

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LARISSA BARRETTA PENNA

**RESPOSTA INOTRÓPICA A CATECOLAMINAS EM  
MIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS  
SUBMETIDOS A CHOQUE NAS PATAS**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Larissa Barretta Penna  
[Assinatura]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de Mestre  
em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de  
Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosana Almada Bassani

Campinas  
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>P381r</b>	<p>Penna, Larissa Barretta Resposta inotrópica a catecolaminas em miócitos ventriculares isolados de ratos submetidos a choque nas patas / Larissa Barretta Penna. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Rosana Almada Bassani. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Arritmia. 2. Stress (Fisiologia). 3. Catecolaminas. 4. Atividade inotrópica. I. Bassani, Rosana Almada. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Inotropic responsiveness to catecholamines in ventricular myocytes isolated from footshock-stressed rats.

**Palavras-chave em inglês:** Arrhythmia; Stress (Physiology); Catecholamines; Inotropic activity.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Rosana Almada Bassani, Iraídes Nunes dos Santos, Regina Célia Spadari-Bratfisch.

**Data da defesa:** 31/08/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 31 de agosto de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

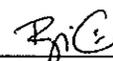
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Almada Bassani (Orientadora)



---

Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Celia Spadari-Bratfisch



---

Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraídes Nunes dos Santos



---

Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dora Maria Grassi-Kassisse

---

Assinatura

Prof. Dr. Wilson Nadruz Jr

---

Assinatura

Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.

Johann Goethe

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Regina Coeli Barretta Penna e Antonio da Cunha Penna, por compreenderem quanto vale um ideal.

Ao meu irmão Érico Barretta Penna por ser tão especial e prestativo.

Especialmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Almada Bassani por disponibilizar conhecimento com incansável paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, especialmente a Sérgio Moura, Eugênio Carrara, Mauro Martinazzo e Adriana Andrade.

À bióloga Elizângela Souto de Oliveira pela amizade, paciência e primoroso apoio técnico.

À secretária da Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Andréia Vigilato, pelo excelente trabalho.

Aos amigos de laboratório pelo convívio e troca de experiências: Diogo Soriano, Nivaldo Zafalon Jr, Rafael A. Ricardo, Abinoam Marques, Alexandra Fonseca, em especial a Denile Boer por me ajudar na prática com células, e a Pedro Xavier de Oliveira por desenvolver uma ferramenta que facilitou muito a análise dos dados.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	12
3.1 – Animais	12
3.2 – Indução de Estresse por Choque nas Patas	12
3.3 – Isolamento de Miócitos Cardíacos Ventriculares	13
3.4 – Medição do Encurtamento Celular	13
3.5 – Determinação de Curvas Concentração-Efeito (CCE)	15
3.6 – Determinação do Valor $pA_2$ do Metoprolol (MET)	17
3.7 – Agonistas e Antagonistas	19
3.8 – Soluções	20
3.9 – Análise Estatística	21
<b>4. RESULTADOS</b>	22
4.1 – Resposta Inotrópica a Catecolaminas em Miócitos Ventriculares de Rato: Efeito do Estresse	22
4.2 – Resposta Arritmica a Catecolaminas em Miócitos Ventriculares de Rato: Efeito do Estresse	33
<b>5. DISCUSSÃO</b>	43
<b>6. CONCLUSÕES</b>	52
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\Delta L$  - encurtamento de pico

[A] - concentração molar de agonista

Adr - adrenalina

AMPC - monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina

ATP - trifosfato de adenosina

[B] - concentração molar do antagonista

BUT - butoxamina

$[Ca^{2+}]_i$  - concentração intracelular de  $Ca^{2+}$

CCD - *charge coupled device*

CCE - curva concentração-efeito

CE - contrações espontâneas

CR - comprimento celular de repouso

DAG - Diacilglicerol

DBV - detector de borda de sinal de vídeo

DR - razão das concentrações equiefetivas ( $[A'] / [A]$ )

EC<sub>50</sub> - concentração molar do agonista que evoca uma resposta de amplitude de 50% da resposta máxima

EP - erro-padrão da média

GTP - trifosfato de guanosina

HEPES - ácido hidroxietil-piperazina-N"-2-etano-sulfônico

IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina

$I_{Ca}$  - corrente de  $Ca^{2+}$  através de canais voltagem-dependentes

IC95% - intervalo de confiança para 95%

$I_{K1}$  - corrente de  $K^+$  através de canais retificadores de entrada

IP3 - 1,4,5-inositoltrifosfato

ISO - isoproterenol

$K_A$  - constante aparente de dissociação do agonista no receptor

$K_B$  - constante aparente de dissociação do antagonista no receptor

LED - *light emitting 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

N - número de experimentos

n - coeficiente de Hill

NA - noradrenalina

NCX - trocador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$

NT – solução de Tyrode normal

PA - potencial de ação

$\text{pA}_2$  - logaritmo negativo da concentração molar de um antagonista que requer o dobro da concentração do agonista para a produção de um dado nível de resposta

$\text{pD}_2$  - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da resposta máxima

PHE - fenilefrina

PKA – quinase de proteínas dependente de AMPc

PKC - quinase de proteínas dependente de  $\text{Ca}^{2+}$

PLC – fosfolipase C

PRZ - prazosin

PTX - toxina pertússica

$\text{RA}\alpha$  - receptores  $\alpha$ -adrenérgicos

RA $\beta$  - receptores  $\beta$ -adrenérgicos

Rmax - diferença entre Max e Min

RS - retículo sarcoplasmático

[R<sub>t</sub>] - concentração de receptores

VCR - aparelho gravador de vídeo cassete

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 4.1** – Efeito inotrópico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de adrenoceptores  $\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.1 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax.....23

**Tabela 4.2** – Efeito inotrópico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de adrenoceptores  $\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.1 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica;  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax; e n: coeficiente de Hill.....24

**Tabela 4.3** – Efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de adrenoceptores  $\beta_1$ , metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....26

**Tabela 4.4** – Efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,3  $\mu\text{M}$  do antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$ , butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....28

**Tabela 4.5** – Valores de  $\text{pA}_2$  do metoprolol (MET) e coeficiente angular da reta de Schild, obtidas, utilizando isoproterenol (ISO) como agonista, em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....30

**Tabela 4.6** – Efeito inotrópico ao 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....31

<b>Tabela 4.7</b> – Efeito inotrópico ao cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	32
<b>Tabela 4.8</b> – Efeito arritmogênico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de 0,1 $\mu\text{M}$ do antagonista de adrenoceptores $\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	34
<b>Tabela 4.9</b> – Efeito arritmogênico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,1 $\mu\text{M}$ do antagonista de adrenoceptores $\beta_1$ , metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	37
<b>Tabela 4.10</b> – Efeito arritmogênico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,3 $\mu\text{M}$ do antagonista de adrenoceptores $\beta_2$ , butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	39
<b>Tabela 4.11</b> – Efeito arritmogênico do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	40
<b>Tabela 4.12</b> – Efeito arritmogênico do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....	41

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.1** – Mecanismos celulares envolvidos no acoplamento excitação-contração em miócito cardíaco de mamífero.....5
- Figura 3.1** – Esquema do *set-up* experimental.....15
- Figura 4.1** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico da noradrenalina (NA), na ausência (A) e presença (B) do antagonista prazosin (PRZ, 0,1  $\mu$ M) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....24
- Figura 4.2** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista metoprolol (MET, 0,1  $\mu$ M) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....26
- Figura 4.3** – Valores médios da resposta máxima ( $R_{max}$ ) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....27
- Figura 4.4** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista butoxamina (BUT, 0,3  $\mu$ M) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....28
- Figura 4.5** – Valores médios da resposta máxima ( $R_{max}$ ) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....29
- Figura 4.6** – Gráfico de Schild para o antagonismo exercido pelo metoprolol (MET) sobre o efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) em miócitos ventriculares de ratos controles e submetidos a choque nas patas.....30

- Figura 4.7** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópica do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....31
- Figura 4.8** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....33
- Figura 4.9** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica da noradrenalina (NA), na ausência (A) e presença (B) do antagonista prazosin (PRZ, 0,1  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....35
- Figura 4.10** – Valores médios da resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ ) a noradrenalina (NA), na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  de prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....35
- Figura 4.11** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista metoprolol (MET, 0,1  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....37
- Figura 4.12** – Valores médios da resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ ) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  de metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....38
- Figura 4.13** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista butoxamina (BUT, 0,3  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....39
- Figura 4.14** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....40

**Figura 4.15** - Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas.....42

## RESUMO

Tem sido descrita supersensibilidade ao efeito cronotrópico do isoproterenol (ISO) em átrios direitos de ratos submetidos a choque nas patas, mas há pouca informação com relação à resposta inotrópica, principalmente ventricular. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos inotrópico e pró-arrítmico de catecolaminas em miócitos ventriculares esquerdos de ratos nesta condição de estresse, em comparação a animais controles. Ratos Wistar machos adultos foram submetidos a sessões diárias de choque nas patas (30 min de duração) por 3 dias. Foram medidos o encurtamento celular de pico e a frequência de contrações espontâneas das células. Obteve-se curvas concentração-efeito para noradrenalina (NA), ISO, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e  $\text{CaCl}_2$ , com a determinação dos parâmetros  $R_{\text{max}}$  (resposta máxima) e  $\text{pD}_2$  (-log da concentração do agonista que produz uma resposta = 0,5  $R_{\text{max}}$ ). A população de receptores adrenérgicos (RA)  $\beta$  foi analisada pelo método de Schild. Observamos, em células de animais do grupo choque, redução da  $R_{\text{max}}$  inotrópica à NA e ao ISO. Estas diferenças permaneceram durante bloqueio de  $\text{RA}\alpha_1$ , mas foram abolidas pelo bloqueio de  $\text{RA}\beta_1$  (aumento da  $R_{\text{max}}$  ao ISO apenas no grupo choque) ou  $\beta_2$  (redução da  $R_{\text{max}}$  no apenas no grupo controle). O valor  $\text{pA}_2$  do metoprolol e a resposta inotrópica a IBMX e  $\text{CaCl}_2$  foram equivalentes entre os grupos. As células de ratos do grupo choque se mostraram mais reativas à ação pró-arrítmica da NA e do ISO, mas não aos demais agonistas. Todos os procedimentos que aboliram a redução de  $R_{\text{max}}$  inotrópica a catecolaminas em miócitos de animais estressados também atenuaram as diferenças na resposta arrítmica a estes agonistas, o que pode indicar que a resposta inotrópica anormal no grupo choque seja consequência da maior atividade espontânea induzida pelas catecolaminas. Em conclusão, os resultados indicam que o estresse por choque nas patas causa aumento da reatividade de miócitos ventriculares de rato ao efeito pró-arrítmico de catecolaminas e reduz a eficácia aparente destes agonistas em estimular o inotropismo.

## ABSTRACT

Supersensitivity to isoproterenol (ISO) chronotropic effect has been described in right atria from footshock-stressed rats, but information on inotropic responsiveness, particularly of the ventricles, is scarce. The goal of this study was to analyze the inotropic and pro-arrhythmic effect of catecholamines on left ventricular myocytes from footshock-stressed rats, in comparison with cells from control animals. Adult male Wistar rats were submitted to 30-min long daily footshock sessions for 3 days. Peak cell shortening and the rate of spontaneous contractions during rest were measured in myocytes at 23 °C. Concentration-effect curves were obtained for noradrenaline (NA), ISO, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) e  $\text{CaCl}_2$ , for estimation of the following parameters  $R_{\text{max}}$  (maximum response) and  $\text{pD}_2$  (-log of the agonist molar concentration that evokes half-maximum response). The  $\beta$  adrenoceptor (AR) population was analyzed by the Schild's method. In the footshock group,  $R_{\text{max}}$  values to NA and ISO were decreased. This difference was unaffected by  $\alpha_1\text{AR}$  blockade, but was abolished by blockade of  $\beta_1\text{AR}$  (which increased  $R_{\text{max}}$  to ISO in the footshock group only) or  $\beta_2\text{-AR}$  (which decreased  $R_{\text{max}}$  to ISO solely in the control group). Metoprolol  $\text{pA}_2$  value and the inotropic responsiveness to IBMX and  $\text{CaCl}_2$  were similar in both groups. Cells from footshock-stressed rats were more responsive to NA and ISO pro-arrhythmic action. All procedures that abolished the difference in inotropic response between footshock and control groups also diminished the differences in arrhythmic responses. These results indicate that the inotropic hyporesponsiveness to catecholamines in the footshock group may be the result of increased spontaneous activity induced by these agonists. We conclude that footshock stress enhances catecholamine pro-arrhythmic effect in rat ventricular myocytes, while simultaneously decreases the inotropic apparent efficacy of these agonists.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a exposição a um agente estressor que represente ameaça imediata ou remota à integridade do organismo, é evocada, em maior ou menor grau, uma resposta mais ou menos padronizada, conhecida como reação de estresse. Esta resposta é essencial para a sobrevivência do indivíduo à condição ameaçadora e tem um forte componente neuro-hormonal, caracterizado pela ativação generalizada da eferência simpática (com aumento da liberação de mediadores simpáticos pelas terminações nervosas periféricas e pela medula adrenal) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (com aumento da secreção de glicocorticóides pela córtex adrenal). Esse primeiro estágio, denominado reação de alarme, configura a resposta inicial do organismo frente à ameaça e provê suporte metabólico para a resposta de luta-ou-fuga, descrita por Cannon (1939). Com a manutenção do estímulo, a fase de alarme inicial é sucedida pela fase de resistência, caracterizada pela ativação de ajustes adaptativos. A fase de adaptação pode ser seguida por uma fase de exaustão, caso estes ajustes sejam insuficientes, na qual o organismo fica susceptível ao desenvolvimento de doenças, que podem incluir distúrbios renais, cardiovasculares, gastro-intestinais, imunológicos e outros (SELYE, 1956; RAMEY & GOLDSTEIN, 1957; SAPOLSKY *et al.*, 2000). Inicialmente a síndrome geral de adaptação foi descrita como uma reação geral e inespecífica (SELYE, 1936), caracterizada pela tríade patológica - hipertrofia da glândula adrenal, ulceração gastrointestinal e involução do timo - desencadeada pela exposição a qualquer fator aversivo ao organismo, externo ou interno, que ativaria o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Contudo, com a evolução dos estudos sobre estresse, foi evidenciado o caráter específico e a influência das características como o sexo (PARÉ & REDEI, 1993), a idade (RIEGLE, 1973), e, principalmente, da percepção do agente como um agressor, o que

depende de experiências prévias e da previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH, 1988).

Cannon criou o termo homeostasia para descrever os processos fisiológicos que atuam na manutenção do equilíbrio funcional do organismo (CANNON, 1939). Diferentes sistemas homeostáticos podem regular a atividade de um mesmo sistema efetor, e a regulação, em geral, envolve alças de retroalimentação negativa, ou seja, aumento nos valores de uma variável resulta em mudanças na atividade efetora que se opõe a ela (GOLDSTEIN, 2003). Aos níveis de atividade requeridos para a obtenção da estabilidade através da mudança dá-se o nome de alostasia (STERLING & EYER, 1988), enquanto que o efeito da ativação prolongada, contínua ou intermitente, dos efetores envolvidos na alostasia caracteriza a carga alostática (McEWEN, 1998).

A função do sistema cardiovascular é marcadamente afetada pela condição de estresse. Em particular, a ativação simpática desempenha um importante papel na manifestação de respostas cardiovasculares: as catecolaminas liberadas pela medula adrenal e pelas terminações simpáticas agem no coração e nos vasos aumentando a frequência e a força de contração cardíaca, além de causar vasoconstrição na maior parte dos leitos arteriais e venosos. O coração recebe inervação autonômica dupla: pela eferência simpática, cujos mediadores químicos, noradrenalina (NA) e adrenalina (Adr) têm efeito eminentemente cardioestimulatório, e pela eferência parassimpática, cujo neurotransmissor acetilcolina atua principalmente reduzindo a frequência cardíaca espontânea (GUYTON, 1996).

