_1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 721-9, 1997.

Skomedal T, Schiander IG, Osnes J-B. Both α - and β -adrenoceptor mediated components contribute to final inotropic response to norepinephrine in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 1204-1210, 1988.

Sosunov EA, Gainullin RZ, Moise NS, Steinberg SF, Danilo P, Rosen MR. β_1 and β_2 -adrenergic receptor subtype effects in German shepherd dogs with inherited lethal ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* 48: 211-9, 2000.

Steinberg SF. The molecular basis for distinct β -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 85: 1101-11, 1999.

Steinfath M, Chen YY, Lavicky J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H. Cardiac α_1 -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* 107: 185-188, 1992.

Stiles GL, Strasser RH, Kilpatrick BF, Taylor SR, Lefkowitz RJ. Endogenous proteinases modulate the function of the β -adrenergic receptor-adenylate cyclase system. *Biochim Biophys Acta* 802: 390-8, 1984.

Stjarne L. Pre- and post-junctional receptor-mediated cholinergic interactions with adrenergic transmission in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmaco*l 288: 305-310, 1975.

Sutko JL, Bers DM, Reeves JP. Postrest inotropy in rabbit ventricle: $Na^+ - Ca^{2+}$ exchange determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content. *Am J Physiol* 250: H654-H661, 1986.

Taguchi K, Yang M, Goepel M, Michel MC. Comparison of human α_1 -adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:100-110, 1998.

Tan YY, Summers RJ. β-Adrenoceptor regulation in rat heart, lung and skin after chronic treatment with (-)-tertatolol or (-)-propranolol. *J Auton Pharmacol* 15: 421-436, 1995.

Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac α_1 -adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* 45: 147-175, 1993.

Trafford AW, Diaz ME, Negretti N, Eisner DA. Enhanced Ca²⁺ current and decreased Ca²⁺ efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content after depletion. *Circ Res* 81: 477-84, 1997.

Van der Heyden MAG, Wijnhoven TJM, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res.* 65: 28-39, 2005.

Vanderlei LC, Marcondes FK, Lanza LL, Spadari-Bratfisch RC. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot-shock stress. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 670-678, 1996.

Weber CR, Piacentino III V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na⁺-Ca²⁺ exchange current and submembrane Ca²⁺ during the cardiac action potential. *Circ Res* 90: 182-9, 2002.

Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* 67: 69-98, 2005.

Whalen EJ, Lewis SJ. In vivo evidence that isoproterenol may increase heart rate in the rat by mechanisms in addition to activation of cardiac β_1 - or β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 382: 207-210, 1999.

Whitehurst VE, Vick JA, Alleva FR, Zhang J, Joseph X, Balazs T. Reversal of propranolol blockade of adrenergic receptors and related toxicity with drugs that increase cyclic AMP. *Proc Soc Exp Biol Med* 221: 382-385, 1999.

Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Jeffries WB, Scofield MA. Distribution of α_1 -adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 117-22, 1998.

Xiao R. Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G(s) and G(i) proteins. *Circ Res* 87: 635-7, 2000.

Xiao R, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG. Coupling of β_2 -adrenoceptor to G_i proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 43–52, 1999a.

Xiao R, Cheng H, Zhou Y, Kuschel M, Lakatta EG. Recent advances in cardiac ßadrenergic receptor subtype signal transduction. *Circ Res* 85: 1092–1100, 1999b.

Xiao R, Hohl C, Altschuld R, Jones L, Livingston B, Ziman B, Tantini B, Lakatta EG. β_2 - adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca²⁺ dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 19151-6, 1994.

Xiao R, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxinsensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47: 322–329, 1995.

Xiao R, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H. Subtype-specific badrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 25: 358-65, 2004. Yang XX, et al. The β_2 -agonist salbutamol inhibits bronchoconstriction and leukotriene D4 synthesis after dry gas hyperpnea in the guinea-pig. *Pulm Pharmacol* 12: 325-329, 1999.

Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493: 733-46, 1996.

Yusuf S, Al-Daady N, Camm AJ. 5-Hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol* 14: 209-214, 2003.

Zhou YY, Cheg H, Bogdanov KY, Hohl C, Altschuld R, Lakatta EG, Xiao R. Localized cAMP-dependet signaling mediates β_2 -adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am Physiol* 273: H1611-H1618, 1997.

Zhou Z, Lipsius SL. Na⁺-Ca²⁺ exchange current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Physiol* 466: 263-85, 1993.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T, Yazaki T. Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 274: 9760-9770, 1999.

Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM. I_{Na-Ca} and $I_{Cl(Ca)}$ contribute to isoproterenol-induced delayed afterdepolarizations in midmyocardial cells. *Am J Physiol* 275: H1979–H1992, 1998.