As catecolaminas liberadas atuam interagindo com sítios específicos de ligação existentes na membrana das células dos tecidos-alvos, os receptores adrenérgicos (RA). A classificação original dos RA nos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  foi baseada na potência da NA, Adr e outras aminas adrenérgicas em diversos tecidos periféricos. A série característica de potência em receptores  $\alpha$  ( $RA_{\alpha}$ ) foi determinada como Adr > NA >> isoproterenol (ISO),

enquanto que, para receptores  $\beta$  ( $RA\beta$ ), a série foi ISO > Adr > NA (AHLQUIST, 1948). As duas grandes classes foram posteriormente subdivididas em subtipos de  $RA\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (LANGER, 1974) e  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (LANDS *et al.* 1967a,1967b), de acordo com suas disposições anatômicas e características funcionais. Foram classificados como  $\beta_1$  os receptores que medeiam efeitos relacionados a força e frequência cardíacas, e como  $\beta_2$  os que medeiam o relaxamento da musculatura lisa de brônquios e vasos. Com o avanço do conhecimento, a classificação baseada na distribuição anatômica dos tecidos-alvos foi considerada simplista, visto que a maioria dos órgãos possuía ambos os tipos de RA. Finalmente, avanços da biologia molecular e clonagem possibilitaram a identificação, em mamíferos, de mais um subtipo de  $RA\beta$  ( $\beta_3$ ) e a subdivisão dos subtipos  $\alpha_1$  em  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ , e  $\alpha_2$  em  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  (BRODDE & MICHEL, 1999).

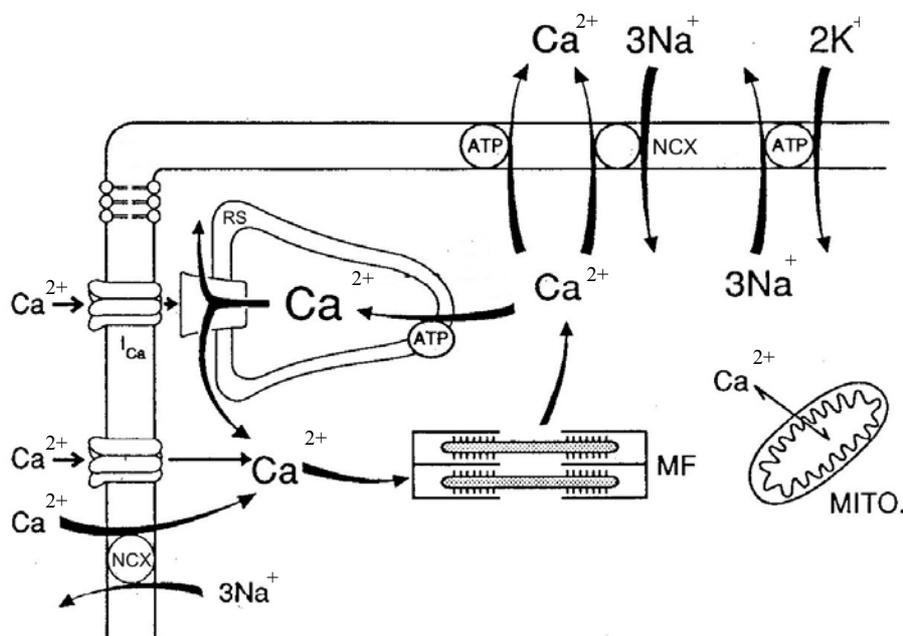
No coração de humanos, a razão de RA  $\beta_1/\beta_2$  é cerca de 70%:30% em átrios e 80%:20% em ventrículos (BRODDE, 1991). Ventrículos direitos e esquerdos de humanos possuem receptores do tipo  $\alpha_1$  numa densidade cerca de 1/8 daquela de  $RA\beta$  (BRODDE & MICHEL, 1999). A ativação de receptores adrenérgicos de células miocárdicas têm efeito inotrópico positivo. Especialmente no caso de  $RA\beta$ , esta estimulação da atividade contrátil envolve aumento da mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular.

O acoplamento excitação-contração consiste num conjunto de mecanismos que acoplam a ativação elétrica da membrana durante o potencial de ação (PA) e o fenômeno mecânico de contração celular. Durante o PA,  $Ca^{2+}$  entra na célula através de canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes, predominantemente do tipo L, presentes em sua membrana. O influxo de  $Ca^{2+}$  através destes canais pode contribuir para o aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) e a ativação dos miofilamentos. No entanto, é o retículo sarcoplasmático (RS) que contém o principal estoque de  $Ca^{2+}$  ativador da contração (BERS, 2001). Esta organela possui canais de  $Ca^{2+}$  (também chamados de receptores de

rianodina) que liberam grande quantidade de íon quando ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula durante o PA. Este mecanismo é denominado de "liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ " (FABIATO, 1983). Com isto,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eleva-se rapidamente cerca de 3-10 vezes, favorecendo a interação do íon com a troponina C. Esta interação resulta na modificação da configuração do complexo troponina-tropomiosina de modo a expor os sítios de ligação da miosina no filamento de actina, o que permite a formação do complexo actomiosina e culmina na formação de pontes-cruzadas, disparando o processo de contração. Para que ocorra o relaxamento, a maior parte do íon é recaptada para o RS por meio de uma ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  e o restante é predominantemente transportado para fora da célula pelo mecanismo de troca  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  (NCX). Uma pequena quantidade do íon (<5%) é extruída pela ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema e captada pelas mitocôndrias (BASSANI *et al.*, 1992; BASSANI *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2006). A Figura 1.1 ilustra as principais estruturas celulares envolvidas no acoplamento excitação-contração.

Os  $\text{RA}_{\alpha_1}$  estão acoplados a uma proteína ligante de GTP. Sua estimulação, via ação da subunidade  $\alpha_q$  da proteína G, leva a ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositoltrifosfato (IP3). Este, por sua vez, evoca a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endo/sarcoplasmático por sua ligação a sítios receptores de IP3 presentes em canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  da organela. O DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC), cujos substratos incluem o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L do sarcolema, canal de  $\text{K}^+$ , troponina I e trocador  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ . A estimulação deste trocador promove a extrusão do íon  $\text{H}^+$  e leva à alcalinização intracelular, que resulta num aumento da afinidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ . É possível que também ocorra aumento do influxo total de  $\text{Ca}^{2+}$  devido a

prolongamento do PA pela inibição da corrente de  $K^+$  responsável pela fase de repolarização inicial do PA (ENDO *et al.*, 1991; TERZIC *et al.*, 1993).



**Figura 1.1** – Mecanismos celulares envolvidos no acoplamento excitação-contracção em miócito cardíaco de mamífero. O influxo de  $Ca^{2+}$  via canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes ( $I_{Ca}$ ) induz a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS). O  $Ca^{2+}$  proveniente desta organela se difunde para os miofilamentos (MF) e dispara a contracção.  $[Ca^{2+}]_i$  é reduzida principalmente pela ATPase de  $Ca^{2+}$  do RS e pela troca  $Na^+ - Ca^{2+}$  do sarcolema (NCX), permitindo o relaxamento celular. Outros mecanismos (*i.e.*, uniporter mitocondrial, ATPase de  $Ca^{2+}$  do sarcolema) também contribuem, mas de modo pouco significativo, para a redução de  $[Ca^{2+}]_i$ . A ATPase de  $Na^+ - K^+$  contribui indiretamente para o transporte de  $Ca^{2+}$ , mantendo o gradiente eletroquímico transmembrana dos íons  $Na^+$ , do qual dependem a direcção e força eletromotriz para o transporte de  $Ca^{2+}$  pela NCX (Modificado de BERS, 2001).

Os  $RA\beta$  também se acoplam a uma proteína ligante de GTP que se liga ao nucleotídeo quando o receptor é ocupado por um agonista. Isto causa a dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta\text{-}\gamma$  da proteína G, e a interacção da primeira com a enzima adenilato-ciclase, também localizada na membrana, que catalisa a hidrólise de ATP em 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (LEFKOWITZ & CARON, 1987). A subunidade  $\alpha$  da proteína G acoplada aos  $RA\beta$  é do tipo  $G_s$ , que apresenta actividade estimulatória

sobre adenilato-ciclase (ONARAN *et al.*, 1993). No entanto, receptores do subtipo  $\beta_2$  parecem se acoplar também a outro tipo de proteína G, cuja subunidade  $\alpha$  ( $G_{\alpha i}$ ) promove a inibição da adenilato-ciclase (XIAO *et al.*, 1995; XIAO *et al.*, 1994). No caso mais geral a ocupação do  $RA\beta$  (especialmente  $RA\beta_1$ ) resulta em aumento da síntese de AMPc, que atua como segundo mensageiro (citossólico) desta via de sinalização química. O AMPc, por sua vez, liga-se à subunidade regulatória da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), removendo assim a inibição desta subunidade sobre a subunidade catalítica, o que leva à ativação da enzima.

A PKA fosforila diversos substratos celulares que atuam como efetores finais da via em miócitos cardíacos, tais como:

- a) canais iônicos do sarcolema: na maior parte dos casos, ocorre aumento da probabilidade de abertura de canais de  $K^+$ , de  $Cl^-$  e de  $Ca^{2+}$  do tipo L (BERS, 2001);
- b) troponina I, o que diminui a afinidade da troponina C ao  $Ca^{2+}$  e contribui para acelerar o relaxamento (BERS, 2001);
- c) canais de  $Ca^{2+}$  do RS, favorecendo a liberação de  $Ca^{2+}$  para o citosol (WEHRENS *et al.*, 2005);
- d) inibidor endógeno I das fosfatases, reduzindo a desfosforilação de substratos fosforilados por quinases como a PKA (CARR *et al.*, 2002);
- e) fosfolamban, um inibidor endógeno da ATPase de  $Ca^{2+}$  do RS, cuja fosforilação causa redução da inibição da enzima (LI *et al.*, 2000)
- f) fosfolemman, subunidade regulatória da ATPase de  $Na^+-K^+$ , que, quando fosforilado, tem menor influência inibitória sobre a atividade da bomba (BOSSUYT *et al.*, 2005).

Como resultado final da ativação de  $RA\beta$ , pode ser observado modificação da configuração do PA (TSIEN, 1977; TSIEN *et al.*, 1986), aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  (TSIEN *et al.*, 1986; MCDONALD *et al.*, 1994), diminuição da afinidade dos miofilamentos por  $Ca^{2+}$  (MCCLELLAN & WINEGRAD, 1978) e aumento da ciclagem de  $Ca^{2+}$  entre o RS

e citosol (ZHOU *et al.*, 1999). Todos estes fatores contribuem para aumento da amplitude e aceleração do relaxamento das contrações desenvolvidas pelas células. No entanto, o aumento da carga celular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode também favorecer a ocorrência de atividade espontânea e facilitar o aparecimento de arritmias.

Tem sido reconhecido que, não apenas durante a sístole, mas também durante a diástole, o RS libera  $\text{Ca}^{2+}$  (BASSANI & BERS, 1995). Uma vez que a probabilidade de abertura dos canais do RS depende tanto da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , quanto da carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, um aumento do conteúdo  $\text{Ca}^{2+}$  na organela resulta em maior liberação do íon tanto na sístole (BASSANI *et al.*, 1995; SHANNON *et al.*, 2000), quanto na diástole (BASSANI *et al.*, 1997; SHANNON *et al.*, 2002). Enquanto a maior liberação durante a sístole contribui fortemente para o efeito inotrópico positivo das catecolaminas, o mesmo evento durante a diástole facilita o aparecimento de contrações espontâneas. Tem sido demonstrado que a geração de automatismo envolve a NCX. Esta troca é eletrogênica, pois medeia o contra-transporte de 3 íons  $\text{Na}^+$  e 1 íon  $\text{Ca}^{2+}$ . A saída de  $\text{Ca}^{2+}$  gera uma corrente de entrada que pode levar a membrana a seu limiar de excitação, o que resultaria no disparo de um PA espontâneo (SCHLOTTHAUER & BERS, 2000). Há forte evidência do envolvimento do RS e da NCX na geração de atividade espontânea em células marca-passo primárias, subsidiárias e células miocárdicas com sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (BASSANI *et al.*, 1997; BOGDANOV *et al.*, 2001).

Doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos durante o último século nos países desenvolvidos, e as previsões são de que a ocorrência de eventos ligados a estas afecções tenda a se elevar no futuro, não só em função do aumento da idade média da população, mas também do aumento da incidência de doenças que acarretam complicações cardiovasculares (*i.e.*, obesidade mórbida e diabetes tipo 2) e de fatores de risco, principalmente ligados ao estilo de vida. De acordo com a *American Heart Association* (2007), um em cada três americanos adultos possui um ou mais tipos de

doença cardiovascular, e esta categoria de doença foi responsável por cerca de 58% das mortes registradas em 2002. Dentre as afecções cardiovasculares, as arritmias cardíacas perfazem 4% da mortalidade total e atingiram cerca de 20% da mortalidade registrada total em 2000. Particularmente, as taquiarritmias ventriculares, embora isoladamente sejam consideradas causa de poucas mortes, são responsáveis *per se* por cerca de metade dos casos de morte súbita associados a doenças coronárias. As doenças cardíacas desempenham um papel importante como fator predisponente na vulnerabilidade do órgão ao surgimento de arritmias. Também pode contribuir para arritmias a ocorrência de alterações marcantes do tônus autonômico cardíaco, como por exemplo, durante a condição de estresse (SGOIFO *et al.*, 1999).

Tem sido demonstrado que a indução de estresse em ratos pode afetar fortemente a resposta do tecido cardíaco às catecolaminas. Dependendo da natureza do agente estressor, podem ocorrer diferentes alterações de resposta a diferentes agonistas de RA $\beta$ . Em tecido atrial foi descrita subsensibilidade à NA em resposta a frio, natação forçada, choque nas patas, parasitismo e imobilização, acompanhada ou não por subsensibilidade (SPADARI & DE MORAES, 1987; CAPAZ & DE MORAES, 1988; SILVEIRA *et al.*, 2003) ou supersensibilidade ao ISO (CALLIA & DE MORAES, 1984; SPADARI *et al.*, 1988; BASSANI & DE MORAES, 1988; NOURANI *et al.*, 1992; BASSANI & BASSANI, 1993; SANTOS, 2002; MOURA, 2002). Foram observadas ainda alterações aparentes da afinidade (frio: CALLIA & DE MORAES, 1984; natação: SPADARI & DE MORAES, 1988) e número de RA $\beta_1$  (choque nas patas: BASSANI & DE MORAES, 1987; BASSANI & BASSANI, 1993) em átrios de animais expostos a condições causadoras de estresse. Também foi observado aumento da resposta cronotrópica do tecido à ativação de receptores do subtipo  $\beta_2$  (frio: CALLIA & DE MORAES, 1984; choque nas patas: BASSANI & DE MORAES, 1988; BASSANI & BASSANI, 1993; SPADARI-BRATFISCH *et al.*, 1999; SANTOS, 2002), os quais, em condições controles, apresentam uma

contribuição modesta para o cronotropismo e o inotropismo atrial (CALLIA & DE MORAES, 1984; JUBERG *et al.*, 1985; BASSANI & DE MORAES, 1988; BASSANI & BASSANI, 1993).

Em todos os estudos acima mencionados, foram analisados efeitos do estresse sobre a resposta a catecolaminas em tecido atrial. Na maioria dos estudos, foi investigada a resposta cronotrópica a catecolaminas, e em poucos casos (MOURA, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2003) a resposta inotrópica. Portanto, ainda há pouca informação quanto aos efeitos de estresse sobre a modulação da contratilidade miocárdica por catecolaminas. Além disso, os estudos que analisam os efeitos do estresse sobre a resposta a agonistas adrenérgicos em miocárdio ventricular são poucos e muito recentes. Carvalho *et al.* (2006) observaram supersensibilidade aos efeitos estimulatórios do ISO sobre a mobilização de  $Ca^{2+}$  e inotropismo em miócitos ventriculares isolados de rato durante a fase de adaptação à sobrecarga de pressão arterial. No entanto, este tipo de situação estressora desencadeia uma resposta neuroendócrina peculiar, e o aumento do tônus adrenérgico ocorre tardiamente (AKERS *et al.*, 2000). Embora a contração atrial participe do processo de enchimento ventricular, a função bombadora do coração depende fundamentalmente do inotropismo ventricular. Assim, possíveis alterações de resposta do tecido ventricular às catecolaminas podem ter um impacto significativo na função circulatória e na pressão arterial. Não podemos extrapolar diretamente os resultados obtidos em miocárdio atrial para o ventricular, pois átrios e ventrículos diferem consideravelmente quanto à densidade de inervação simpática e parassimpática (LONGHURST, 1984), o que pode ocasionar diferenças quanto à exposição destes tecidos a mediadores autonômicos durante o estresse. Por exemplo, em ratos submetidos à imobilização repetida, foi descrita subsensibilidade ao efeito inotrópico do ISO em tecido atrial esquerdo, mas não foi observada alteração desta resposta em miocárdio ventricular (BASSANI *et al.*, 2006).

O presente estudo analisa a resposta a catecolaminas em miócitos isolados de ventrículo esquerdo de ratos submetidos a choque nas patas repetido, condição na qual as respostas do tecido atrial já foram amplamente analisadas (BASSANI & DE MORAES, 1987; SPADARI *et al.*, 1988; BASSANI & DE MORAES, 1988; NOURANI *et al.*, 1992; BASSANI & BASSANI, 1993; SPADARI-BRATFISCH *et al.*, 1999; SANTOS, 2002; MOURA, 2002). O uso de miócitos isolados é particularmente adequado para eliminar interferências presentes em preparações multicelulares, causadas por alterações de liberação e metabolismo de catecolaminas pelas terminações simpáticas (que já foram descritas em tecido atrial de ratos submetidos a este procedimento experimental, BASSANI & DE MORAES, 1987), pois se tratam de preparações totalmente privadas de inervação. Resultados prévios indicam que a sensibilidade a catecolaminas em preparações celulares controles é bastante semelhante àquela observada em tecido atrial (BOER, 2006; BASSANI *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Estudar a resposta inotrópica a catecolaminas em miócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos submetidos a sessões de choque nas patas por 3 dias, em comparação à resposta em células de ratos não manipulados (controles).
- Analisar o efeito pró-arritmico das catecolaminas (i.e., ocorrência de contrações espontâneas) em miócitos ventriculares de ratos controles e expostos a choque nas patas.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas (CEB/UNICAMP).

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade entre 3 e 4 meses, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos no Biotério do CEB/UNICAMP em gaiolas plásticas coletivas sob ciclo de iluminação de 12h claro:12h escuro, em ambiente climatizado (20-22°C), com acesso a ração peletizada e água potável *ad libitum*. Os animais expostos ao choque eram alojados em gaiolas separadas. Foram utilizados como grupo controle animais não manipulados, exceto para os procedimentos de rotina de limpeza e alimentação.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolos nº. 1184-1, 779-1 e 951-1).

#### 3.2 Indução de Estresse por Choque nas patas

Os ratos eram expostos aos choques em uma gaiola de acrílico (26 cm x 21 cm x 26 cm), cujo piso é formado de barras cilíndricas de aço inoxidável com 0,3 cm de diâmetro, espaçadas 1 cm entre si. Os estímulos elétricos gerados por uma fonte de corrente eram transmitidos às barras após embaralhamento da polaridade das barras por um circuito *scrambler*. A duração e intervalos entre choques eram controlados por um circuito temporizador. Toda a instrumentação utilizada foi desenvolvida no Centro de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas (CEB). Os choques, com

intensidade de 1 mA e duração de 1 s, foram aplicados a intervalos pseudo-aleatórios (média de 15 s), variando entre 5 e 25 s (BASSANI & DE MORAES, 1988). Ao final da sessão, o rato retornava à gaiola e após a última sessão de choque era sacrificado. Os ratos foram submetidos a sessões diárias de 30 min (aplicação de 120 choques por sessão) por 3 dias consecutivos, no período da manhã (entre 8:30 e 10:30 h) para que o procedimento indutor de estresse fosse aplicado na mesma fase do ciclo circadiano de corticosterona (HASTINGS, 1991).

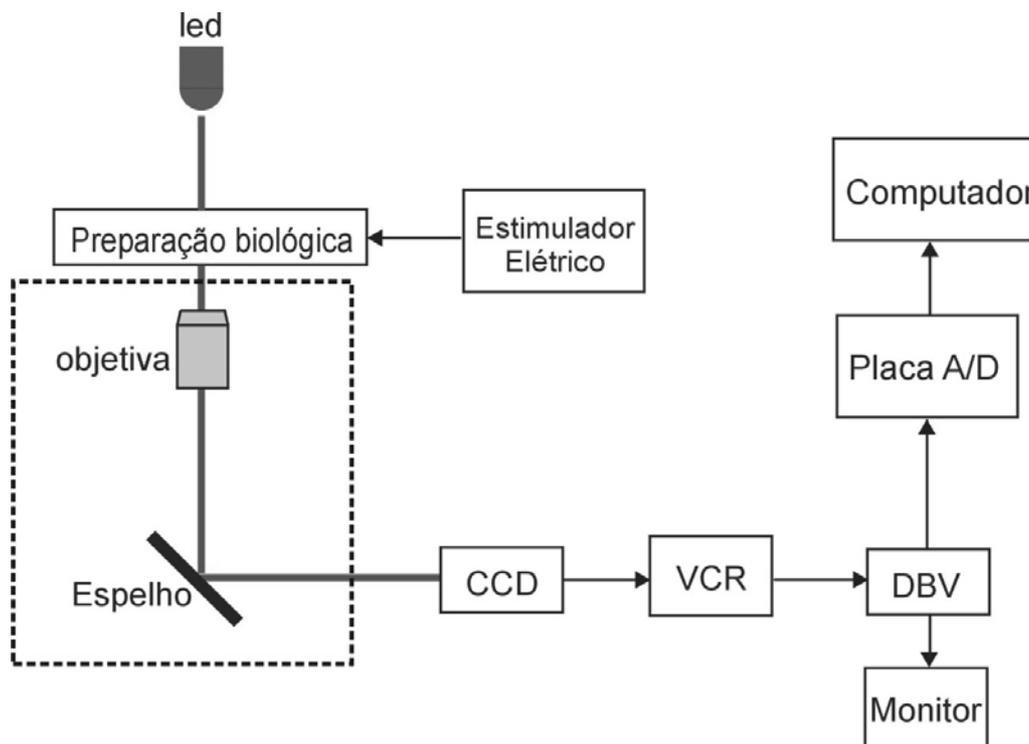
### **3.3 Isolamento de Miócitos Cardíacos Ventriculares**

Miócitos do ventrículo esquerdo foram isolados por digestão enzimática (BASSANI *et al.*, 1992; BASSANI & BASSANI, 2002; CARVALHO *et al.*, 2006). Os ratos foram sacrificados por exsanguinação após concussão cerebral. O coração era removido e perfundido em um sistema de Langendorff via aorta com solução de Krebs-Henseleit modificada (sem  $\text{Ca}^{2+}$ ) a 37°C por 5 minutos. A seguir, era adicionada colagenase (0,2-0,7 mg/ml; Worthington Biochem., Lakewood, NJ, EUA) à solução, para digestão do tecido miocárdico, e a perfusão prosseguia até que o coração se tornasse flácido (15-20 min). A enzima era lavada com solução de Tyrode sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA). Em seguida, o ventrículo esquerdo era dissecado e triturado na mesma solução ou em solução cardioplégica para dissociação dos miócitos. Após repetidas lavagens, a suspensão de células era armazenada a 4°C, e as células eram utilizadas no período de até 6 h após o isolamento.

### **3.4 Medição do Encurtamento Celular**

Os miócitos isolados eram depositados em uma câmara de perfusão (GOMES, 1997; desenvolvida no CEB/UNICAMP, patente n.º. PI 0302.403-2), cuja base consiste de uma lamínula tratada com solução de colágeno por 15 min antes da deposição dos

miócitos, para garantir adesão. Passados 20 min para sedimentação das células, a câmara era perfundida com solução de Tyrode normal. Eletrodos conectados a um estimulador elétrico (desenvolvido pelo CEB/UNICAMP, OS 01.110) eram imersos na solução da câmara e as células eram estimuladas (pulsos bipolares de tensão com 5 ms de duração e amplitude de 1,2x o limiar de estimulação, aplicados a 1 Hz). Foi utilizado um sistema de microscopia desenvolvido no CEB/UNICAMP (GOMES *et al.*, 1998), no qual os miócitos são iluminados por um LED (*light emitting diode*), e a imagem da célula coletada por uma objetiva (plana 40x, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e projetada numa câmara de vídeo (CCD, Oriental, Seoul, Coréia do Sul). O sinal de vídeo é enviado a um aparelho gravador de videocassete (VHS VC-1494 B, Sharp, Manaus, AM), cuja saída é conectada a um detector de borda de sinal de vídeo (DBV, desenvolvido pelo CEB/UNICAMP, patente n.º. PI 0300.834-7), utilizado para acompanhar a posição de uma das bordas da célula. O sinal de tensão elétrica do DBV era adquirido via uma placa de aquisição de dados (Cad 12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda., SP) em um conversor analógico-digital de 12 bits e armazenado em um computador (AcerMate 486, 100 MHz com 16 MB, Acer do Brasil, SP) com o auxílio do programa AqDados (DOS, versão 4.16, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda., SP). A variação do comprimento celular em resposta à estimulação elétrica (i.e., contração) foi registrada e gravada em vídeo para documentação. A instrumentação utilizada está esquematizada na Figura 3.1. Com o auxílio de uma gráticula micrométrica com precisão de 10  $\mu\text{m}$  (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) foi realizada a calibração do sinal de saída do DBV em função do deslocamento da borda do sinal de vídeo. A partir da gráticula também foi determinada uma escala de graduação fixada ao monitor de vídeo para possibilitar a medição do comprimento de repouso das células (CR). No conjunto de células estudadas, CR foi  $129 \pm 1 \mu\text{m}$  (N=229).



**Figura 3.1** – Esquema do *set-up* experimental. As células (preparação biológica) eram estimuladas por meio de eletrodos conectados a um estimulador elétrico. A imagem dos miócitos era ampliada pela objetiva, refletida pelo espelho e registrada por uma câmara de vídeo (CCD) conectada a um gravador de vídeo cassete (VCR), cujo sinal era enviado a um detector de borda de sinal de vídeo (DBV). O sinal era, então, adquirido pelo conversor analógico-digital (Placa A/D) e armazenado em um computador. O monitor de vídeo conectado ao DBV permitia a visualização da preparação (RICARDO, 2005).

### 3.5 Determinação de Curvas Concentração-Efeito (CCE)

Após seleção de uma única célula no campo microscópico para realização do experimento (i.e., miócito com nítida estriação, sem sinais de lesão e desenvolvendo contração regular sob estimulação), procedia-se a estimulação elétrica a 1 Hz por 5 min para estabilização das contrações. Era estimada a amplitude média de 3 contrações sucessivas (encurtamento de pico ( $\Delta L$ ), expresso como porcentagem de CR) desenvolvidas pelo miócito. A seguir, eram interpostas 2 pausas estimulatórias de 30 s de duração, separadas por 15 s de estimulação. Durante as pausas, as contrações espontâneas (CE) ocorridas eram contadas, e sua frequência média (CEs/min) utilizada

para quantificar a atividade espontânea celular. Este procedimento foi adaptado daquele desenvolvido por Boer & Bassani (2004) para quantificação da relação entre a concentração de catecolaminas e seu efeito pró-arrítmico em preparações miocárdicas. A medição de  $\Delta L$  e da frequência de CE foi repetida para cada concentração dos agonistas.

Foram obtidas CCE pelo método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963), que consiste na adição de concentrações crescentes do agonista (incremento molar de 0,5 unidade logarítmica) à preparação. A cada concentração do agonista, aguardou-se um período mínimo de 2 min para estabilização da resposta. Considerou-se que o efeito máximo havia sido obtido quando a adição subsequente de concentrações maiores não produziu aumento da resposta obtida previamente. Nas CCE determinadas com a presença de antagonistas competitivos, as preparações foram expostas ao antagonista por 20 min antes do início da curva.

Para determinação da resposta ao  $\text{CaCl}_2$ , a célula a ser utilizada era escolhida durante estimulação elétrica sob perfusão com solução de Tyrode normal. Em seguida, a estimulação era cessada e a célula perfundida por 1 min com a mesma solução contendo 10 mM cafeína, para depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  contido no RS (BASSANI *et al.*, 2004). A célula era então perfundida com solução de Tyrode contendo concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 6 mM).

A relação concentração-efeito foi ajustada por uma função não linear sigmóide descrita na equação 3.1:

$$R = \frac{Min + (Max - Min)}{1 + 10^{(\log EC_{50} - [A])^n}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

onde  $[A]$  é o logaritmo da concentração molar do agonista;  $Min$  é o valor basal da variável antes da adição do agonista;  $Max$  é o valor máximo da variável, atingido após saturação

da resposta (a resposta máxima,  $R_{max}$ , é a diferença entre  $Max$  e  $Min$ );  $EC_{50}$  é a concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da  $R_{max}$ ;  $n$  é o coeficiente de Hill (considerou-se  $n=1$ , exceto em alguns casos, como para a resposta inotrópica a  $CaCl_2$ , NA e ISO, em que este parâmetro foi determinado pelo ajuste). Todos os valores apresentados nas tabelas foram obtidos pelo ajuste não-linear. Foram desconsiderados os experimentos nos quais a diferença entre os valores (Min e Max) medidos e obtidos do ajuste foi maior que 10%.

Para cada protocolo *in vitro*, utilizou-se no mínimo 3 animais sob uma dada condição experimental (i.e., controle ou choque). Foi determinada apenas 1 CCE em cada amostra de suspensão celular semeada na câmara de perfusão.

### 3.6 Determinação do Valor $pA_2$ do Metoprolol (MET)

O método do antagonismo de Schild (ARUNLASKSHANA & SCHILD, 1959) foi aplicado para a análise da população de  $RA\beta$  reativa ao ISO em miócitos ventriculares e caracterizar a afinidade do antagonista competitivo MET, seletivo para o subtipo  $\beta_1$ . Este método pressupõe a competição de agonista e antagonista por um único tipo de sítio de ligação (receptor), e assume que a constante aparente de dissociação de antagonista e receptor ( $K_B$ ) pode ser estimada a partir da relação entre o desvio produzido na CCE do agonista e a concentração molar do antagonista ([B]).

Segundo este modelo, um único tipo de receptor está presente na preparação na concentração  $[R_t]$ . Numa dada concentração molar de agonista ([A]), a concentração de receptores ocupada por ele ([AR]) pode ser descrita como (TALLARIDA, 2007):

$$[AR] = \frac{[A] [R_t]}{([A] + K_A)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde  $K_A$  é a constante aparente de dissociação do agonista.

A presença do antagonista reduz a ocupação do receptor pelo agonista, e a concentração de receptores ocupados pelo último passa a ser:

$$[AR]^* = \frac{[A] [R_t]}{[A] + K_A (1 + [B] / K_B)} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

onde  $K_B$  é a constante aparente de dissociação do antagonista.

Esta redução na ocupação dos receptores pelo agonista resulta na diminuição do seu efeito numa dada  $[A]$ . A restauração do efeito requer uma maior concentração do agonista  $[A']$ . Considerando a razão das concentrações equiefetivas ( $[A'] / [A]$ ) como DR, e rearranjando a equação, tem-se que:

$$\log (DR - 1) = \log [B] - \log K_B \quad (\text{Eq. 3.4})$$

ARUNLASKSHANA & SCHILD (1959) definiram o valor  $pA_x$  como o logaritmo negativo da concentração molar do antagonista correspondente a uma  $DR = x$ . No caso particular em que  $DR = 2$ ,  $pA_2 = -\log K_B$ .

O gráfico de Schild pode ser construído relacionando-se os logaritmos de  $(DR - 1)$  e os logaritmos negativos de  $[B]$ . No caso de antagonismo competitivo simples, assumido pelo modelo, esta relação será linear com coeficiente angular unitário, e a intersecção no eixo das abscissas será correspondente ao valor de  $-\log K_B$ . Quando os valores de coeficiente angular são estatisticamente diferentes da unidade ou a linha do gráfico não é uma reta, pode-se inferir que o antagonismo não é do tipo competitivo simples ou que o equilíbrio entre agonista/antagonista e receptor não foi atingido (TALLARIDA *et al.*, 1979).

Neste trabalho foram obtidas CCE ao ISO (efeito inotrópico) na ausência e na presença de várias concentrações do antagonista MET (30, 60, 100 e 300 nM), em células de ratos expostos ou não ao choque nas patas. Em seguida, foram calculados os valores de DR a partir da  $EC_{50}$ . Mesmo na maior [MET] utilizada, não foi observada redução significativa da  $R_{max}$  ao ISO.

### **3.7 Agonistas e Antagonistas**

Noradrenalina (NA): neurotransmissor liberado pela maioria dos neurônios simpáticos pós-ganglionares, ativa receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  e tem baixa afinidade por receptores do subtipo  $\beta_2$ . Foi utilizada uma faixa de concentração de 1 nM a 0,1 mM (LANDS *et al.*, 1967b; LANGER, 1974).

Isoproterenol (ISO): agonista de  $RA\beta$  derivado sinteticamente da noradrenalina que não apresenta seletividade para subtipos. Foi utilizada uma faixa de concentração de 0,1 nM a 10  $\mu$ M (LANDS *et al.*, 1967a,b).

Fenilefrina (PHE): agonista sintético  $\alpha$ -adrenérgico, não seletivo para subtipos destes receptores. Foi utilizada uma faixa de concentração de 10 nM a 0,1 mM (BRODDE & MICHEL, 1999).

Butoxamina (BUT): bloqueador seletivo de  $RA\beta_2$ , utilizado na concentração de 0,3  $\mu$ M durante a determinação de CCE ao ISO (LEVY, 1966).

Metoprolol (MET): antagonista seletivo de  $RA\beta_1$ . Foi utilizada uma faixa de concentração de 30 a 300 nM durante a determinação de CCE ao ISO (WEBER, 2005).

Prazosin (PRZ): bloqueador seletivo de  $RA\alpha_1$ , utilizado na concentração de 0,1  $\mu$ M durante a determinação de CCE a NA (BRODDE & MICHEL, 1999).

3-Isobutil-1metilxantina (IBMX): inibidor não seletivo de fosfodiesterases, enzimas que catalisam a degradação do AMPc. Foi utilizada uma faixa de concentração de 1 a 300  $\mu$ M. (VON DER LEYEN, 1989).

CaCl<sub>2</sub>: a forma ionizada de íon, Ca<sup>2+</sup>, entra na célula durante o PA e se liga aos miofilamentos para o desenvolvimento de contração. Foi utilizada uma faixa de concentração de 0,25 a 6 mM.

### **3.8 Soluções**

Todas as soluções foram preparadas com sais de padrão analítico e água ultrafiltrada. As concentrações dos sais e compostos das soluções abaixo estão expressas em mM.

Solução de Krebs-Henseleit modificada: NaCl 115; KCl 4,5; NaHCO<sub>3</sub> 25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 3; glicose 11,1; pH 7,4 a 36,5 °C sob borbulhamento com carbogênio.

Solução cardioplégica: KCl 30; ácido glutâmico 70; HEPES (ácido hidroxietil-piperazina-N''-2-etano-sulfônico) 10; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1; glicose 11; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10; taurina 20.

Tyrode normal (NT): NaCl 140; KCl 6; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,2; HEPES 5; glicose 11,1; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 1; pH 7,4 a 23 °C.

As soluções-estoque de ISO e NA (20 mM) foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico (10 mM). As soluções-estoque de BUT (10 mM), MET (15 mM), PRZ (2 mM), IBMX (10 mM), PHE (40 mM) e CaCl<sub>2</sub> (0,5 M) foram preparadas com água e armazenadas a -20 °C, com exceção da última, que foi mantida a temperatura ambiente. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição no dia do experimento e mantidas em banho de gelo. Os fármacos foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA).

### **3.9 Análise Estatística**

Os dados estão apresentados como média acompanhada pelo respectivo erro padrão (EP), ou pelos limites do intervalo de confiança para 95% (IC95%). N representa o

número de células estudadas. Para fins estatísticos, os valores de  $EC_{50}$  foram convertidos para valores  $pD_2$  ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ).

Os resultados foram comparados por teste  $t$  de Student para amostras pareadas ou não pareadas, ou por análise de variância bifatorial seguida por comparação de médias pelo teste de Bonferroni. A significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e regressões não lineares foram feitas com o auxílio do programa Prism (versão 4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### **4.1 Resposta Inotrópica a Catecolaminas em Miócitos Ventriculares de Rato: Efeito do Estresse**

Não houve efeito significativo do choque nas patas ou de qualquer antagonista utilizado sobre a amplitude basal de contrações registradas nos miócitos isolados.

Foram utilizados os agonistas NA (que atua sobre RA dos subtipos  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  presentes nas células miocárdicas, Lands *et al.*, 1967a; Langer, 1974), ISO (que ativa RA dos subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , Lands *et al.*, 1976a,b) e PHE (agonista  $\alpha$ -adrenérgico, BRODDE & MICHEL, 1999).

Observou-se uma redução de cerca de 40% da  $R_{max}$  inotrópica à NA em células de ratos estressados ( $p= 0,0461$ ; teste t para amostras não pareadas), associada a deslocamento da curva concentração-efeito à esquerda e aumento do  $pD_2$  ( $p= 0,0059$ ; teste t para amostras não pareadas), indicando supersensibilidade à NA (Tabela 4.1 e Figura 4.1 A).

Para investigar a possível participação de  $RA\alpha$  nesta alteração, os experimentos foram repetidos na presença do antagonista de  $RA\alpha_1$ , prazosin (PRZ). A análise de variância demonstrou que a alteração da  $R_{max}$  e do  $pD_2$  à NA no grupo choque não foi afetada pela presença do antagonista ( $p> 0,13$  para o fator antagonista;  $p> 0,37$  para a interação grupo x antagonista), embora a diferença nos valores de  $pD_2$  entre os grupos controle e choque fosse maior na presença de PRZ. Estes resultados indicam que RAs  $\alpha$  parecem não estar envolvidos nas alterações da resposta inotrópica à NA encontradas no grupo choque.

**Tabela 4.1** – Efeito inotrópico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.1 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax. O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	NA (N=20)	NA+PRZ (N=7)	NA (N=8)	NA+PRZ (N=8)
Basal (%CR)	12,12 $\pm$ 1,44	10,02 $\pm$ 1,21	13,69 $\pm$ 1,10	10,01 $\pm$ 1,24
Rmax (%CR)	8,93 $\pm$ 1,42	12,24 $\pm$ 2,07	4,10 $\pm$ 0,73	6,00 $\pm$ 1,13
$\text{pD}_2$	7,418 $\pm$ 0,163	7,273 $\pm$ 0,138	8,249 $\pm$ 0,154 *	8,456 $\pm$ 0,158 *

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

Basal:  $p=0,646$  para G;  $p=0,094$  para A;  $p=0,642$  para GxA

Rmax:  $p=0,003$  para G;  $p=0,139$  para A;  $p=0,687$  para GxA

$\text{pD}_2$ :  $p<0,001$  para G;  $p=0,876$  para A;  $p=0,376$  para GxA

\*  $p<0,05$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)

Na Tabela 4.2 estão apresentados os resultados obtidos no ajuste da curva à NA considerando o coeficiente de Hill (n) variável. Os parâmetros Basal, Rmax e  $\text{pD}_2$  foram semelhantes aos obtidos considerando-se  $n=1$ . O valor de n foi significativamente maior no grupo choque ( $p=0,006$  para o fator grupo). PRZ tendeu a reduzir n em ambos os grupos, embora não significativamente ( $p>0,05$  para o fator antagonista). No entanto, o antagonista não aboliu a diferença de n entre os grupos ( $p>0,30$  para a interação grupo x antagonista). Por outro lado, nas CCE ao ISO, o valor de n foi similar em ambos os grupos ( $n=3,65 \pm 0,97$ , N=19; e  $3,07 \pm 0,90$ , N=18 nos grupos controle e choque, respectivamente,  $p>0,6$  teste t para amostras não pareadas). Não temos elementos para propor uma explicação da alteração do coeficiente de Hill apenas na CCE à NA no grupo choque ou prever as conseqüências fisiológicas de tal alteração.

**Tabela 4.2** – Efeito inotrópico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.1 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica;  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax; e n: coeficiente de Hill. O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	NA (N=18)	NA+PRZ (N=6)	NA (N=5)	NA+PRZ (N=7)
Basal (%CR)	11,98 $\pm$ 1,58	10,18 $\pm$ 1,22	13,9 $\pm$ 1,70	9,70 $\pm$ 1,09
Rmax (%CR)	8,26 $\pm$ 1,34	11,49 $\pm$ 1,61	3,59 $\pm$ 0,75	5,57 $\pm$ 1,05
$\text{pD}_2$	7,209 $\pm$ 0,159	7,447 $\pm$ 0,154	8,552 $\pm$ 0,168 *	8,422 $\pm$ 0,179 *
Coefficiente de Hill (n)	3,24 $\pm$ 0,85	1,61 $\pm$ 0,30	10,29 $\pm$ 4,31 *	5,25 $\pm$ 1,88

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

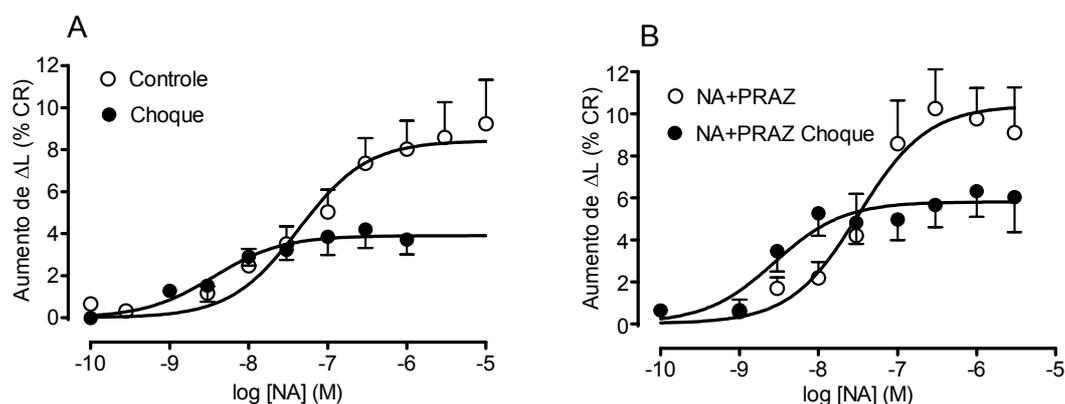
Basal:  $p = 0,723$  para G;  $p = 0,146$  para A;  $p = 0,555$  para GxA

Rmax:  $p = 0,005$  para G;  $p = 0,144$  para A;  $p = 0,722$  para GxA

$\text{pD}_2$ :  $p < 0,001$  para G;  $p = 0,802$  para A;  $p = 0,396$  para GxA

n:  $p = 0,006$  para G;  $p = 0,074$  para A;  $p = 0,352$  para GxA

\*  $p < 0,05$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)



**Figura 4.1** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico da noradrenalina (NA), na ausência (A) e presença (B) do antagonista prazosin (PRZ, 0,1  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento ( $\Delta\text{L}$ ) celular de pico ( $\Delta\text{L}$ , em % do comprimento celular diastólico, CR). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.1.

Foi também investigada a resposta inotrópica à fenilefrina (PHE, agonista de RA $\alpha$ ). Não se observou resposta inotrópica consistente a este agonista. A amplitude das contrações no nível basal e após adição de 100  $\mu$ M de PHE foi  $11,46 \pm 1,64$  e  $13,70 \pm 1,84$  %CR, respectivamente (N= 9, p= 0,0046, teste t para amostras pareadas) no grupo controle (menor que 20% da R $_{max}$  à NA), mas de  $9,06 \pm 1,36$  e  $8,79 \pm 1,75$  %CR, respectivamente (N= 10, p> 0,78, teste t para amostras pareadas) no grupo choque, o que indica ausência de resposta contrátil significativa no último grupo. Estes resultados sugerem que RA $\alpha$  tenham um papel pouco expressivo na mediação de efeito inotrópico sob as presentes condições experimentais em miócitos ventriculares de ratos de ambos os grupos.

De modo semelhante ao observado com NA, a R $_{max}$  inotrópica ao ISO foi significativamente reduzida (~40%) em miócitos de ratos submetidos ao choque (p= 0,0246; teste t para amostras não pareadas), como visto na Tabela 4.3 e nas Figuras 4.2 A e 4.3. No entanto, diversamente do que ocorreu com NA, não foi detectada alteração significativa do pD $_2$  do ISO (p= 0,396, teste t para amostras não pareadas).

Como ambos NA e ISO atuam sobre RA do subtipo  $\beta_1$ , determinou-se CCE ao ISO na presença de um antagonista seletivo para este subtipo de receptor, o MET. Como mostrado na Tabela 4.3 e Figuras 4.2 e 4.3, o antagonista, na concentração de 0,1  $\mu$ M, reduziu significativamente o pD $_2$  (p< 0,001 para o fator antagonista), mas não a R $_{max}$  ao ISO, em ambos os grupos, como esperado de antagonismo competitivo e reversível. A presença de MET elevou a R $_{max}$  ao ISO apenas no grupo choque (>90%), abolindo a diferença observada na ausência do antagonista (p< 0,04 para interação grupo x antagonista, Figura 4.3). Isto indica que, de algum modo, a redução na eficácia aparente dos agonistas de RA $\beta$ , observada em células de ratos submetidos ao choque, possa se relacionar à ocupação de RA $\beta_1$ .

**Tabela 4.3** – Efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\beta_1$ , metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas nas Figuras 4.2 e 4.3 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax. O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	ISO (N=21)	ISO+MET (N=6)	ISO (N=19)	ISO+MET (N=9)
Basal (%CR)	10,21 $\pm$ 1,10	9,43 $\pm$ 1,13	10,39 $\pm$ 1,11	11,39 $\pm$ 1,37
Rmax (%CR)	8,32 $\pm$ 1,13	7,41 $\pm$ 1,01	4,94 $\pm$ 0,87 *	9,68 $\pm$ 1,23 §
$\text{pD}_2$	8,012 $\pm$ 0,14	6,384 $\pm$ 0,14 §	8,192 $\pm$ 0,157	6,548 $\pm$ 0,119 §

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

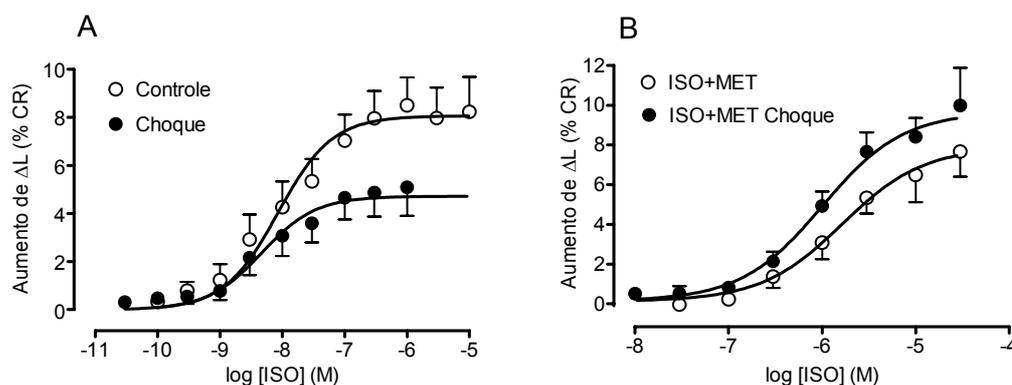
Basal:  $p = 0,455$  para G;  $p = 0,940$  para A;  $p = 0,537$  para GxA

Rmax:  $p = 0,673$  para G;  $p = 0,151$  para A;  $p = 0,036$  para GxA

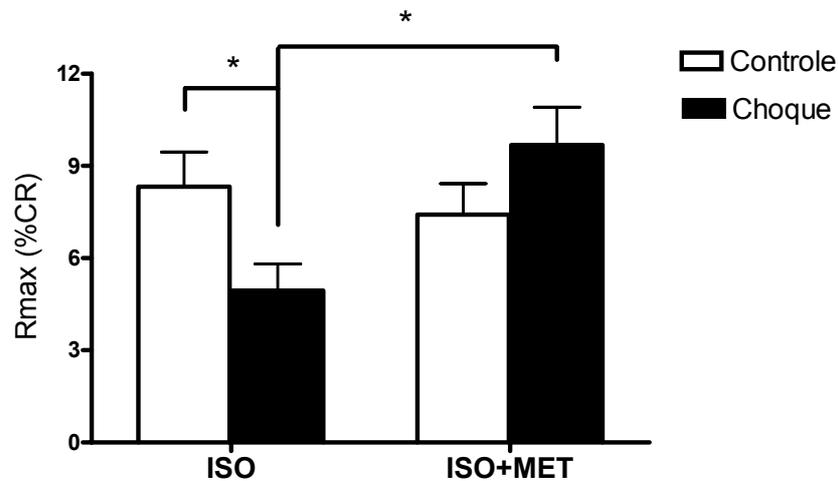
$\text{pD}_2$ :  $p = 0,354$  para G;  $p < 0,001$  para A;  $p = 0,965$  para GxA

\*  $p < 0,05$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro*

§  $p < 0,05$  vs. mesmo grupo na ausência de MET (teste de Bonferroni)



**Figura 4.2** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista metoprolol (MET, 0,1  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento ( $\Delta\text{L}$ ) celular de pico ( $\Delta\text{L}$ , em % do comprimento celular diastólico, CR). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.3.



**Figura 4.3** – Valores médios da resposta máxima (Rmax) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  de metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento celular de pico em % do comprimento celular diastólico, CR. As barras indicam o erro-padrão. Os parâmetros da Figura estão apresentados na Tabela 4.3. (\*  $p < 0,05$ , teste de Bonferroni).

Como ISO também atua em  $\text{RA}\beta_2$ , consideramos importante analisar uma possível influência deste subtipo na redução de Rmax observada após choque intermitente. Para isto, foram obtidas curvas ao ISO na presença de 0,3  $\mu\text{M}$  de BUT (antagonista seletivo de  $\text{RA}\beta_2$ ). A Tabela 4.4 e as Figuras 4.4 B e 4.5 mostram os resultados desses experimentos. A análise de variância não demonstrou influência significativa dos fatores estudados, embora o valor de p para a interação grupo x antagonista tenha sido relativamente pequeno ( $< 0,10$ ). No entanto, podemos ver nas Figuras 4.4 e 4.5, que houve uma tendência de redução de Rmax ao ISO (que chegou a ~40%) na presença de BUT apenas em células do grupo controle. Como resultado, a diferença que havia neste parâmetro entre os grupos na ausência do antagonista foi revertida pela presença de BUT. Assim, o efeito geral de BUT se assemelhou ao do MET, ao aproximar os valores de Rmax ao ISO nos grupos controle e choque. Porém, enquanto o segundo o fez por aumentar Rmax

apenas no grupo choque, no caso do primeiro, ocorreu diminuição de Rmax seletivamente no grupo controle.

**Tabela 4.4** – Efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,3  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\beta_2$ , butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas nas Figuras 4.4 e 4.5 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta inotrópica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de Rmax. O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	ISO (N=21)	ISO+BUT (N=14)	ISO (N=19)	ISO+BUT (N=9)
Basal (%CR)	10,21 $\pm$ 1,10	10,80 $\pm$ 1,13	10,39 $\pm$ 1,11	10,94 $\pm$ 1,21
Rmax (%CR)	8,32 $\pm$ 1,13	5,13 $\pm$ 0,83	4,94 $\pm$ 0,87 *	5,64 $\pm$ 1,67
$\text{pD}_2$	8,012 $\pm$ 0,14	8,182 $\pm$ 0,134	8,192 $\pm$ 0,157	8,285 $\pm$ 0,139

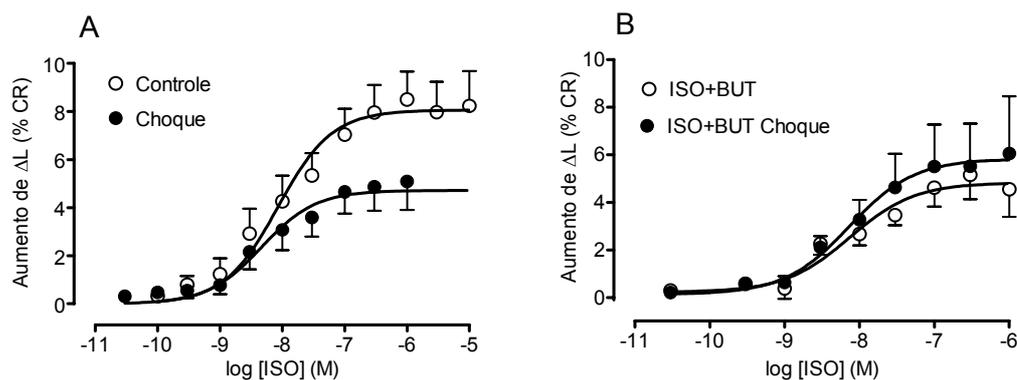
Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

Basal:  $p = 0,895$  para G;  $p = 0,642$  para A;  $p = 0,985$  para GxA

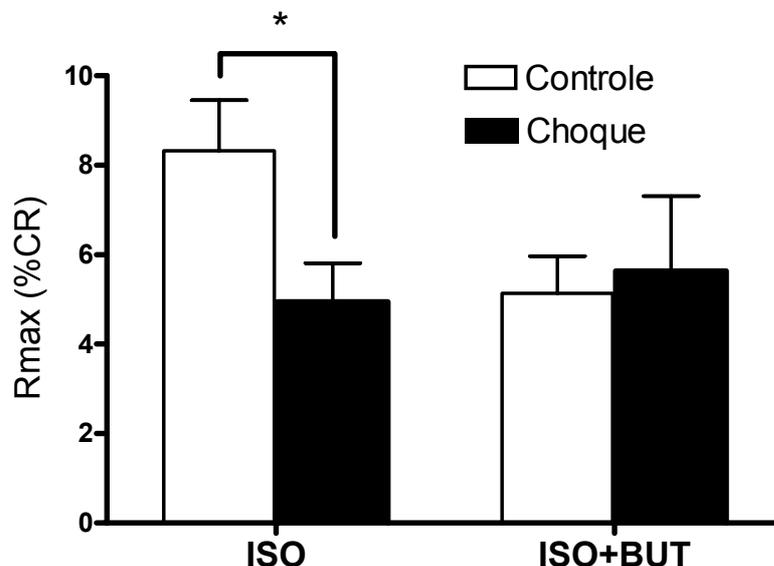
Rmax:  $p = 0,220$  para G;  $p = 0,285$  para A;  $p = 0,098$  para GxA

$\text{pD}_2$ :  $p = 0,380$  para G;  $p = 0,414$  para A;  $p = 0,810$  para GxA

\*  $p < 0,05$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)



**Figura 4.4** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista butoxamina (BUT, 0,3  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento ( $\Delta\text{L}$ ) celular de pico ( $\Delta\text{L}$ , em % do comprimento celular diastólico, CR). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.4.

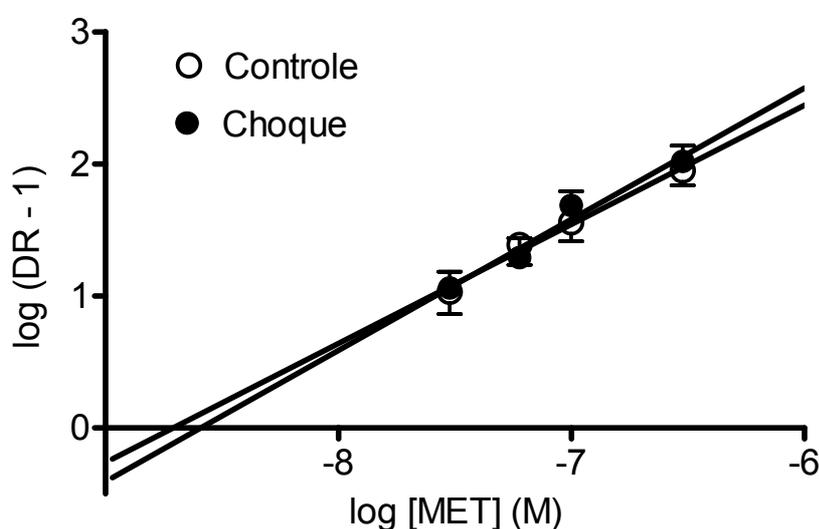


**Figura 4.5** – Valores médios da resposta máxima (Rmax) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento celular de pico em % do comprimento celular diastólico, CR. As barras indicam o erro-padrão. Os parâmetros da Figura estão apresentados na Tabela 4.4. (\*  $p < 0,05$ , teste de Bonferroni).

Os resultados acima são intrigantes e levantam a possibilidade de heterogeneidade da população de  $RA\beta$  envolvida funcionalmente na resposta inotrópica ao ISO e/ou modificações na conformação dos  $RA\beta_1$  que pudessem ser responsáveis pelo paradoxal aumento da Rmax ao ISO no grupo choque por antagonismo deste subtipo de receptores. Como visto na Tabela 4.5 e na Figura 4.6, em ambos os grupos o coeficiente angular da reta de Schild não foi significativamente diferente de 1. Além disso, não foi observada diferença do valor de  $pA_2$  entre os grupos controle e choque (sobreposição dos intervalos de confiança para 95%), sugerindo que o estresse não interfere de modo detectável na interação dos  $RA\beta_1$  e seus ligantes em miócitos ventriculares de ratos.

**Tabela 4.5** – Valores de  $pA_2$  do metoprolol (MET) e coeficiente angular da reta de Schild, obtidas, utilizando isoproterenol (ISO) como agonista, em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. Estão apresentados os valores médios acompanhados dos limites do intervalo de confiança para 95% (IC95%). O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	$pA_2$ (IC 95%)	Coefficiente Angular (IC 95%)
Controle (N= 23)	8,709 (8,509 – 9,080)	0,902 (0,763 -1,041)
Choque (N= 34)	8,535 (8,308 – 9,540)	0,993 (0,719 -1,268)



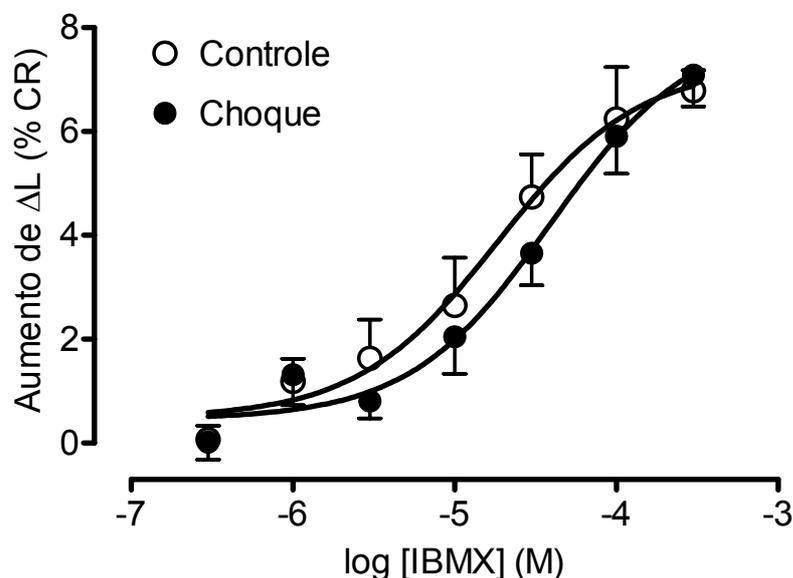
**Figura 4.6** – Gráfico de Schild para o antagonismo exercido pelo metoprolol (MET) sobre o efeito inotrópico do isoproterenol (ISO) em miócitos ventriculares de ratos controles e submetidos a choque nas patas (DR: razão das concentrações equiefetivas).

O passo seguinte foi examinar a resposta inotrópica (especialmente em termos de eficácia aparente) de agonistas que atuam em mecanismos pós-receptor. Inicialmente, foram obtidas CCE ao IBMX, que inibe as fosfodiesterases e, portanto, a degradação de AMPc, o que causa um acúmulo intracelular do nucleotídeo e conseqüente ativação da PKA sem a mediação dos receptores. Não foram observadas diferenças significativas nos

valores  $R_{max}$  e  $pD_2$  do IBMX ( $p > 0,62$ ) obtidos em miócitos de ratos controles e submetidos a choque nas patas, como mostram a Tabela 4.6 e a Figura 4.7.

**Tabela 4.6** – Efeito inotrópico ao 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.7 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do IBMX;  $R_{max}$ : valor máximo de resposta inotrópica; e  $pD_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de  $R_{max}$ . O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses. (Basal  $p = 0,681$ ;  $R_{max}$   $p = 0,620$ ;  $pD_2$   $p = 0,759$ ; teste t para amostras não pareadas).

	Controle (N=8)	Choque (N=8)
Basal (%CR)	$7,01 \pm 1,29$	$6,34 \pm 0,95$
$R_{max}$ (%CR)	$7,70 \pm 0,84$	$7,05 \pm 0,98$
$pD_2$	$4,842 \pm 0,213$	$4,753 \pm 0,189$

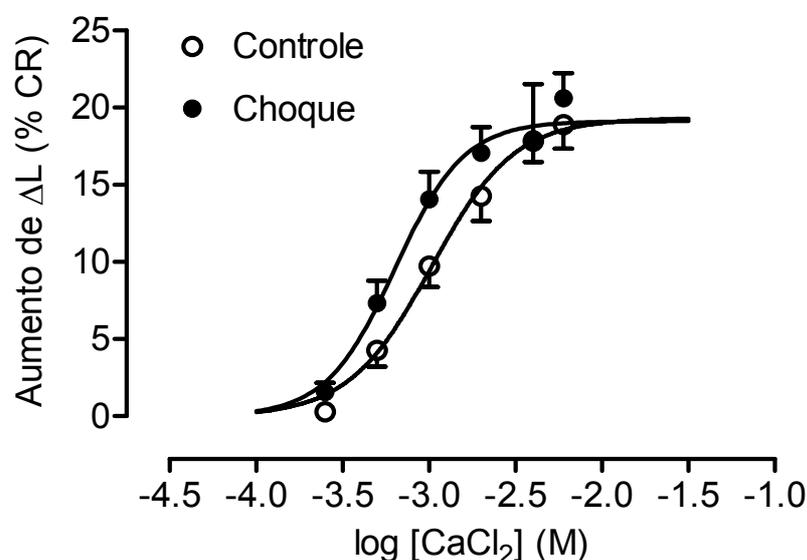


**Figura 4.7** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópica do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento ( $\Delta L$ ) celular de pico ( $\Delta L$ , em % do comprimento celular diastólico, CR). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.6.

Por fim, para investigar a reatividade dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , foi determinada a resposta ao  $\text{CaCl}_2$ . Como se pode ver na Tabela 4.7, não se observou diferença estatisticamente significativa de  $R_{\text{max}}$  ( $p > 0,97$ ) ao  $\text{CaCl}_2$  entre os grupos controle e choque. No entanto, a CCE em células de ratos estressados deslocou-se à esquerda em relação à curva obtida no grupo controle (Figura 4.8), com aumento do valor  $pD_2$  ( $p < 0,03$ ; teste t de Student).

**Tabela 4.7** – Efeito inotrópico ao cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.8 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: encurtamento de pico na ausência do agonista;  $R_{\text{max}}$ : valor máximo de resposta inotrópica; e  $pD_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% de  $R_{\text{max}}$ . O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. CR = comprimento celular diastólico. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses. (Basal  $p=0,386$ ;  $R_{\text{max}}$   $p=0,979$ ;  $pD_2$   $p=0,023$ ; teste t para amostras não pareadas). \*  $p < 0,05$  vs controle.

	Controle (N=8)	Choque (N=8)
Basal (%CR)	0,21 ± 0,21	0,77 ± 0,58
$R_{\text{max}}$ (%CR)	18,03 ± 1,92	18,10 ± 1,81
$pD_2$	3,020 ± 0,061	3,235 ± 0,058 *
Coeficiente de Hill	2,347 ± 0,277	3,015 ± 0,261



**Figura 4.8** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito inotrópico do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como aumento do encurtamento ( $\Delta L$ ) celular de pico ( $\Delta L$ , em % do comprimento celular diastólico, CR). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.7.

#### **4.2 Resposta Arritmica a Catecolaminas em Miócitos Ventriculares de Rato: Efeito do Estresse**

Vale a pena ressaltar que, nas curvas à NA e ao ISO (Figuras 4.1A, 4.2A e 4.4A), pode se observar que a resposta inotrópica absoluta é bastante semelhante nos grupos controle e choque até uma certa concentração do agonista (aproximadamente 10 nM para ISO e 30 nM para NA). A partir daí, a resposta inotrópica sofre um aumento marcante no grupo controle, mas apresenta saturação nas células de ratos submetidos ao choque. Nessas concentrações dos agonistas, pode-se observar maior atividade espontânea em miócitos do grupo choque do que no grupo controle, como veremos a seguir. É importante ressaltar que a resposta arritmica aos agonistas foi obtida nas mesmas células e durante os mesmo experimentos nos quais a resposta inotrópica foi examinada.

A Tabela 4.8 e as Figuras 4.9 A e 4.10 mostram o efeito arritmogênico (i.e., indução de atividade espontânea diastólica) da NA em miócitos ventriculares isolados de ratos controles e submetidos a choque nas patas. A NA foi mais efetiva em induzir automatismo em células do grupo choque do que do grupo controle, a julgar pelos maiores valores de Rmax e  $pD_2$  observados ( $p < 0,04$ , análise de variância). Embora não tenha sido observada influência significativa do antagonista sobre nenhum desses parâmetros ( $p > 0,16$ ), o tratamento com PRZ reverteu grande parte do aumento de ~ 70% na Rmax arritmica à NA ( $p < 0,05$ ) induzido pelo choque nas patas (Figura 4.10).

**Tabela 4.8** – Efeito arritmogênico da noradrenalina (NA) na ausência e presença de  $0,1 \mu\text{M}$  do antagonista de  $RA\alpha_1$ , prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas nas Figuras 4.9 e 4.10 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: número de contrações espontâneas na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta arritmica; e  $pD_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da Rmax. Basal e Rmax estão expressos como o número total de contrações espontâneas por minuto (CE/min). O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	NA (N=16)	NA+PRZ (N=9)	NA (N=6)	NA+PRZ (N=8)
Basal (CE/min)	1,42 ± 0,51	0,51 ± 0,33	2,17 ± 0,96	1,42 ± 0,29
Rmax (CE/min)	6,40 ± 0,43	6,62 ± 1,23	11,02 ± 2,60 *	7,75 ± 1,11
$pD_2$	7,020 ± 0,220	6,501 ± 0,111	7,309 ± 0,244	7,333 ± 0,340

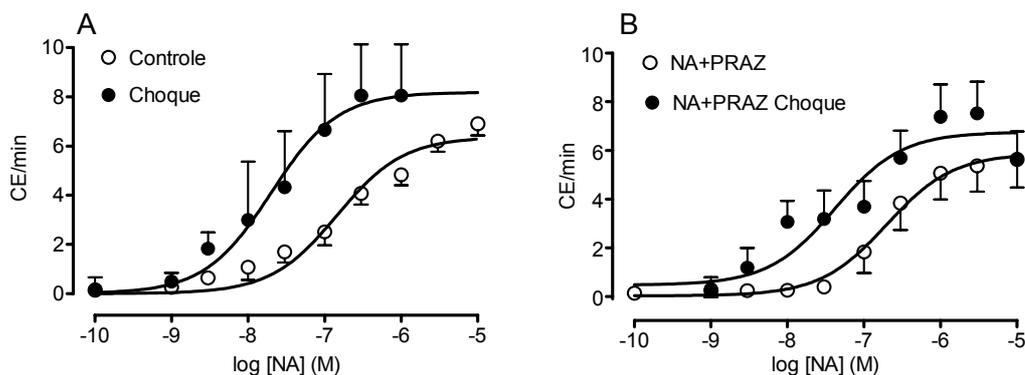
Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

Basal:  $p = 0,166$  para G;  $p = 0,166$  para A;  $p = 0,889$  para GxA

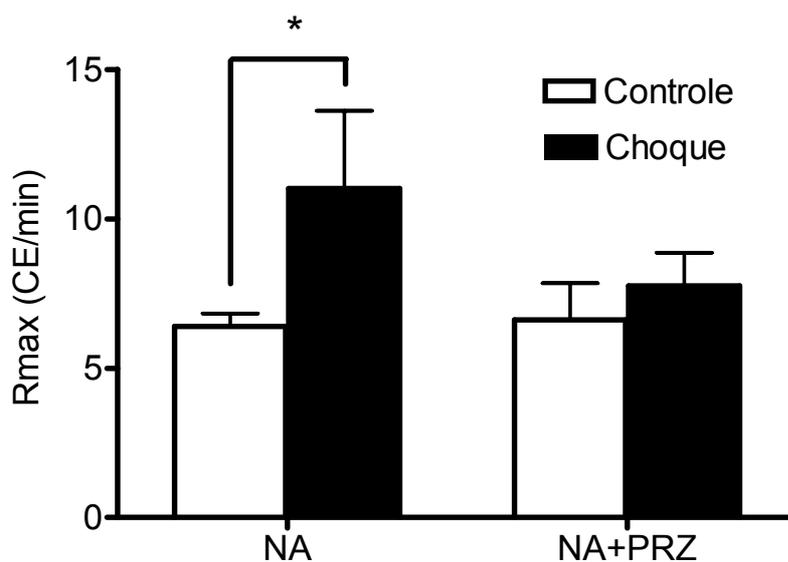
Rmax:  $p = 0,021$  para G;  $p = 0,209$  para A;  $p = 0,152$  para GxA

$pD_2$ :  $p = 0,040$  para G;  $p = 0,353$  para A;  $p = 0,308$  para GxA

\*  $p < 0,05$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)



**Figura 4.9** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica da noradrenalina (NA), na ausência (A) e presença (B) do antagonista prazosin (PRZ, 0,1  $\mu$ M) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.8.



**Figura 4.10** – Valores médios da resposta máxima (Rmax) a noradrenalina (NA), na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de prazosin (PRZ), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). As barras indicam o erro-padrão. Os parâmetros da Figura estão apresentados na Tabela 4.8 (\*  $p < 0,05$ , teste de Bonferroni).

Como observado para o efeito inotrópico, PHE não causou estimulação da atividade espontânea em qualquer dos grupos. A frequência de contrações espontâneas na ausência do agonista e após adição de 100  $\mu$ M de PHE foi  $2,00 \pm 1,20$  e  $1,00 \pm 0,88$

por min, respectivamente (N= 9,  $p > 0,47$ , teste t para amostras pareadas) no grupo controle. No grupo choque, por outro lado, observou-se que a frequência de contrações espontânea foi menor na presença de 100  $\mu\text{M}$  PHE ( $0,14 \pm 0,14$  CE/min) do que na ausência do agonista ( $2,71 \pm 0,99$  CE/min, N= 10,  $p < 0,02$ , teste t para amostras pareadas). Estes resultados estão de acordo com o reportado por Boer (2006), sobre a aparente falta de envolvimento de  $\text{RA}\alpha$  na geração de atividade espontânea em miócitos ventriculares de ratos controles. No entanto, a tendência de inibição da atividade espontânea tanto pelo bloqueio (PRZ), quanto pela estimulação (PHE) de  $\text{RA}\alpha$  em miócitos do grupo choque não permite inferir qual seria a real influência deste tipo de receptor no que diz respeito a esta resposta específica.

A Tabela 4.9 e as Figuras 4.11A e 4.12 mostram que células de ratos submetidos ao choque apresentaram maior reatividade arritmica também ao ISO, caracterizada por marcante desvio à esquerda da CCE e aumento de quase uma unidade logarítmica no  $\text{pD}_2$  ( $p < 0,01$ ).

O bloqueio de  $\text{RA}\beta_1$  com 0,1  $\mu\text{M}$  MET produziu alguns efeitos gerais (i.e., em ambos os grupos): a) reduziu a frequência basal de CE ( $p < 0,01$ ); b) diminuiu a  $R_{\text{max}}$  arritmica ao ISO ( $p < 0,01$ ); e c) reduziu o valor  $\text{pD}_2$  do agonista ( $p < 0,001$ ). No entanto, alguns de seus efeitos foram mais marcantes no grupo choque, como a redução de  $R_{\text{max}}$  (40%,  $p < 0,01$ ; vs. 15% no grupo controle,  $p > 0,05$ , Figura 4.12) e de  $\text{pD}_2$  (2,0 vs. 1,2 unidades logarítmicas no grupo controle, com abolição da supersensibilidade observada na ausência de MET).

**Tabela 4.9** – Efeito arritmogênico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,1  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\beta_1$ , metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas nas Figuras 4.11 e 4.12 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: número de contrações espontâneas na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta arritmica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da Rmax. Basal e Rmax estão expressos como o número total de contrações espontâneas por minuto (CE/min). O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	ISO (N=16)	ISO+MET (N=5)	ISO (N=12)	ISO+MET (N=9)
Basal (CE/min)	2,10 $\pm$ 0,42	0,05 $\pm$ 0,18	2,33 $\pm$ 1,08	-0,08 $\pm$ 0,04
Rmax (CE/min)	7,50 $\pm$ 0,47	6,48 $\pm$ 1,64	8,58 $\pm$ 0,81	4,92 $\pm$ 0,73 $\S$
$\text{pD}_2$	7,302 $\pm$ 0,200	6,078 $\pm$ 0,111 $\S$	8,279 $\pm$ 0,196 *	6,229 $\pm$ 0,094 $\S$

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

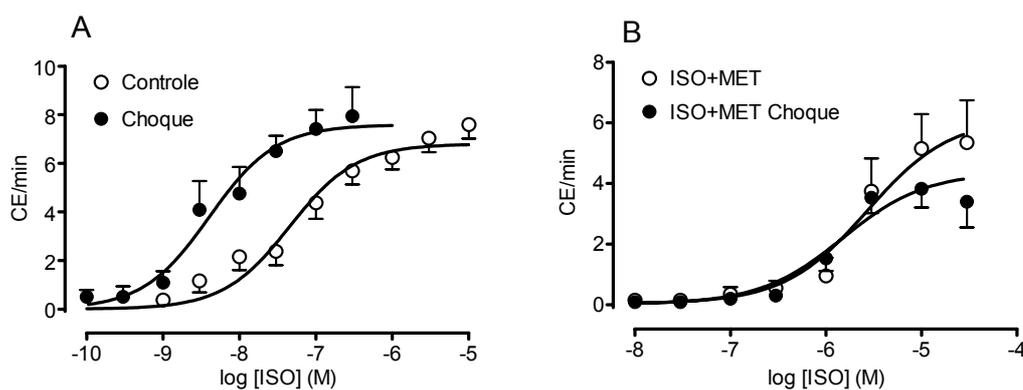
Basal:  $p = 0,945$  para G;  $p = 0,006$  para A;  $p = 0,810$  para GxA

Rmax:  $p = 0,777$  para G;  $p = 0,008$  para A;  $p = 0,122$  para GxA

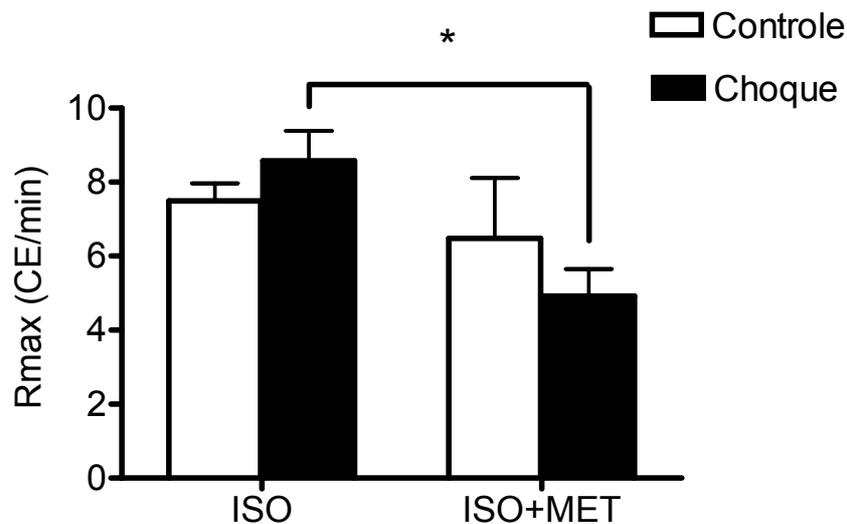
$\text{pD}_2$ :  $p = 0,013$  para G;  $p < 0,001$  para A;  $p = 0,064$  para GxA

\*  $p < 0,001$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)

$\S$   $p < 0,05$  vs. ISO na ausência de MET no respectivo grupo



**Figura 4.11** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista metoprolol (MET, 0,1  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.9.



**Figura 4.12** – Valores médios da resposta máxima (Rmax) ao isoproterenol (ISO), na ausência e presença de 0,1  $\mu$ M de metoprolol (MET), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). As barras indicam o erro-padrão. Os parâmetros da Figura estão apresentados na Tabela 4.9 (\*  $p < 0,05$ , teste de Bonferroni).

O bloqueio de  $RA\beta_2$  com 0,3  $\mu$ M BUT também eliminou a supersensibilidade ao efeito arritmogênico do ISO ( $p < 0,05$ ), mas de um modo diferente do bloqueio de  $RA\beta_1$ . Ao contrário do MET, BUT causou um efeito geral de aumento da Rmax arritmica ao ISO em ambos os grupos ( $p < 0,02$ ). Além disso, apenas em células do grupo choque, este antagonista reduziu a sensibilidade ao agonista ( $p < 0,04$  para interação grupo x antagonista), como mostrado na Tabela 4.10 e Figura 4.13.

**Tabela 4.10** – Efeito arritmogênico do isoproterenol (ISO) na ausência e presença de 0,3  $\mu\text{M}$  do antagonista de  $\text{RA}\beta_2$ , butoxamina (BUT), em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.13 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: número de contrações espontâneas na ausência do agonista; Rmax: valor máximo de resposta arritmica; e  $\text{pD}_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da Rmax. Basal e Rmax estão expressos como o número total de contrações espontâneas por minuto (CE/min). O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

	Controle		Choque	
	ISO (N=16)	ISO+BUT (N=11)	ISO (N=12)	ISO+BUT (N=8)
Basal (CE/min)	2,10 $\pm$ 0,42	1,43 $\pm$ 0,40	2,33 $\pm$ 1,08	1,39 $\pm$ 0,96
Rmax (CE/min)	7,50 $\pm$ 0,47	11,10 $\pm$ 1,43	8,58 $\pm$ 0,81	10,90 $\pm$ 2,39
$\text{pD}_2$	7,302 $\pm$ 0,200	7,424 $\pm$ 0,218	8,279 $\pm$ 0,196 *	7,493 $\pm$ 0,119 §

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque), antagonista (A, i.e., ausência e presença) e interação GxA. Resultados:

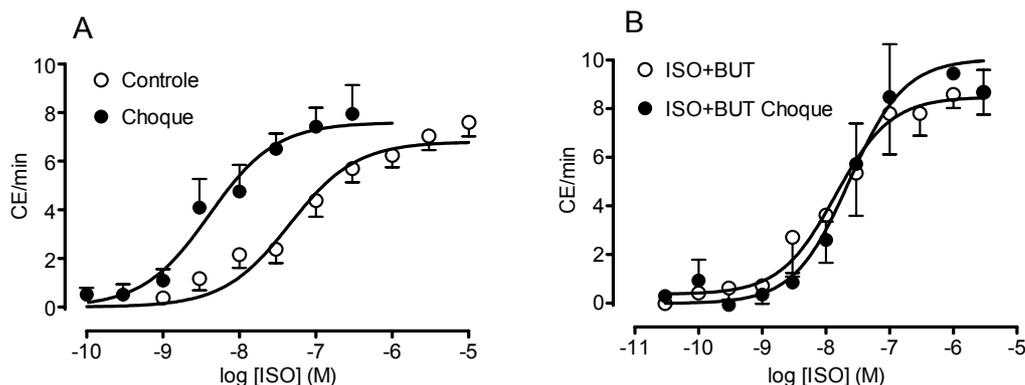
Basal:  $p = 0,898$  para G;  $p = 0,287$  para A;  $p = 0,849$  para GxA

Rmax:  $p = 0,717$  para G;  $p = 0,017$  para A;  $p = 0,595$  para GxA

$\text{pD}_2$ :  $p = 0,016$  para G;  $p = 0,119$  para A;  $p = 0,035$  para GxA

\*  $p < 0,01$  vs. grupo controle na mesma condição *in vitro* (teste de Bonferroni)

§  $p < 0,05$  vs. ISO na ausência de BUT no respectivo grupo

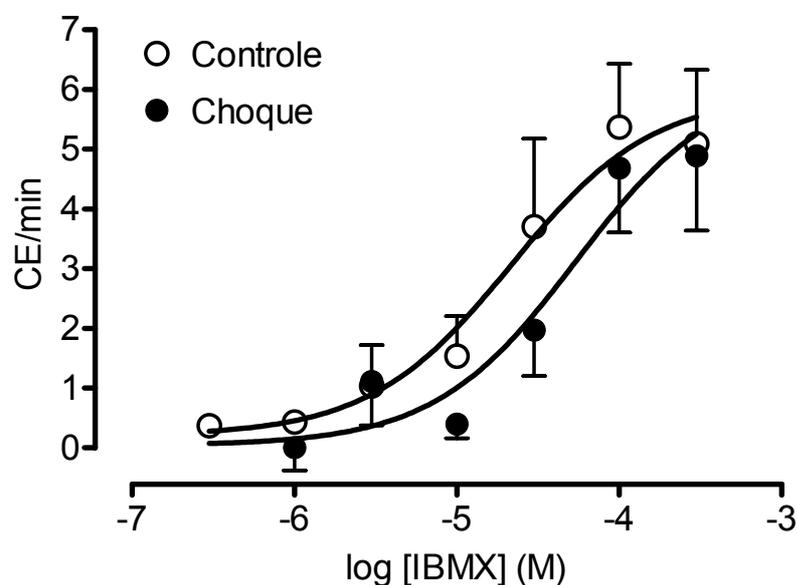


**Figura 4.13** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do isoproterenol (ISO), na ausência (A) e presença (B) do antagonista butoxamina (BUT, 0,3  $\mu\text{M}$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.10.

A Tabela 4.11 e Figura 4.14 mostram a resposta arritmica celular ao IBMX. Como também observado para o efeito inotrópico, não foi detectada diferença significativa entre os grupos em qualquer dos parâmetros da curva.

**Tabela 4.11** – Efeito arritmogênico do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.14 e os parâmetros obtidos do ajuste foram: Basal: número de contrações espontâneas na ausência do IBMX; Rmax: valor máximo de resposta arritmica; e  $pD_2$ : o logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da Rmax. Basal e Rmax estão expressos como o número total de contrações espontâneas por minuto (CE/min). O valor médio de cada parâmetro está acompanhado do respectivo erro-padrão. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses. (Basal:  $p = 0,547$ ; Rmax:  $p = 0,724$ ;  $pD = 0,181$ ; teste t para amostras não pareadas).

	Controle (N=6)	Choque (N=7)
Basal (CE/min)	1,06 ± 0,73	1,73 ± 0,78
Rmax (CE/min)	6,82 ± 1,31	6,20 ± 1,12
$pD_2$	4,521 ± 0,215	4,198 ± 0,101



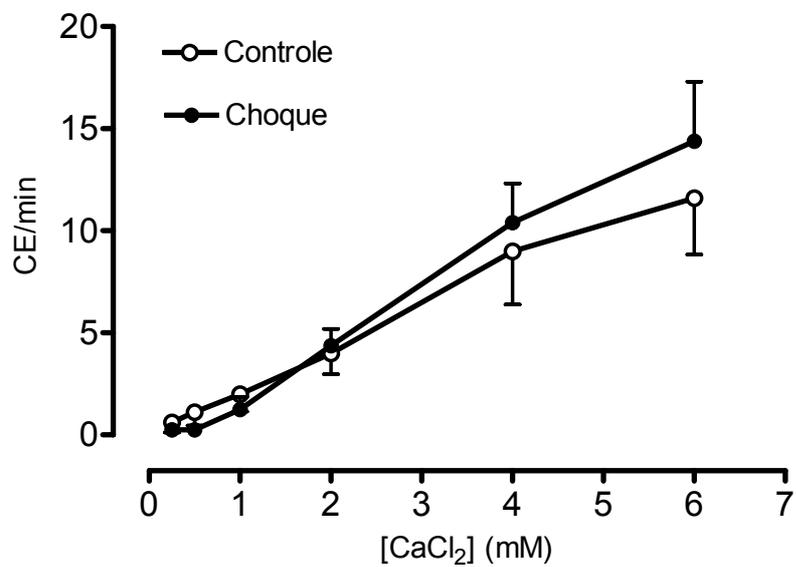
**Figura 4.14** – Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.11.

Na Tabela 4.12 e Figura 4.15 está representada a relação concentração-efeito arritmogênico para  $\text{CaCl}_2$  em miócitos de ratos controle e estressados. Não foram obtidos os parâmetros da CCE porque os valores de  $R_{\text{max}}$  fornecidos pelo ajuste não-linear foram muito superiores à resposta medida na concentração de 6 mM. Portanto, optou-se pela comparação da resposta por análise de variância bifatorial, que demonstrou que a frequência de CE é dependente de modo significativo da concentração de  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0,001$  para o fator concentração) mas que miócitos de ambos os grupos responderam ao agonista de modo semelhante ( $p > 0,5$ ).

**Tabela 4.12** – Efeito arritmogênico do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. As curvas estão apresentadas na Figura 4.14. Os valores médios do antilog de cada concentração está acompanhado do respectivo erro-padrão. O número de células em cada grupo (N) está indicado entre parênteses.

[ $\text{CaCl}_2$ ] (mM)	Controle	N	Choque	N
0,25	0,62 ± 0,50	8	0,25 ± 0,25	8
0,5	1,12 ± 0,67	8	0,25 ± 0,25	8
1	2,00 ± 0,84	8	1,25 ± 0,62	8
2	4,00 ± 1,02	8	4,37 ± 0,82	8
4	9,00 ± 2,61	5	10,40 ± 1,91	5
6	11,60 ± 2,77	5	14,40 ± 2,91	5

Fatores investigados na análise de variância: grupo (G, i.e., controle e choque;  $p = 0,550$ ), concentração do agonista (C;  $p < 0,001$ ) e interação GxC ( $p = 0,645$ )



**Figura 4.15** - Curvas que descrevem a relação concentração-efeito arritmica do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em miócitos ventriculares de ratos controle e submetidos a choque nas patas. A resposta está expressa como número médio de contrações espontâneas por minuto (CE/min). Os símbolos indicam os pontos experimentais e as barras, o erro-padrão. Os parâmetros destas curvas estão apresentados na Tabela 4.12.

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi examinar a resposta inotrópica às catecolaminas em miócitos ventriculares esquerdos isolados de ratos submetidos a choque nas patas, condição na qual as respostas do tecido atrial (particularmente a cronotrópica) já foram amplamente analisadas. Embora a contração atrial participe do processo de enchimento ventricular, a função bombeadora do coração depende fundamentalmente do inotropismo ventricular. Assim, possíveis alterações de resposta do tecido ventricular às catecolaminas podem ter um impacto significativo sobre a função circulatória e a pressão arterial.

Observamos a ocorrência de supersensibilidade à NA, acompanhada de redução da resposta inotrópica máxima, nos miócitos de animais expostos ao choque. Esse resultado difere dos observados com relação à resposta cronotrópica em tecido atrial, que mostram mais frequentemente subsensibilidade à NA, sem alteração de  $R_{max}$ , em animais submetidos a diversos procedimentos estressores (SPADARI *et al.*, 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988; CALLIA & DE MORAES, 1984; BASSANI & DE MORAES, 1988; NOURANI *et al.*, 1992; SPADARI *et al.*, 1999). No entanto, Bassani *et al.* (2006) relataram divergência dos efeitos sobre as respostas inotrópicas atrial e ventricular após indução de estresse por imobilização repetida: enquanto átrios esquerdo foram subsensíveis ao ISO, a resposta de miócitos ventriculares a este agonista não foi alterada. O presente estudo também aponta divergência, da qual é possível concluir que não se pode extrapolar diretamente os resultados obtidos em miocárdio atrial para o ventricular. É possível que as diferenças de densidade de inervação simpática e parassimpática em átrios e ventrículos (LONGHURST, 1984) possam contribuir para diferenças na exposição destes tecidos a mediadores autonômicos durante o estresse, o que pode gerar conseqüências funcionais diversas.

Um achado inesperado em miócitos cardíacos de animais sob estresse causado por choque nas patas foi a considerável redução (em torno de 50%) da  $R_{max}$  inotrópica a NA e ISO. Em contraste, não foi observada redução de  $R_{max}$  a agonistas cujo efeito não é mediado por ocupação de  $RA\beta$ , como o  $CaCl_2$  (que promove diretamente aumento da mobilização de  $Ca^{2+}$ ) e IBMX (inibidor de fosfodiesterases que resulta em acúmulo intracelular de AMPc e ativação da PKA, VON DER LEYEN, 1989). Isto indica que as alterações de  $R_{max}$  não parecem estar relacionadas com modificações da resposta contrátil ao  $Ca^{2+}$ , ou de mecanismos pós-receptor da via de transdução  $\beta$ -adrenérgica (i.e., ativação da PKA por AMPc e fosforilação de seus substratos).

O valor de  $pA_2$  do MET foi determinado para análise da população de  $RA\beta$  em miócitos ventriculares que medeia a resposta inotrópica ao ISO. Com este método, também é possível a detecção de heterogeneidade da população de  $RA\beta$ . Para populações homogêneas de receptores, o coeficiente angular da reta de Schild deve ser unitário. Neste caso, o valor de  $pA_2$  pode ser considerado como representativo de  $pK_B$ , logaritmo negativo da constante de dissociação do antagonista (KENAKIN, 1982). Embora o coeficiente angular da reta de Schild não tenha diferido estatisticamente de 1, não é possível descartar heterogeneidade da população de  $RA\beta$  que medeia a resposta inotrópica ao ISO em miócitos de ratos submetidos a choque, uma vez que, em átrios direitos de ratos expostos ao mesmo estressor, foi descrita evidência da participação de  $RA\beta_2$  na mediação da resposta cronotrópica ao mesmo agonista, mesmo com coeficiente angular unitário da reta de Schild (BASSANI & DE MORAES, 1988; BASSANI & BASSANI, 1993). Mais experimentos são necessários para confirmar se há participação expressiva de mais de um subtipo de  $RA\beta$  na resposta inotrópica de miócitos ventriculares.

O valor de  $pA_2$  do MET (resposta inotrópica) obtido no presente estudo em células de animais controles é comparável ao obtido no estudo das respostas cronotrópica e inotrópica em tecido atrial de rato (CALLIA & DE MORAES, 1984; JUBERG *et al.*, 1985; BASSANI & DE MORAES, 1988; BASSANI & BASSANI, 1993). Esta similaridade, que se manteve no grupo choque, nos permite concluir que a resposta inotrópica ao ISO nesta preparação é predominantemente mediada pelo subtipo  $\beta_1$ , e que o estresse por choque nas patas não parece alterar esta característica, ou resultar em alteração conformacional de  $RA\beta_1$  capaz de modificar sua interação com MET. Portanto, não parece plausível supor que a redução na  $R_{max}$  inotrópica a catecolaminas observada em ratos expostos a choque nas patas possa ser atribuída a este tipo de alteração molecular.

Um aspecto, ainda não examinado previamente em outros estudos, foi a influência do estresse sobre a resposta miocárdica aos efeitos pró-arrítmicos das catecolaminas. Como já descrito na introdução deste trabalho, o RS libera  $Ca^{2+}$  não apenas durante a sístole, mas também durante a diástole, embora a uma taxa consideravelmente menor (BASSANI & BASSANI, 2003). O  $Ca^{2+}$  liberado durante a diástole pode retornar à organela pela ATPase de  $Ca^{2+}$  ou ser extruído pelo NCX (BASSANI & BERS, 1995). O transporte de  $Ca^{2+}$  pelo NCX é eletrogênico e gera uma corrente de entrada despolarizante que pode resultar em disparo de PA espontâneo (SCHLOTTHAUER & BERS, 2000) e arritmia (LAKATTA, 1992). Quando o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS atinge níveis críticos pode ocorrer grande liberação espontânea do íon, propagada na forma de ondas de  $Ca^{2+}$ , mesmo na ausência de despolarização da membrana, caracterizando a liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pela sobrecarga de  $Ca^{2+}$  (JIANG *et al.* 2004).

Zygmunt *et al.* (1998) demonstraram que o agonista de  $RA\beta$  ISO pode induzir o aparecimento de pós-despolarizações tardias e atividade disparada em miócitos ventriculares de cão, como resultado da ativação de uma corrente de entrada carregada pela NCX. Além disso, há indicação de que, sob estimulação simpática prolongada, pode

ocorrer hiperfosforilação dos receptores de rianodina, o que leva à desestabilização dos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS e aumento do “vazamento” diastólico de  $\text{Ca}^{2+}$  da organela (MARX *et al.*, 2000; BASSANI & BASSANI, 2003). A ação de agonistas  $\beta$  adrenérgicos envolve aumento da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  e captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. A via de sinalização associada à ocupação de  $\text{RA}\beta$  resulta no aumento da síntese de AMPc e conseqüente ativação da PKA que fosforila diversas proteínas envolvidas na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  celular. A ativação da PKA pode promover o desenvolvimento de arritmias por favorecer a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, tanto pelo aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais tipo L do sarcolema, quanto pelo aumento da velocidade de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pela ATPase do RS, devido à fosforilação do fosfolamban. Quando fosforilado, o fosfolamban se dissocia da ATPase, o que resulta no aumento da taxa de transporte de íon (BERS, 2001). Como resultado, há aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS e, em conseqüência, aumenta-se a taxa da liberação diastólica do  $\text{Ca}^{2+}$  (SHANNON *et al.*, 2002).

No presente trabalho, observou-se que ambos agonistas, NA e ISO, foram mais efetivos em induzir atividade espontânea diastólica em miócitos de ratos submetidos a choque nas patas, como visto pelo aumento dos valores de  $R_{\text{max}}$  e/ou  $\text{pD}_2$ . Como os efeitos inotrópico e pró-arrítmico foram medidos nas mesmas células, é possível observar a existência de uma relação aparente entre estes efeitos. Por exemplo, a resposta inotrópica absoluta é bastante semelhante em ambos os grupos (controle e choque) até as concentrações de 10 e 30 nM de ISO e NA, respectivamente. A partir destas concentrações, a resposta inotrópica sofre um aumento marcante no grupo controle, mas não nas células de ratos submetidos ao choque, nas quais ocorre saturação da resposta. É curioso que estas concentrações sejam próximas aos valores de  $\text{EC}_{50}$  da resposta arrítmica no grupo choque, e que nelas tenha sido observada atividade espontânea consideravelmente maior do que no grupo controle (observe-se que não foram detectadas diferenças na atividade espontânea basal destes grupos). Dadas estas observações, uma

possibilidade a ser explorada seria que a menor  $R_{max}$  a catecolaminas em miócitos do grupo choque não seria causada por alteração da resposta da via de sinalização acoplada a  $RA\beta$  na estimulação do inotropismo, mas pela própria exacerbação do efeito arritmogênico dos agonistas, que limitaria o desenvolvimento da resposta inotrópica nestas células na presença de concentrações maiores dos agonistas. A liberação diastólica exacerbada de  $Ca^{2+}$  pode prejudicar o desenvolvimento do efeito inotrópico. Se o RS liberar muito  $Ca^{2+}$  durante a diástole, pode haver prejuízo da liberação sistólica, seja pela redução do conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS, ou pelo fato dos canais permanecerem parcialmente refratários (TER KEURS & BOYDEN, 2007). No caso da NA, esta limitação poderia ter levado a uma superestimativa dos valores  $pD_2$ , devida não a um verdadeiro aumento da sensibilidade ao agonista, mas a uma interrupção precoce do desenvolvimento de seu efeito inotrópico.

É interessante observar que agonistas como  $CaCl_2$  e IBMX, para os quais não foi observada alteração de  $R_{max}$  inotrópica, exerceram efeito pró-arrítmico semelhante em células de ambos os grupos. Estes resultados reforçam a associação entre reatividade pró-arrítmica e resposta inotrópica máxima. Além disso, eles sugerem que o aumento da resposta pró-arrítmica a catecolaminas em consequência do estresse não parece envolver alteração dos mecanismos celulares recrutados pelo aumento intracelular de AMPc (e.g., ativação e ação da PKA), ou diferenças intrínsecas na susceptibilidade a atividade espontânea dependente de  $Ca^{2+}$  (e.g., atividade do canal de  $Ca^{2+}$  do RS). Há evidência que aponta um importante papel dos  $RA\beta_1$  tanto na produção de efeito inotrópico, quanto na indução de atividade espontânea por catecolaminas em miocárdio atrial e ventricular (BOER, 2006). No entanto, ausência de envolvimento da PKA no aumento da liberação diastólica de  $Ca^{2+}$  do RS causado pela ativação de  $RA\beta_1$  por catecolaminas foi recentemente relatado por Curran *et al.* (2007) em miócitos cardíacos isolados.

O bloqueio de  $RA\beta_1$  pelo MET produziu o efeito típico e esperado, de desviar à direita a CCE ao ISO em ambos os grupos, mas também causou um efeito curioso apenas no grupo choque: elevação da  $R_{max}$  inotrópica, tornando-a semelhante àquela registrada no grupo controle. Este resultado parece um tanto paradoxal, visto que  $RA\beta_1$  são considerados os principais receptores que medeiam a ação inotrópica das catecolaminas do miocárdio (BERS, 2001). No entanto, observamos que MET reduziu em 40% a  $R_{max}$  arritmica e aboliu a supersensibilidade ao ISO no grupo choque, revertendo assim a maior reatividade à ação pró-arritmica do ISO observada neste grupo na ausência do antagonista. Mais uma vez, portanto, manifestou-se uma relação entre estes dois tipos de resposta. A abolição da hiper-reatividade ao ISO, em termos de atividade espontânea, pelo MET está de acordo com os resultados de Boer (2006), que identificou um efeito anti-arritmico deste bloqueador em miocárdio isolado de rato, e com o relato de Curran *et al.* (2007), que observaram que o efeito do ISO em aumentar a taxa de vazamento diastólico de  $Ca^{2+}$  do RS é abolido pelo bloqueio de  $RA\beta_1$ . O aumento da  $R_{max}$  inotrópica pelo MET no grupo choque talvez possa ser interpretado como a eliminação da interferência da excessiva liberação diastólica de  $Ca^{2+}$  do RS sobre o *pool* do íon disponível para contração. Uma possibilidade a ser investigada é um aumento da eficiência, no coração do animal estressado, da via bioquímica que acopla a ocupação de  $RA\beta_1$  e o vazamento de  $Ca^{2+}$  do RS. No entanto, pouco ainda se sabe sobre esta suposta via.

A resposta inotrópica à NA nos grupos controle e choque não foi afetada significativamente pelo bloqueio de  $RA\alpha_1$  por PRZ, o que confirma a baixa participação destes receptores nesta resposta em miócitos ventriculares de rato (BOER, 2006) e indica não envolvimento deste tipo de receptores nas alterações de resposta inotrópica observadas em miócitos de ratos do grupo choque. O tratamento com PRZ reverteu o aumento da  $R_{max}$  arritmica induzido pelo estresse, embora células de ratos do grupo

choque tenham permanecido supersensíveis à NA (efeito pró-arrítmico) na presença do antagonista. Este resultado sugere uma influência pró-arrítmica de  $RA\alpha_1$ . Tem sido proposto que o efeito pró-arrítmico mediado por estes receptores em fibras de Purkinje caninas ocorra por inibição da corrente retificadora de entrada de  $K^+$  ( $I_{K1}$ ) (SOSUNOV *et al.*, 2004). A  $I_{K1}$  é importante para a estabilidade do potencial de membrana de repouso. A redução da densidade de  $I_{K1}$  produz despolarização diastólica de membrana, prolongamento do PA e facilita o aparecimento de pós-despolarizações no miocárdio (POGWIZD *et al.*, 2001; TAMARGO, 2004). No entanto, um resultado intrigante foi a redução da frequência de contrações espontâneas pelo agonista de  $RA\alpha_1$  PHE apenas em células do grupo choque. Este resultado se opõe ao possível papel pró-arrítmico da ativação destes receptores.

O bloqueio de  $RA\beta_2$  reduziu a  $R_{max}$  inotrópica ao ISO somente no grupo controle. Quanto à resposta arrítmica, o antagonista teve um efeito geral de aumento de  $R_{max}$ , como já descrito por Boer (2006), porém o aumento de  $R_{max}$  em células do grupo controle foi praticamente o dobro daquele em miócitos do grupo choque. Como visto anteriormente,  $RA\beta_2$  podem se acoplar tanto a proteínas G com subunidade  $G_s$ , quanto aquelas que contêm  $G_i$ . Com isso, a estimulação de  $RA\beta_2$  parece desencadear uma resposta mais compartimentalizada nos microdomínios do sarcolema e não leva à fosforilação de proteínas intracelulares (tais como o fosfolamban) e, conseqüentemente, não causa aumento da carga de  $Ca^{2+}$  do RS (XIAO *et al.*, 1995). Sosunov *et al.* (2000) encontraram aumento na incidência de atividade disparada induzida por ISO em coração de cães na presença de ICI 118551 (antagonista seletivo  $RA\beta_2$ ). Grimm *et al.* (1998) relataram que o bloqueio de  $G_i$  por toxina pertússica (PTX) potencializa o efeito arritmogênico do ISO em músculo papilar de ratos. Boer (2006), por sua vez, observou que a arritmogênese por catecolaminas em átrio e ventrículo de ratos envolve RA do

subtipo  $\beta_1$  e que a ativação de  $RA\beta_2$ , além de não ter efeito arritmogênico, atua como antagonista da ação pró-arrítmica  $\beta_1$ .

Por outro lado, somente nos miócitos de ratos do grupo choque a BUT reduziu a sensibilidade ao ISO na produção de atividade espontânea, abolindo assim a supersensibilidade observada na ausência do antagonista. É possível que isto possa ser explicado por conversão, pelo estresse, da influência dos  $RA\beta_2$  de anti-arrítmica para pró-arrítmica. No entanto, este é um aspecto que requer mais estudo. Por exemplo, foi encontrado aumento da participação de  $RA\beta_2$  nas respostas cronotrópica e inotrópica positivas (que são mediadas com envolvimento de Gs) do tecido atrial de ratos estressados (CALLIA & DE MORAES, 1984; BASSANI & DE MORAES, 1988; BASSANI & BASSANI, 1993; VANDERLEI *et al.*, 1996; MOURA, 2002). Não se pode descartar a possibilidade de que o acoplamento de  $RA\beta_2$  ventriculares com proteínas G contendo Gs esteja aumentado e/ou tenha ocorrido redução de acoplamento com proteínas que contêm Gi. É importante ressaltar que, durante bloqueio do  $RA\beta_2$ , os valores de  $R_{max}$  e  $pD_2$  do ISO, tanto para o efeito inotrópico quanto para o efeito arritmogênico, se tornaram comparáveis em células dos grupos controle e choque. Isto sugere fortemente que as alterações encontradas em resposta ao choque nas patas envolvam modificações da função de receptores deste subtipo e/ou das vias a eles acopladas.

Deve-se notar que os efeitos do estresse sobre a resposta a catecolaminas em miócitos ventriculares parece ser altamente dependente da natureza da situação geradora de estresse. Resultados deste laboratório apontam supersensibilidade ao efeito inotrópico do ISO, associada a aumento de  $R_{max}$  arrítmica, em células de ratos durante a fase aguda de adaptação a sobrecarga de pressão arterial (CARVALHO *et al.*, 2006), enquanto que nenhuma alteração da resposta inotrópica foi detectada em miócitos ventriculares de ratos submetidos a imobilização repetida por 3 dias (BASSANI *et al.*, 2006).

Em conclusão, nossos resultados indicam que o estresse por choque nas patas, além de reduzir a eficácia aparente de catecolaminas em estimular o inotropismo, causa aumento da reatividade de miócitos ventriculares de rato ao efeito pró-arrítmico destes agonistas. Os resultados sugerem uma relação causal entre estas alterações de resposta a catecolaminas.

## 6. CONCLUSÕES

- Observou-se uma considerável redução na resposta inotrópica mediada por catecolaminas em miócitos ventriculares isolados de ratos submetidos a choque nas patas.

- Catecolaminas são mais efetivas em induzir atividade espontânea diastólica em miócitos de ratos submetidos a choque nas patas.

- Propõe-se a existência de uma relação entre essas duas alterações, ou seja, que a liberação diastólica de  $Ca^{2+}$  exacerbada possa prejudicar o desenvolvimento do efeito inotrópico das catecolaminas.

- A maior reatividade ao efeito arritmogênico e a menor eficácia inotrópica aparente das catecolaminas em miócitos de ratos submetidos a choque nas patas não parecem envolver alterações significativas da conformação de  $RA\beta_1$ , mecanismos pós-receptor da via de transdução  $\beta$ -adrenérgica (ação da PKA) ou a resposta à maior mobilização de  $Ca^{2+}$ .

- Os presentes resultados sugerem um papel de ambos os subtipos  $RA\beta_1$  e  $RA\beta_2$  na mediação dessas alterações em miócitos de ratos submetidos a choque nas patas. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Akers WS, Cross A, Speth R, Dwoskin LP, Cassis LA. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure overload hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H2797-806, 2000.

American Heart Association. [www.americanheart.org](http://www.americanheart.org), 2007

Arunlakshana O & Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14: 48-58, 1959.

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

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

Bassani RA & De Moraes S. Effect of repeated footshock on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 316-321, 1988.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  transport reduce  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  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, 1994.

Bassani RA & Bers DM. Rate of diastolic  $Ca^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 68: 2015-2022, 1995.

Bassani JWM, Yuan WL, Bers DM. Fractional SR  $Ca^{2+}$  release is regulated by trigger  $Ca^{2+}$  and SR  $Ca^{2+}$  content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 268: C1313-C1319, 1995.

Bassani RA, Bassani JWM, Lipsius SL, Bers DM. Diastolic  $Ca^{2+}$  efflux in atrial pacemaker cells and  $Ca^{2+}$ -overloaded myocytes. *Am. J. Physiol.* 273: H886-H892, 1997.

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, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  reloading in mammalian ventricular myocytes. *J. Physiol.* 559: 591-607, 2004.

Bassani RA, Silveira AC, Boer DC, Vieira ESO. Subsensibilidade adrenérgica após *stress* por imobilização repetida ocorre em miocárdio atrial, mas não ventricular. *XXI Reunião Anual da FeSBE*. Águas de Lindóia, SP (Anais, p.135), 2006.

Bassani RA & Bassani JWM. Papel do  $Ca^{2+}$  na geração de arritmias cardíacas: quando a hierarquia é subvertida. *Rev. Soc. Cardiol. Est. SP.* 5: 693-706, 2003.

Bers D. M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2<sup>nd</sup> ed., Dordrecht: Kluwer Press, 2001. 427p.

Boer DC. *Arritmogênese por Catecolaminas em Miocárdio Atrial e Ventricular de Ratos: Metodologia e Tipos de Adrenoceptores Envolvidos*. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2006.

Boer DC & Bassani RA. Quantitation of the dose-response relationship for arrhythmogenic agents in isolated cardiac tissue. *Rev. Bra. Eng. Biom.* 20: 3-10, 2004.

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ. Res.* 88: 1254-58, 2001.

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

Brodde OE.  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.* 43: 203-242, 1991.

Brodde OE & Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* 51: 651-681, 1999.

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.

Cannon WB. *The Wisdom of the Body*. New York. Norton, 228 p, 1939.

Capaz FR & De Moraes S. Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 147: 295-298, 1988.

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

Carvalho BM, Bassani RA, Franchini KG, Bassani JW. Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload induced hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H1803-1813, 2006.

Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR.  $\beta$ -Adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.*100:391-398, 2007.

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.*68:1179-1190, 1991.

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

Goldstein DS. Catecholamines and stress. *Endocr. Regul.* 37: 69-80, 2003.

Gomes PAP. *Aplicação de Técnicas de Engenharia no Estudo de Células Cardíacas Isoladas: Medição de  $[Ca^{2+}]_i$  e Limiar de Estimulação*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 1997.

Gomes PAP, Godoy CMG, Marcon R, Bassani RA, Bassani JWM. Projeto, construção e testes de um sistema de microscopia de fluorescência para medição de cálcio intracelular. *IV Forum Nacional de Ciência e Tecnologia (XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica)*. Curitiba, PR. Anais, pp. 41-42, 1998.

Grimm M, Gsell S, Mittmann C, Nose M, Scholz H, Weil J, Eschenhagen T. Inactivation of  $G_{i\alpha}$  proteins increases arrhythmogenic effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 1917-1928, 1998.

Guyton AC. Coração. In: *Fisiologia Humana*. Guanabara Koogan 9<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro, RJ, p. 97-142, 1996.

Hastings MH. Neuroendocrine rhythms. *Pharmacol. Therap.* 50: 35-71, 1991.

Jiang D, Xiao B, Yang D, Wang R, Choi P, Zhang L, Cheng H, Chen SRW. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced  $Ca^{2+}$  release (SOICR). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (35): 13062-13067, 2004.

Juberg EN, Minneman KP, Abel PW. Beta 1- and beta 2- adrenoceptor binding and functional responses in right and left atria of rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 330: 193-202, 1985.

Kenakin TP. The Schild regression in the process of receptor classification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 36: 165-222, 1982.

Lakatta EG. Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in the heart. *Cardiovasc. Res.* 26(3): 193-214, 1992.

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown Jr TG. Differentiation of receptor systems activated 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.

Lefkowitz RJ & Caron MG. Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* 43: 469-497, 1987.

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

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278: H769-79, 2000.

Longhurst JC. Cardiac receptors: their function in health and disease. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 27: 201-222, 1984.

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

McClellan GB & Winegrad S. The regulation of the calcium sensitivity of the contractile system in mammalian cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 72: 737-764, 1978.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 74: 365-507, 1994.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 33 :171-179, 1998.

Moura AL. *Sensibilidade a Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos em Átrio Esquerdo Isolado de Ratos Submetidos a Estresse*. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

Nourani FRR, Spadari RC, De Moraes S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.* 23: 787-791, 1992.

Onaran HO, Costa T, Rodbard D. Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol. Pharmacol.* 43:245-256, 1993.

Paré WP & Redei E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.* 54: 1179-1185, 1993.

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* 88:1159-1167, 2001.

Ramey ER & Goldstein MS. The adrenal cortex and the sympathetic nervous system. *Physiol. Rev.* 37: 155-195, 1957.

Ricardo RA. *Atividade contrátil e mobilização de cálcio em miócitos ventriculares na presença de solução hiperosmótica de NaCl*. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2005.

Riegle GD. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology.* 11: 1-10,1973.

Santos IN. *Receptores de Glicocorticóides e Subtipos de Adrenoceptores  $\beta$  em Átrio Direito de Ratos Submetidos a Estresse*. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2002.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55-89, 2000.

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

Selye H. Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 138, n. 1, p. 32, 1936.

Selye H. *The Stress of Life*. New York, McGraw-Hill, 1956.

Sgoifo A, Koolhaas J, De Boer S, Musso E, Stilli D, Buwalda B, Meerlo P. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 915-923, 1999.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Potentiation of fractional SR  $\text{Ca}^{2+}$  release by total and free intra-SR  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Biophys. J.* 78: 334-43, 2000.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak-load relationship. *Circ. Res.* 91: 594-600, 2002.

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

Sosunov EA, Gainullin RZ, Moise NS, Steinberg SF, Danilo P, Rosen MR.  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptor subtype effects in German shepherd dogs with inherited lethal ventricular arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 48: 211-9, 2000.

Sosunov EA, Obreztchikova MN, Anyukhovskiy P, Moise NS, Danilo P, Robinson RB, Rosen MR. Mechanisms of  $\alpha$ -adrenergic potentiation of ventricular arrhythmias in dogs with inherited arrhythmic sudden death. *Cardiovasc. Res.* 61:715-723, 2004.

Spadari RC, Bassani RA, De Moraes S. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. *Gen. Pharmacol.* 19: 129-135, 1988.

Spadari RC & De Moraes S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmacol.* 19: 553-557, 1988.

Spadari RC & De Moraes S. Aging and rat pacemaker sensitivity to beta-adrenoceptor agonists. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 591-594, 1987.

Spadari-Bratfisch RC, Santos IN, Vanderlei LCM, Marcondes FK. Pharmacological evidence for  $\beta_2$ -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77: 1-6, 1999.

Sterling P & Eyer J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *In: Handbook of life stress, cognition and health*, Ed. Wiley, New York, p. 629-649, 1988.

Tallarida RJ, Cowan A, Adler MW.  $pA_2$  and receptor differentiation: a statistical analysis of competitive antagonism. *Life Sci.* 25: 637 – 654, 1979.

Tallarida RJ. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol. Ther.* 113: 197-209, 2007.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 62: 9-33, 2004.

Ter Keurs HED & Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol. Rev.* 87:457-506, 2007.

Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol. Rev.* 45: 147-175, 1993.

Tsien RW. Cyclic AMP and contractile activity in heart. *Adv. Nucl. Res.* 8: 363-420, 1977.

Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC. Mechanisms of calcium channel modulation by  $\beta$ -adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18: 691-710, 1986.

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.

Van Rossum JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch. Inter. Pharmacodyn.* 143: 229-330, 1963.

Vogel WH & Jensch R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci. Lett.* 87: 183-188, 1988.

Von Der Leyen H. Phosphodiesterase inhibition by new cardiotonic agents: mechanisms of action and possible clinical relevance in the therapy of congestive heart failure. *Klin. Wochenschr.* 67: 605-15, 1989.

Weber MA. The role of the new  $\beta$  blockers in treating cardiovascular disease. *Am. J. Hypert.* 18: 169-176, 2005.

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

Xiao R, Hohl C, Altschuld R, Jones L, Livingston B, Ziman B, Tantini B, Lakatta EG.  $\beta_2$  -adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269: 19151-19156, 1994.

Xiao R, Ji X & Lakatta EG. Functional coupling of the  $\beta_2$ -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 47: 322–329, 1995.

Zhou YY, Song LS, Lakatta EG, Xiao RP, Cheng H. Constitutive  $\beta_2$ -adrenergic signaling enhances sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  cycling to augment contraction in mouse heart. *J. Physiol.* 2: 351-361, 1999.

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



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 779-1, sobre "RESPOSTA BETA-ADRENÉRGICA EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS SUBMETIDOS A CHOQUE NA PATA" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Rosana A. Bassani / Larissa Barreta Penna está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 779-1, entitled "BETA-ADRENERGIC RESPONSIVENESS IN VENTRICULAR MYOCYTES FROM FOOTSHOCK-STRESSED RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

**CERTIFICADO**

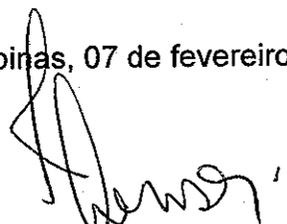
Certificamos que o Protocolo nº 951-1, sobre "**RESPOSTA BETA-ADRENÉRGICA EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS SUBMETIDOS A CHOQUE NA PATA**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Rosana A. Bassani / Larissa Barretta Penna** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07 de fevereiro de 2006.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 951-1, entitled "**BETA-ADRENERGIC RESPONSIVENESS IN VENTRICULAR MYOCYTES FROM FOOTSHOCK-STRESSED RATS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 7, 2006.

Campinas, 07 de fevereiro de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1184-1, sobre "Resposta beta-adrenérgica em miócitos ventriculares de ratos submetidos a choque na pata", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Rasana A. Bassani / Larissa B. Penna, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 19 de dezembro de 2006.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1184-1, entitled "Beta-adrenergic responsiveness in ventricular myocytes from footshock-stressed rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 19, 2006.

Campinas, 19 de dezembro de 2006.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva