

Universidade Estadual de Campinas

ANDRÉ LUIZ DE MOURA



**SENSIBILIDADE A AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS EM ÁTRIO
ESQUERDO ISOLADO DE RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>André Luiz de Moura</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>R.C.</i>
--	---

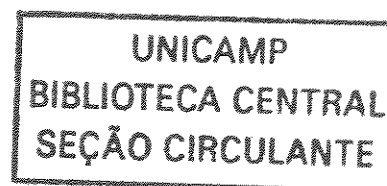
**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dora Maria Grassi-Kassisse

CAMPINAS-SP

2002



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M865s
V	EX
TOMBO BC	52018
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/02/03
Nº CPD	

CM00179064-1

BIB ID 576318

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

M865s **Moura, André Luiz de**
Sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse/André Luiz de Moura. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

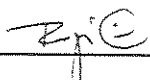
Instituto de Biologia

1.Átrio esquerdo. 2.Beta-adrenoceptor. 3.Estresse. I.Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II.Grassi-Kassisse, Dora Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 25/10/2002

Banca Examinadora

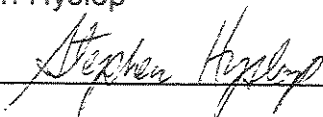
Prof^a. Dr^a. Regina Célia Spadari-Bratfisch (Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Rosana Almada Bassani



Prof. Dr. Stephen Hyslop



Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger

00304336

*Há duas formas para viver a vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

Albert Einstein

DEDICO

*Aos animais, que cederam o mais
grandioso tesouro que um ser vivo pode ter...*

A vida!

À minha família: Nádia, Marcus, João e André Jr.

*Muito obrigado a vocês que compartilharam de todos os bons e maus
momentos que passei durante esta fase de minha vida.*

*Tudo o que passei e que futuramente virei a passar,
foi e será sempre pensando que tenho todos vocês em meu coração.*

Amo a todos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus pais: Jesus Marinho de Moura e
Ziza da Silva Braz Moura,*

*Àqueles, que passaram por muitos maus pedaços na estrada da vida, muitas
noites mal dormidas, e até mesmo por deixarem de fazer o que mais
gostavam para me conceder meus maiores tesouros: vida e educação.*

Meus queridos pais eu os amo muito e muito obrigado por tudo!

*Às minhas orientadoras: Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch e
Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse*

*Professoras, vocês foram minha luz por todo este caminho percorrido,
foram meu suporte nos momentos mais difíceis,
confiaram a mim um pedaço de suas vidas,*

muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos de trabalho,

Alexandre Marcucci Miotto, Elaine Patrícia Maltez de Souza, Elisângela Farias Silva, Fernanda Mariana Tomazini, Iraídes Nunes dos Santos, Juliana de Almeida, Maria Sílvia de Campos, Márcia Carvalho Garcia, Marília Mantovani, Rita de Cássia Ferreira, Rodrigo Gonçalves Dias, Valéria Wolf Nunes.

Dentre este grupo não há este ou aquele que deva receber maior ou menor agradecimentos, pois todos foram esplêndidos amigos de trabalho.

Aos demais amigos,

Aos demais amigos que me acompanharam por todo este tempo deixo-lhes meu muito obrigado e fiquem sabendo que sua companhia foi muito importante para mim.

À FAPESP,

*Agradeço o incentivo e o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo, pois sem seu
apoio seria muito difícil a realização deste trabalho.*

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvi
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
1 Introdução.....	01
2 Objetivos.....	10
3.. Material e método.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Protocolo de estresse.....	11
3.3 Átrio esquerdo isolado.....	14
3.4 Tratamento farmacológico “in vitro”.....	17
3.5 Desnervação “in vitro”.....	17
3.6 Curvas concentração-efeito.....	18
3.7 Regressão linear de Schild.....	19
3.8 Fármacos e reagentes.....	21
3.9 Análise Estatística.....	21
4 Resultados.....	23
4.1 Dados referentes às condições gerais das preparações.....	23
4.2 Resposta inotrópica aos agonistas de β -adrenoceptores.....	23
4.3 Efeitos do ICI118.551 na resposta inotrópica à isoprenalina.....	36
4.4 Efeitos do CGP20712A na resposta inotrópica à isoprenalina e noradrenalina.....	36
4.5 Resposta inotrópica à isoprenalina em presença de ICI118.551 e de CGP20712A.....	44
5 Discussão.....	48

6 Conclusões.....	54
7 Referências bibliográficas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – adenilil ciclase

AMPc – monofosfato cíclico de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

BRL37344 – ácido (R*,R*)-(±)-4-[2-(2-(3-clorofenil)-2-hidroxietil)amino]propil]
fenoxiacético, sal sódico

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CGP12177 – hidrocloreto 4-[3-[(1,1-dimetil)amino]2-hidroxipropoxi]-1,3-dihidro-2H-
benzimidazol-2-ona

CGP20712A – metanosulfonato de (±)-2-hidroxi-5-[2-[[2-hidroxi-3[4-[1-metil-4-
(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]fenoxi]propil]amino]etoxi]-benzamida

CO – ratos controle

GDP – difosfato de guanosina

gf – grama-força

Gi – proteína G inibitória

GMPc –monofosfato cíclico de guanosina

Gs – proteína G estimulatória

GTP – trifosfato de guanosina

ICI118.551 – hidrocloreto de (±)-1-[2,3-(dihidro-7-metil-1H-inden-4-il)oxi]-3-[(1-
metil)amino]-2-butanol

ISO – isoprenalina

mN - miliNewton

NA - noradrenalina

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PKA – proteína quinase A

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR – reação de cadeia polimerase transcriptase reversa

ST – ratos submetidos a estresse por choque nas patas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Tensão inicial (T_i), resposta inotrópica positiva máxima (R_{max}) e pD_2 dos agonistas de β -adrenoceptores na ausência de antagonistas em átrio esquerdo isolado de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.....24
- Tabela 2** - Tensão inicial (T_i), resposta inotrópica positiva máxima (R_{max}) e pD_2 da noradrenalina em átrios esquerdos isolados de ratos controle e ratos submetidos a estresse por choques nas patas tratados ou não *in vitro* com 6-hidroxidopamina.....28
- Tabela 3** - Tensão inicial (T_i), resposta inotrópica positiva máxima (R_{max}) e pD_2 da isoprenalina na ausência e na presença de antagonistas de β -adrenoceptores em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.....37
- Tabela 4** - Tensão inicial (T_i), resposta inotrópica máxima (R_{max}) e pD_2 da noradrenalina na ausência e na presença de antagonistas de β -adrenoceptores em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.....39
- Tabela 5** - pK_B do CGP20712A, coeficientes angulares (α), com os intervalo de confiança de 95% (I.C.), coeficientes de correlação (r^2) e valores de p do slope (p) das retas de regressão de Schild em átrio esquerdo de ratos controle e ratos submetidos a estresse por choque nas patas, utilizando isoprenalina (ISO) ou noradrenalina (NA) como agonistas.....45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de um rato sendo submetido ao protocolo de estresse por choque nas patas.....	13
Figura 2 - Preparação de átrio esquerdo em cuba para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit.....	16
Figura 3 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.....	25
Figura 4 - Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choques nas patas, (A) não desnervados e (B) submetidos ao processo de desnervação simpática com 6-hidroxidopamina.....	27
Figura 5 - Curvas concentração-efeito ao TA-2005 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choques nas patas.....	29
Figura 6 - Registro de curvas concentração-efeito à isoprenalina (A) e TA- 2005 (B, C) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choques nas patas. As setas indicam o momento da aplicação e os números indicam a concentração molar do agonista, V indica a velocidade do papel de registro e t o tempo entre a aplicação de cada dose e Ti indica a tensão inicial antes da obtenção das curvas concentração-efeito sob os estímulos elétricos (2 Hz, 5 ms e voltagem 20% acima do limiar). Note que em C nas três primeiras concentrações de TA-2005 ocorre diminuição da tensão inicial.....	31
Figura 7 - Curvas concentração-efeito ao BRL37344 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (B). Ampliamos a resposta inotrópica negativa observada em concentrações nanomolares de BRL37344 (A).....	32
Figura 8 - Curvas concentração-efeito ao CGP12177 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.....	34

- Figura 9** - Registro de frequência desenvolvida por átrios esquerdos isolados de ratos controle durante as curvas concentração-efeito da isoprenalina e do CGP12177 (**A** e **B**, respectivamente) e em átrio esquerdo isolado de rato submetido a estresse por choque nas patas (**C**) onde o CGP12177 foi o agonista; T_i indica a tensão inicial antes da obtenção das curvas concentração-efeito sob os estímulos elétricos (2 Hz, 5 ms e voltagem 20% acima do limiar); V é a velocidade do papel.....35
- Figura 10** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) na presença e na ausência de antagonista ICI118.551 (50 nM), (**A**) em átrios esquerdos isolados de ratos controle (CO) e (**B**) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (ST).....38
- Figura 11** - Curvas concentração-efeito da isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos controle (**A**) na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild (**B**).....40
- Figura 12** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (**A**) na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild (**B**).....41
- Figura 13** - Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos controle (**A**) na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild (**B**)42
- Figura 14** - Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (**A**) na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild (**B**).....43
- Figura 15** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em presença ou ausência de ambos os antagonistas ICI118.551 e CGP20712A nas concentrações de 50 e 10 nM, respectivamente, em átrios esquerdos isolados de ratos controle (**A**) e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (**B**).....47

RESUMO

O estresse por choque nas patas promove supersensibilidade ao efeito cronotrópico positivo da isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos e ratas sacrificadas em diestro, a qual está associada a aumento da proteína do adrenoceptor β_2 naquele tecido. Em átrio direito de fêmeas ocorre também subsensibilidade ao efeito cronotrópico da noradrenalina.

O objetivo deste trabalho é avaliar se a resposta inotrópica a agonistas β -adrenérgicos também é alterada em tecido cardíaco de ratos submetidos a estresse por choque nas patas para ampliar nosso conhecimento da extensão em que a fisiologia cardíaca é alterada pelo estresse.

Utilizamos átrios esquerdos isolados de ratos machos adultos da linhagem Wistar submetidos ou não a três sessões consecutivas de choques nas patas (30 minutos de duração, 120 pulsos aplicados aleatoriamente a intervalos que variavam de 5 a 25 seg; intensidade de 1 mA e duração de 1 seg). Todos os átrios receberam pré-tratamento *in vitro* para inibir os processos de recaptação neuronal e captação extra-neuronal. Em seguida foram obtidas curvas concentração-efeito aos agonistas isoprenalina, na presença ou ausência dos antagonistas CGP20712A, ICI118.551 ou ambos; noradrenalina, na presença ou ausência de CGP20712A; TA-2005; BRL37344 e CGP12177. Analisamos a sensibilidade do tecido aos agonistas (pD_2) e a afinidade dos antagonistas (pK_B). Para determinar se a população de adrenoceptores β é homogênea ou heterogênea, realizamos análise de regressão linear de Schild. Os valores foram expressos como médias $\pm$ erros padrão da média.

Átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse quando comparados aos átrios esquerdos isolados de ratos controle apresentaram supersensibilidade à isoprenalina (pD_2 : $8,44 \pm 0,16$ para controles e $8,85 \pm 0,09$ para estresse, $p < 0,05$; teste t de Student) e sem alteração de sensibilidade à noradrenalina (pD_2 : $8,00 \pm 0,03$ para o grupo controle e $7,83 \pm 0,01$ para o grupo estresse, $p > 0,05$; teste t de Student). Não foi observada diferença de

sensibilidade para os agonistas TA-2005, BRL37344 e CGP12177. A supersensibilidade para isoprenalina foi cancelada pelo antagonista ICI118.551, sendo que os valores pD_2 neste caso foram: $8,43 \pm 0,11$ para o grupo controle e $8,60 \pm 0,11$ para o grupo estresse ($p > 0,05$; teste t de Student). Os valores pK_B do ICI118.551 foram iguais a: $7,19 \pm 0,08$ para o grupo controle e $7,13 \pm 0,31$ para o grupo estresse. Análise de regressão linear de Schild para o antagonismo entre CGP20712A e isoprenalina ou noradrenalina demonstrou que átrios esquerdos isolados de ratos controle e ratos submetidos a estresse apresentam uma população heterogênea de receptores β -adrenérgicos.

Nós concluímos que átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse apresentam supersensibilidade à isoprenalina devido ao aumento da participação dos adrenoreceptores β_2 . A resposta aos demais agonistas não se altera. Esta alteração na sensibilidade à isoprenalina desencadeada pelo estresse é semelhante ao que ocorre em átrio direito e em tecido adiposo de ratos submetidos ao mesmo protocolo de estresse. Estes resultados indicam que não apenas o cronotropismo mas também o inotropismo cardíaco são afetados pelo estresse o que provavelmente resulta em alterações funcionais cardíacas, de caráter adaptativo.

ABSTRACT

Following foot shock stress white adipocytes and right atria from male and right atria from female rats sacrificed at diestrous, are supersensitive to the chronotropic effect of isoprenaline. Right atria from female rats are also subsensitive to noradrenaline. In the present study, we investigated whether the inotropic response to β -adrenergic agonists was altered in cardiac tissue from stressed rats. Left atria isolated from control or stressed male Wistar rats submitted to three 30 min foot shock sessions (120 pulses of 1.0 mA and 1.0 s duration, applied at random intervals of 5-25 s) were mounted in organ baths under a tension of 4.9 mN (0.5 gf) and stimulated with pulses of 2 Hz and 5 ms duration at voltage 20% above threshold. Concentration-response curves were obtained for the β -adrenoceptor agonists isoprenaline, noradrenaline, TA2005, BRL37344 and CGP12177. Curves were also obtained for isoprenaline and noradrenaline in the presence of the selective antagonist CGP20712A (10, 30 and 100 nM), and for isoprenaline in the presence of the antagonist ICI118,551 (50 nM) or both antagonists. The sensitivity to noradrenaline, TA2005, BRL37344 and CGP12177 was unaltered in atria from foot shock stressed rats. The pD_2 for isoprenaline was significantly higher in atria from stressed rats (8.85 ± 0.09) compared to control rats (8.44 ± 0.15 ; $p < 0.05$, Student's *t*-test). Treatment with ICI118,551 (50 nM) abolished this difference (pD_2 in the presence of ICI118,551: 8.43 ± 0.11 and 8.60 ± 0.11 for atria from control and stressed rats, respectively). The pK_B for ICI118,551 was 7.19 ± 0.08 in control atria and 7.13 ± 0.31 in atria from stressed rats ($p > 0.05$, Student's *t*-test). Schild analyses for the antagonism between CGP20712A and isoprenaline or noradrenaline indicated that the β -adrenoceptor population in left atria from control and stressed rats was heterogeneous. We conclude that the supersensitivity of atria from foot shock stressed rats to isoprenaline resulted from an increase in β_2 -adrenoceptor mediated responses. These results were similar to those previously reported for right atria and adipocytes from rats submitted to the same stress protocol and indicate that not only the cardiac chronotropism also the

inotropism was affected by stress what probably causes adaptative alterations in the heart function.

1 INTRODUÇÃO

O conceito de estresse originou-se dos estudos de Selye, que identificou hipertrofia do córtex adrenal em animais experimentais, em resposta a uma variedade de estímulos físicos e psíquicos nocivos. Com base em seus trabalhos, Selye (1956) desenvolveu o conceito de "Síndrome de Estresse" ou "Síndrome Geral de Adaptação", caracterizando-a como uma resposta não específica do organismo frente a estímulos aversivos. Selye (1956) descreve ainda que a Síndrome Geral de Adaptação pode ser dividida em três fases: a fase de alarme ou de excitação que se caracteriza por um aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor e que possibilita a resposta de luta-ou-fuga, posteriormente descrita por Cannon (1939). Com a continuação do estímulo o organismo entra na fase de resistência, caracterizada pela diminuição da capacidade de resposta ao agente causador do estresse e pelo desenvolvimento de mecanismos adaptativos; neste estágio a adaptação se completa através de alterações estruturais dos tecidos e órgãos as quais restauram a homeostase, eliminando o estresse.

O processo adaptativo, segundo Meerson (1984) pode ser ainda subdividido em duas fases distintas; a primeira se caracteriza pela ocorrência de catabolismo, e a segunda, que se desenvolve logo após o término da fase catabólica, é denominada fase anabólica, e se caracteriza por aumento da síntese protéica. A fase adaptativa baseia-se no aumento da massa e da potência das estruturas celulares envolvidas, tais como transporte de íons, suprimento energético e outros.

A fase final, de exaustão, é marcada pela incapacidade de conviver com o agente causador de estresse. Neste ponto o organismo torna-se susceptível às doenças, que podem incluir distúrbios renais, cardiovasculares, gastro-intestinais, imunológicos e outros.

Os sistemas nervoso e endócrino desempenham papéis fundamentais em todas as fases da Síndrome Geral de Adaptação. Como parte do quadro característico desta síndrome, ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-

adrenal, que está envolvido com o aumento das concentrações plasmáticas de hormônios esteróides da adrenal. Estes hormônios atuam sobre o metabolismo no sentido de suprir substratos energéticos aos sistemas envolvidos na resposta de estresse e em praticamente todos tecidos do organismo, incluindo o sistema nervoso central (MEERSON, 1984). Simultaneamente, dá-se a ativação do eixo simpato-adrenal, resultando em aumento das catecolaminas circulantes (EULER et al., 1954).

O sistema alvo periférico das catecolaminas é caracterizado por cinco tipos de receptores de superfície celular (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3) que estão acoplados a diferentes sistemas efetores. A sensibilidade da resposta celular às catecolaminas é dependente do tipo e da proporção de cada tipo de receptor adrenérgico. Esta proporção pode ser controlada por fatores externos como temperatura, ou internos, como a ação de hormônios da tireóide, estrógenos ou glicocorticóides (WILLIAMS et al., 1977; FRASER e VENTER, 1980).

A classificação inicial em adrenoceptores alfa (α) e beta (β) proposta por Ahlquist (1948) baseava-se nas seguintes séries de potências relativas dos agonistas: adrenalina > noradrenalina >> isoprenalina, e isoprenalina > adrenalina > noradrenalina, respectivamente. Subseqüentemente, Lands et al. (1967) propuseram a subdivisão dos receptores β , os quais foram denominados beta-1 (β_1) e beta-2 (β_2), e foram definidos pela potência relativa dos agonistas, adrenalina e noradrenalina e pela afinidade de antagonistas. Para os receptores β_1 , identificados nos tecidos cardíaco e adiposo de mamíferos, estes agonistas apresentavam aproximadamente igual potência e a isoprenalina possuía maior potência que os dois anteriores (isoprenalina > adrenalina = noradrenalina). Entretanto, para os receptores β_2 , localizados no músculo liso da traquéia e dos vasos, a isoprenalina possuía maior potência que a adrenalina e esta apresentava maior potência que a noradrenalina (isoprenalina > adrenalina > noradrenalina; BRODDE e MICHEL, 1999). A concepção vigente, naquela ocasião, era de que somente um subtipo de receptor existia em determinado órgão.

Este conceito de homogeneidade da população de adrenoceptores em um dado órgão persistiu até 1972, quando Carlsson e colaboradores apresentaram

evidências farmacológicas de que ambos os subtipos de receptores adrenérgicos, β_1 e β_2 coexistiam funcionalmente em coração de gato. Com o aparecimento de novas substâncias agonistas e antagonistas, mais seletivas, a caracterização dos subtipos tornou-se mais fácil, comprovando sua heterogeneidade. Em 1979, Minneman e colaboradores sugeriram que em coração de ratos 83% da população de adrenoceptores era do subtipo β_1 e 17% do subtipo β_2 , enquanto que Juberg et al. (1985) detectaram em átrio direito de ratos 67% de adrenoceptores β_1 e 33% de β_2 . Em corações humanos, a razão entre β_1 - e β_2 -adrenoceptores está por volta de 60 a 70%:40 a 30%, respectivamente (BRODDE, 1991). Desta forma, verificou-se que no coração de mamíferos como gato, rato, porco da Índia, cães e humanos, os receptores β_1 e β_2 coexistem (MOLENAAR e SUMMERS, 1987; MONTE et al., 1993; KAUMANN, 1997).

Apesar de serem genética e estruturalmente diferentes ambos os subtipos de adrenoceptores, β_1 e β_2 , promovem aumento da força, da frequência e da velocidade de relaxamento do músculo cardíaco quando estimulados por agonistas. Estes efeitos são promovidos através de estimulação do sistema adenilil ciclase (AC), cuja ativação eleva a concentração intracelular de um segundo mensageiro, o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina; EMORINE et al., 1987; LEFKOWITZ e CARON, 1984; BALLIGAND, 1999). O acoplamento do adrenoceptor β à AC resulta na ativação de uma proteína G estimulatória (Gs). Esta proteína Gs é constituída de três subunidades (α , β e γ) sendo que a porção catalítica é a subunidade α . Em estado de repouso, a subunidade α está ligada a uma molécula de difosfato de guanosina (GDP). Desta forma, quando o complexo hormônio-receptor acopla-se ao complexo trimérico da proteína Gs, ocorre a troca de GDP ligado à subunidade α por GTP (trifosfato de guanosina) fazendo com que a subunidade α se dissocie do complexo trimérico e, associe-se à AC que converte o ATP em AMPc (ROBISON et al., 1967; MONTE et al., 1993; ONARAN et al., 1993; JOHNSON, 1998). O AMPc, por sua vez, liga-se a uma proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual passa a fosforilar um grande número de outras moléculas intracelulares: canais de Ca^{+2} tipo L, fosfolambam, troponina

I, inibidores da fosfodiesterase e canais de K^+ (CHIU et al., 1993; COOK et al., 1993; CLAPHAM, 1994; KAUMANN e MOLENAAR, 1997; KUSCHEL et al., 1999).

Até há pouco tempo, acreditava-se que o papel funcional do adrenoceptor β_2 em tecido cardíaco era pouco relevante, uma vez que o subtipo β_1 representava a imensa maioria dos adrenoceptores presentes naquele tecido.

Recentemente, surgiram evidências de que em miócitos cardíacos de roedores e em células HEK293 transfectadas, nas quais a superexpressão de adrenoceptores β_2 é provocada, o subtipo β_2 pode desempenhar um papel chave na modulação das funções celulares. Segundo estes estudos, este subtipo de receptor β -adrenérgico se acopla tanto à proteína Gs (proteína G estimulatória) quanto à proteína Gi (proteína G inibitória; DAAKA et al., 1997; KUSCHEL et al., 1999; XIAO et al., 1995, 1999a, 1999b; ZOU et al., 1999). Além disso, o adrenoceptor β_2 humano, mesmo estando em menor porcentagem que o adrenoceptor β_1 , acoplar-se-ia de forma mais eficiente à AC, de modo que a resposta funcional mediada pelo adrenoceptor β_2 não seria necessariamente, diferente daquela mediada pelo adrenoceptor β_1 (BRODDE e MICHEL, 1999). A estimulação de Gi por adrenoceptores β_2 pode ter implicações clínicas importantes, uma vez que, a concentração de Gi está aumentada em tecidos cardíacos de indivíduos idosos e naqueles que apresentam certas condições patológicas, tais como insuficiência e falência cardíaca congestiva (BOHM et al., 1990, 1994a, 1994b, 1995; BRODDE et al., 1995).

Kilts et al. (2000) mostraram que em membranas de miócitos atriais direitos de pacientes com insuficiência cardíaca, outros receptores que também se acoplam à proteína Gs além do adrenoceptor β_2 , podem se acoplar à proteína Gi. Estes incluem os receptores para histamina, serotonina e glucagon. Os efeitos do acoplamento do subtipo β_2 de adrenoceptor à proteína Gi podem ser inibidos por toxina pertussis.

Paralelamente a estas descobertas, surgiram evidências para a existência e função de dois outros subtipos de adrenoceptores β . A existência de um terceiro β -adrenoceptor em tecido cardíaco foi sugerida com base em experimentos com

coração de cobaia e de gato, onde antagonistas não-convencionais com atividade de agonista parcial (pindolol e CGP12177) exibiram propriedade estimulatória quando empregados em concentrações que excederam as concentrações usuais necessárias para bloquear os adrenoceptores β (KAUMANN, 1989). Sugeriu-se que estes efeitos poderiam ser mediados através do subtipo β_3 que havia sido recentemente clonado (EMORINE et al., 1989). Entretanto, os autores propuseram a existência de um quarto subtipo de adrenoceptor, para o qual propuseram a denominação de adrenoceptor β_4 (KAUMANN, 1989, 1997; KAUMANN e MOLENAAR, 1996).

A presença de um adrenoceptor β_3 no coração ainda é objeto de grande discussão. Em estudos realizados por Berkowitz et al. (1995) e Krief et al. (1993) não foi demonstrada a presença de RNAm para o adrenoceptor β_3 em tecido ventricular humano. No entanto, Gauthier et al. (1996) demonstraram através de técnicas de RT-PCR, a presença de RNAm para o adrenoceptor β_3 em cardiomiócitos isolados de septo interventricular direito de coração de pacientes transplantados.

Os mesmos pesquisadores (GAUTHIER et al., 1996) revelaram que em biópsias de tecido ventricular de corações transplantados e na presença de nadolol (antagonista não seletivo para os subtipos β_1 e β_2 de adrenoceptores), o agonista não seletivo isoprenalina em concentrações acima de 1 micromolar, provocou efeito inotrópico negativo. Este efeito também foi obtido com agonistas seletivos para o adrenoceptor β_3 (BRL37344, SR58611 e CL316243). Strosberg (1997) relatou que estes efeitos mediados através da ativação do adrenoceptor β_3 podem ser inibidos por bupranolol (antagonista de adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3), mas não por antagonista seletivo para β_1 (metoprolol) ou pelo não seletivo β_1 e β_2 (nadolol). No entanto, os efeitos provocados pelo BRL37344 foram sensíveis ao tratamento tecidual cardíaco com toxina pertussis (PTX), indicando que em tecido ventricular humano os efeitos mediados pelo adrenoceptor β_3 envolvem a proteína G_i (CHAUDRY et al., 1994). Subseqüentemente, estes mesmos autores relataram que o efeito inotrópico negativo causado pelo BRL37344 e pela noradrenalina na

presença de prazosina (antagonista de α_1 -adrenoceptores) e de nadolol, é mediado por óxido nítrico (NO), formado como consequência da ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial ou tipo III (NOS_e ou NOS₃, respectivamente), isto porque estes efeitos eliciados pelo agonista seletivo para o subtipo β_3 de adrenoceptor (BRL37344) foram abolidos por azul de metileno ou inibidores de NOS (L-NAME ou L-NMMA; GAUTHIER et al., 1998). Contudo, Harding (1997), Kaumann e Molenaar (1997) e Molenaar et al. (1997) não conseguiram demonstrar estes efeitos do BRL37344 em tecido cardíaco humano.

Apesar destas controvérsias sobre a presença do adrenoceptor β_3 em tecido cardíaco, evidências acumulavam-se para a existência do adrenoceptor β_4 (KAUMANN, 1989, 1997; KAUMANN e MOLENAAR, 1996; MALINOWSKA e SCHILECHER, 1996; SARSERO et al., 1998). Este adrenoceptor se acoplaria ao sistema proteína G-adenilil ciclase e teria a capacidade de aumentar os níveis intracelulares de AMPc (KAUMANN e LYNHAM, 1997). Este eliciaria aumento transitório da concentração de cálcio em miócitos ventriculares (KAUMANN e FREESTONE, 1997; FREESTONE et al., 1999), bem como da condutância de canais de potássio em coração de furão (LOWE et al., 1998) provocando arritmias. De acordo com estes autores, a capacidade do CGP12177 em facilitar o aparecimento de arritmias foi cerca de 80% maior do que da isoprenalina. Sarsero et al. (1998) propuseram o uso do (-) CGP12177 como substância radioligante, com seletividade para adrenoceptores β_4 em tecido atrial.

Apesar de estudos funcionais e estudos de “binding” indicarem a existência do adrenoceptor β_4 , surgiram novas evidências de que a resposta originalmente atribuída a este receptor podia ser produzida por interação daqueles agonistas com adrenoceptores do subtipo β_1 . Em fibroblastos de hãmsster geneticamente modificados para expressar apenas o adrenoceptor β_1 humano, o composto CGP12177 atuou como potente agonista. Baseados em um modelo experimental de falência cardíaca produzida por infarto do miocárdio, Kompa e Summers (1999) demonstraram que o adrenoceptor β_4 e o adrenoceptor β_1 sofriam dessensibilização simultânea. Os resultados de Lowe et al. (1999, 2002) também reforçaram a hipótese de que o adrenoceptor β_4 correspondia de fato a um estado

de baixa afinidade do adrenoceptor β_1 e o trabalho de Kaumann et al. (2001) confirmou esta hipótese ao demonstrar que as respostas anteriormente atribuídas ao subtipo β_4 de adrenoceptor não eram eliciadas em camundongos nos quais a expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 foi bloqueada.

Desta forma, acredita-se atualmente que o subtipo β_1 de adrenoceptor pode apresentar-se sob duas formas, uma de alta e outra de baixa afinidade. Além disso, estas isoformas podem apresentar comportamento independente uma vez que em modelos experimentais nos quais ocorre dessensibilização da resposta à noradrenalina mediada pela isoforma clássica do adrenoceptor β_1 , a sensibilidade da resposta ao CGP12177 da isoforma de baixa afinidade é preservada (SANTOS, 2002).

O avanço das técnicas de biologia molecular tornou possível a clonagem do cDNAs (ácido desoxirribonucleico complementar) dos adrenoceptores β_1 (FRIELLE et al., 1987), β_2 (DIXON et al., 1986) e β_3 (EMORINE et al., 1989; COLLINS et al., 1993), os quais subtipos de adrenoceptores são codificados por genes específicos (EMORINE, 1989). Em humanos estes genes estão localizados nos cromossomos 10q24-26, 5q31-32 e 8p11-12, respectivamente (BRODDE e MICHEL, 1999). No entanto ainda não há evidências para o(s) gene(s) que determina(m) a existência do adrenoceptor β_4 .

Apesar da regulação da expressão dos genes que codificam os adrenoceptores β ainda não estar totalmente esclarecida, já está claramente estabelecido que os hormônios esteróides exercem papel regulatório sobre a expressão destes genes. Hormônios como os glicocorticóides podem influenciar a transcrição gênica dos adrenoceptores β , modulando o número de receptores presentes na membrana, ou podem aumentar o acoplamento destes adrenoceptores ao seu sistema efetor (proteína G).

Aumento do número de receptores ativos na membrana pela ação de glicocorticóides foi demonstrado em células DDT₁-MF-2 de camundongos (SCARPACE et al., 1985), células VA₂, VA₄ e WI₃₈ de pulmão humano (FRASER e VENTER, 1980), astrocitomas humanos 132N1 (FOSTER e HARDEM, 1980),

células adiposas 3T3-F442A (FÈVE et al., 1990) e células DDT₁-MF-2 de miosarcoma de canal deferente de hamster (NORRIS et al., 1987).

Os efeitos dos glicocorticóides são mediados pelos receptores de glicocorticóides encontrados no citoplasma de quase todas as células de mamíferos (ROSEWICZ et al., 1988). Como os glicocorticóides possuem característica lipídica, podem difundir-se muito facilmente através da membrana celular. No interior da célula, estes hormônios ligam-se a seus receptores, formando um complexo ativo, que penetra no núcleo, onde liga-se aos elementos de resposta aos glicocorticóides, localizados na sequência promotora do DNA, passando a aumentar ou a diminuir a transcrição gênica (ROSEWICZ et al., 1988; BARNES e ADCOCK, 1993). Alguns locais de ligação desses complexos foram detectados na sequência gênica que codifica os receptores adrenérgicos β (CHUNG et al., 1987; EMORINE et al., 1987).

As alterações da sensibilidade do marca-passo cardíaco de ratos às catecolaminas que ocorrem em resposta ao estresse estão sob a influência da corticosterona (SPADARI e DE MORAES, 1988; NOURANI et al., 1992). Callia e DE Moraes (1984), Bassani e DE Moraes (1988) e Nourani et al. (1992) demonstraram que o estresse pode induzir sensibilização da resposta cronotrópica positiva a agonistas não seletivos de adrenoceptores β , em átrio direito de ratos.

Estudos realizados por Vanderlei et al. (1996) e Spadari-Bratfisch et al. (1999) mostraram que, em átrio direito isolado de ratas submetidas a estresse por choque nas patas e sacrificadas em diestro, houve supersensibilidade para agonistas β -adrenérgicos não seletivos, tais como isoprenalina e adrenalina, e subsensibilidade para noradrenalina, que é um agonista seletivo de adrenoceptores β_1 . Resultados semelhantes foram descritos para tecido adiposo branco (FARIAS-SILVA et al., 1999). Estes autores sugerem que o estresse por choque nas patas induz aumento da expressão do subtipo β_2 de adrenoceptor, o que foi confirmado por resultados recentemente obtidos em nosso laboratório (SANTOS et al., 2002).

No que se refere ao coração, os autores acima avaliaram os efeitos do estresse sobre a população de adrenoceptores β em átrio direito, os quais

modulam o efeito cronotrópico das catecolaminas. Sabemos, entretanto, que o inotropismo é outra variável de fundamental importância na fisiologia cardíaca, e que a ação inotrópica das catecolaminas é mediada pelos mesmos subtipos de adrenoreceptores β , além de adrenoreceptores α (BRODDE e MICHEL, 1999).

Assim sendo, pretendemos, neste trabalho, esclarecer as seguintes questões: haveria alteração da resposta inotrópica aos agonistas β -adrenérgicos, em tecido cardíaco de ratos submetidos a estresse por choque nas patas? O estresse por choque nas patas também altera a relação entre os subtipos β_1 e β_2 de adrenoreceptores em átrios esquerdos de ratos onde não se situa o marca-passo cardíaco e no qual a inervação adrenérgica é menos densa?

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

- Determinar quais subtipos de adrenocetores β participam da resposta inotrópica em átrios esquerdos isolados de ratos.
- Verificar se ocorrem alterações na sensibilidade da resposta inotrópica a agonistas de receptores β -adrenérgicos em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a três sessões de choques nas patas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Utilizamos ratos machos adultos da linhagem Wistar, com idade entre 3 e 4 meses, pesando entre 300 e 400 gramas, os quais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP) e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (30 cm x 16 cm x 19 cm) coletivas, com no máximo cinco animais em cada gaiola, por pelo menos uma semana antes de serem utilizados. A sala apresentava temperatura média de 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas controlado por sistema temporizador, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas. Os animais foram alimentados com ração padrão e água potável, fornecidos *ad libitum*, sendo que não houve nenhuma suplementação alimentar ou hídrica. A limpeza das gaiolas foi realizada três vezes por semana, iniciando-se às 7:00 horas.

3.2 Protocolo de estresse

O trabalho foi desenvolvido sob o consentimento da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (certificado nº 227-1), de acordo com Bassani e DE Moraes (1988).

Os ratos foram submetidos a três sessões, em dias consecutivos, de choques nas patas não sinalizados e inescapáveis, durante aproximadamente 30 minutos, sendo que as sessões de choque ocorriam no período matutino entre 7:30 e 11:00 horas. Os choques foram aplicados ao piso de uma câmara de acrílico (26 cm x 21 cm x 26 cm; Figura 1). Este era constituído de barras cilíndricas de aço inoxidável, com 0,3 cm de diâmetro, espaçadas entre si por 1,0 cm.

Os pulsos elétricos foram aplicados por meio de um sistema de estimulação (fonte de corrente/"scrambler") desenvolvido e construído no Centro de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas. A intensidade da corrente foi de 1,0 mA e a duração de 1,0 segundo. Cada animal recebeu 120 pulsos elétricos, distribuídos a intervalos aleatórios entre 5 e 25 segundos, com um intervalo médio de 15 segundos. Ao final de cada sessão, o rato retornou à sua gaiola moradia e, imediatamente após a última sessão de choques, foi sacrificado.

Resultados anteriores mostraram que este protocolo experimental resulta em aumento da concentração plasmática de glicose e de corticosterona, o que permite caracteriza-lo como causador de estresse (MARCONDES et al., 1996; VERAGO et al., 2001)



Figura 1 – Foto de um rato sendo submetido ao protocolo de estresse por choque nas patas.

3.3 Átrio Esquerdo Isolado

Os ratos foram sacrificados por um golpe na cabeça e imediata secção dos vasos cervicais. O tórax foi aberto por uma incisão no Esterno, o coração foi rapidamente removido e transferido para um recipiente contendo solução de Krebs-Henseleit, aquecido e gaseificado com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). O átrio esquerdo foi isolado e preparado para registro isométrico de suas contrações, as quais foram induzidas por estimulação elétrica através de um eletrodo bipolar de platina, ligado a um estimulador elétrico (Grass Instruments modelo S88, MA, USA). Os estímulos elétricos que foram aplicados ao tecido tinham as seguintes características: 5 ms de duração, frequência de 2 Hz e intensidade 20% acima do limiar de excitação do tecido (BLINKS, 1965; KAUMANN e MOLENAAR, 1996). A preparação foi submetida a uma tensão diastólica de 4,9 mN ou 0,5 gf, até o fim do período de estabilização, que foi de aproximadamente 45 minutos. Foram descartados os átrios que apresentaram irregularidades tais como arritmias ou ausência de resposta aos estímulos elétricos ou que não estabilizaram a tensão desenvolvida nos primeiros 60 minutos de incubação.

As preparações foram montadas em uma cuba para órgão isolado (Figura 2), contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl, 115,0; KCl, 4,6; CaCl₂.2H₂O, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O, 12,4; NaHCO₃, 25,0; glicose, 11,0 e ácido ascórbico, 0,11. O ácido ascórbico foi adicionado para reduzir a oxidação das catecolaminas durante a obtenção das curvas concentração-efeito. O líquido de incubação foi mantido a 36,5 ± 0,1 °C com auxílio de uma bomba de perfusão (Ética, Equipamentos Científicos S.A., SP, Brasil) e saturado com mistura carbogênica. Para o registro das contrações utilizamos um transdutor isométrico de tensão Narco Bio-System (modelo F-60), conectado a um polígrafo de 4 canais Narco Bio-System (modelo DMP-4, Houston, Tx, USA).

Obtivemos curva comprimento-tensão para determinar o comprimento ótimo de cada átrio, ou seja, o comprimento em que o músculo atrial desenvolvesse

máxima tensão. Esta curva comprimento-tensão foi obtida cerca de 20 minutos antes do início da obtenção da curva concentração-efeito ao agonista de adrenoceptores. Este tempo foi suficiente para que a tensão desenvolvida se tornasse estável.

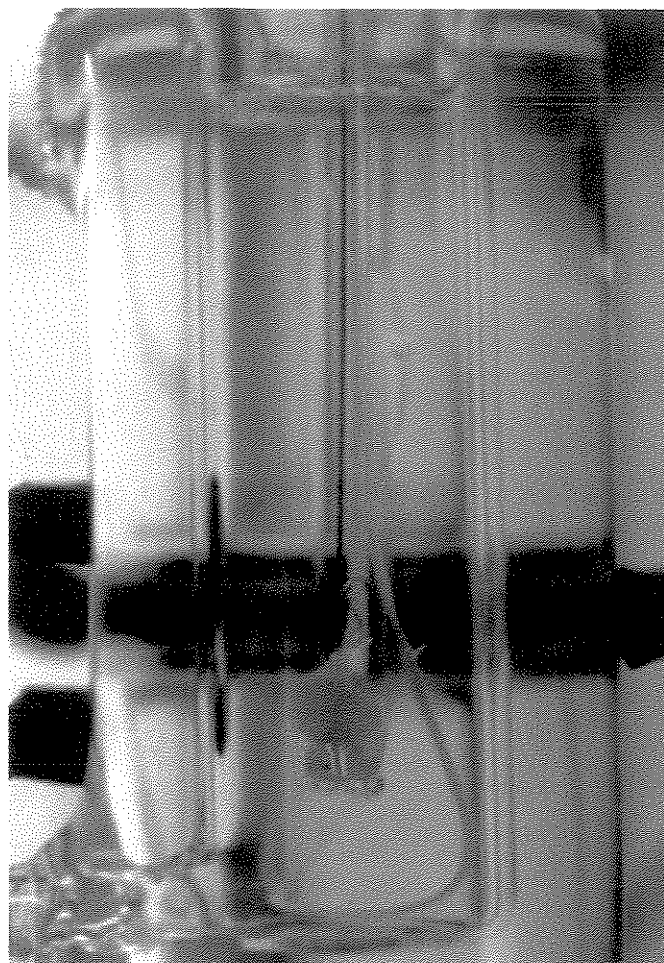


Figura 2 – Preparação de átrio esquerdo em cuba para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit.

3.4 Tratamento farmacológico *in vitro*.

Antes da obtenção das curvas concentração-efeito, todas as preparações foram submetidas a tratamento farmacológico *in vitro*. Fenoxibenzamina (10 μ M) foi adicionada às preparações para promover a inibição do sistema de captação extra-neuronal, recaptação neuronal (IVERSEN e SALT, 1970; IVERSEN et al., 1972), bloqueio dos adrenoreceptores α (BESSE e FURCHGOTT, 1976) e dos receptores colinérgicos muscarínicos (FURCHGOTT e BURSZTYN, 1967). A fenoxibenzamina ficou em contato com a preparação por 15 minutos e, após esse período, a solução de Krebs-Henseleit foi substituída, a cada 10 minutos, até que a tensão desenvolvida pelo tecido estabilizasse.

Para garantir o bloqueio do processo de captação extra-neuronal, após a estabilização das contrações, corticosterona (IVERSEN e SALT, 1970; BONISCH e TRENDELENBURG, 1974) foi adicionada às preparações, na concentração de 10 μ M, 15 minutos antes da realização da curva concentração-efeito. Este inibidor permaneceu em contato com a preparação durante a realização da referida curva concentração-efeito.

Para garantir inibição do sistema de recaptação neuronal, desipramina (10 μ M) foi adicionada ao líquido de incubação (SALT, 1972), após o tratamento descrito acima, 15 minutos antes do início da curva concentração-efeito, sendo que esta permaneceu em contato com o tecido durante a obtenção da curva.

3.5 Desnervação *in vitro*

Para avaliarmos se as preparações sofriam alguma influência da liberação de catecolaminas endógenas, realizamos uma série de experimentos em que o tecido atrial passou por um processo de desnervação *in vitro* com 6-hidroxidopamina (10 μ M) em solução de Krebs modificado (não tamponado), que confere pH ácido (CALLIA e DE MORAES, 1984).

As preparações foram montadas em Krebs modificado e após o período de estabilização, receberam o tratamento com 6-hidroxidopamina durante 15 minutos. Decorrido este período de incubação, a solução foi substituída por Krebs-Henseleit, e este foi substituído, em períodos de 10 minutos, até que a tensão basal retornasse ao normal. Assim, após os tecidos terem recuperado sua tensão inicial, foram submetidos ao tratamento farmacológico para inibir as vias de recaptação neuronal e extra-neuronal conforme descrito anteriormente.

3.6 Curvas concentração-efeito

Obtivemos curvas concentração-efeito aos agonistas de adrenoceptores: isoprenalina (não seletivo), noradrenalina (seletivo para o subtipo β_1), TA-2005 (seletivo para o subtipo β_2), BRL37344 (seletivo para subtipo β_3) e CGP12177 (agonista parcial não convencional). Obtivemos também curvas concentração-efeito à isoprenalina na presença dos antagonistas: CGP20712A (seletivo para o subtipo β_1 -adrenoceptor) nas concentrações de 10, 30 e 100 nM, e ICI118.551 (seletivo para o subtipo β_2 -adrenoceptor; BILSK et al., 1983; KAUMANN, 1997) na concentração de 50 nM. Ainda obtivemos curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença do antagonista CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM.

As curvas concentração-efeito foram obtidas por adição cumulativa de concentrações crescentes, com incrementos sucessivos de 0,5 unidade logarítmica na concentração molar do agonista (VAN ROSSUM, 1963). A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não determinaram alterações da resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

Os valores de resposta inotrópica positiva dos átrios foram expressos em mN/100 mg de tecido úmido. A sensibilidade do átrio esquerdo foi avaliada pela determinação do valor pD_2 do agonista, que corresponde ao logaritmo negativo da

concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC_{50}), em cada experimento.

3.7 Regressão linear de SCHILD

A caracterização da população de adrenoceptores β foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Schild (SCHILD, 1947; ARUNLASKSHANA e SCHILD, 1959). Estes autores descreveram um modelo quantitativo para analisar o antagonismo competitivo. Para respostas equivalentes obtidas na ausência e na presença do antagonista foi definida uma igualdade a partir da seguinte equação:

$$E_{\max}[A]/([A]+EC_{50}) = E_{\max}[A']/([A'] + EC_{50}(1+[B]/K_B)) \quad (1)$$

que após sofrer rearranjo, fica simplificada como se segue

$$[A']/[A] - 1 = [B]/K_B \quad (2)$$

onde $E_{\max}$ é a resposta máxima produzida pelo agonista, EC_{50} é a medida da potência do agonista, e é definida como a concentração do agonista que produz metade da $E_{\max}$. $[A]$ e $[A']$ respectivamente, são as concentrações dos agonistas que produzem respostas equivalentes na ausência e na presença de uma concentração conhecida do antagonista $[B]$, que possui afinidade (K_B) para o receptor. A forma mais comumente escrita para expressar esta relação é:

$$\log (CR-1) = \log [B] - \log K_B \quad (3)$$

onde CR é a razão das concentrações $[A']/[A]$. Esta equação é conhecida como "Equação de Schild".

Curvas concentração-efeito para o agonista são geradas na ausência e na presença de diversas concentrações do antagonista. A regressão do $\log (CR-1)$

sobre o $\log [B]$ fornecerá, se B for um antagonista competitivo simples, uma linha reta com coeficiente angular que não difere estatisticamente da unidade. O intercepto desta linha reta no eixo das abscissas dará o valor de $-\log K_B$, que corresponde à afinidade do antagonista pela população de receptores que está mediando a resposta. No antagonismo competitivo simples, ou seja, nas situações em que a população de receptores que está mediando a resposta é homogênea, o valor K_B para qualquer antagonista deve ser independente do agonista usado. No entanto, valores de coeficiente angular estatisticamente diferentes da unidade, sugerem a existência de diferentes mecanismos de antagonismo e/ou que o equilíbrio entre o agonista ou antagonista e o receptor não foi atingido (KENAKIN, 1993).

Obtivemos curvas concentração-efeito à isoprenalina, e à noradrenalina na presença de várias concentrações (10, 30 e 100 nM) de CGP20712A, e curvas concentração-efeito à isoprenalina na presença de ICI118.551 na concentração de 50 nM, bem como curvas concentração-efeito à isoprenalina na presença de ICI118.551 e de CGP20712A nas concentrações de 50 e 10 nM, respectivamente.

Após a obtenção das curvas concentração-efeito, foram calculadas as razões das concentrações equiefetivas (CR) a partir dos valores de EC_{50} ($pD_2 = -\log EC_{50}$) do agonista na presença e na ausência do antagonista. Foram confeccionados os gráficos de Schild para o antagonismo entre CGP20712A e isoprenalina ou noradrenalina, relacionando-se os logaritmos de $(CR - 1)$ com os logaritmos negativos das concentrações molares do antagonista.

Neste caso, quando a reta de regressão obtida apresentou coeficiente angular não diferente da unidade o valor pK_B do antagonista ($pK_B = -\log K_B$) foi determinado pelo método de Besse e Furchgott (1976), por intermédio da equação (3).

Quando a reta de regressão do gráfico de Schild apresentou coeficiente angular diferente da unidade, o valor pK_B do antagonista não foi calculado, uma vez que, nesta condição este valor não é representativo da constante de dissociação do antagonista junto a uma população homogênea de receptores (KENAKIN, 1993).

Para o antagonismo entre isoprenalina e ICI118.551 apenas o valor aproximado de pK_B foi estimado uma vez que apenas uma concentração do antagonista foi utilizada.

3.8 Fármacos e reagentes

Para o preparo da solução de Krebs-Henseleit utilizamos sais de padrão analítico solubilizados em água destilada e desionizada. Os demais fármacos utilizados foram: BRL37344, CGP20712A, CGP12177, ICI118.551 e fenoxibenzamina (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA), cloridrato de isoproterenol, corticosterona, hidrocloreto de desipramina; noradrenalina, 6-hidroxidopamina e glutathione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e TA-2005 (fornecido graciosamente pelo Prof. Dr. L. A. BARKER, do *Louisiana State University Center*, New Orleans, LO, USA)

As soluções de isoprenalina, noradrenalina e 6-hidroxidopamina foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico na concentração de 2% e armazenadas a -20°C por, no máximo, 7 dias. As soluções de fenoxibenzamina e corticosterona foram preparadas em etanol absoluto e utilizadas até 30 dias após o preparo, sendo também armazenadas a -20°C . As diluições para a curva concentração-efeito foram feitas em solução de Krebs-Henseleit. O excedente foi descartado após a utilização. ICI118.551 e CGP20712A foram solubilizados em água destilada e desionizada e armazenados a -20°C por período indeterminado.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros padrão. Teste de Kolmogorov e Smirnov foi utilizado para determinar se a população possuía distribuição gaussiana. Teste t de Student, não pareado foi utilizado para comparar as médias dos valores pD_2 entre os

grupos. Análise de Variância seguida de teste de Tukey foi utilizada para comparar as tensões iniciais, respostas máximas e valores pK_B entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

As curvas concentração-efeito foram ajustadas e analisadas pelo método de regressão não linear, o qual nos forneceu dados para determinar os valores pD_2 dos agonistas. Todas as análises e gráficos foram feitas com o auxílio dos Programas GraphPad InStat (demo) e Prisma (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 *Dados referentes às condições gerais das preparações*

O pré-tratamento farmacológico *in vitro* do átrio esquerdo para inibir os processos de recaptação neuronal e extra-neuronal, utilizando fenoxibenzamina, corticosterona e desipramina, não promoveu qualquer alteração significativa na tensão basal das preparações. Aproximadamente 8% dos tecidos não estabilizaram a tensão desenvolvida ou não apresentaram contrações rítmicas em resposta aos estímulos elétricos. Estes tecidos foram descartados.

Não observamos nenhum efeito significativo do tratamento com 6-hidroxdopamina sobre a tensão basal ou o ritmo das contrações.

A média de peso dos átrios esquerdos utilizados foi de: $24,7 \pm 0,6$ mg (n=86) para o grupo controle e $25,2 \pm 0,6$ mg (n=80) para o grupo estresse. A média de limiar estimulatório destes tecidos foi de: $5,26 \pm 0,18$ V para o grupo controle e $5,50 \pm 0,17$ V para o grupo estresse. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para estas variáveis.

4.2 *Resposta inotrópica aos agonistas de β -adrenoceptores*

Não observamos nenhuma diferença de tensão inicial entre os átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Tabela 1). Em átrios esquerdos de ratos controle, a tensão máxima foi obtida em concentração média de 1,6 nM de isoprenalina ao passo que em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, a resposta máxima à isoprenalina foi atingida em concentração média de 0,26 nM. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as tensões máximas desenvolvidas por átrios de ratos controle e ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Tabela 1, Figura 3).

Tabela 1 – Tensão inicial (Ti), resposta inotrópica positiva máxima (Rmax) e pD_2 dos agonistas de β -adrenoceptores na ausência de antagonistas em átrio esquerdo isolado de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

	Ti ^a	Rmax ^b	pD_2 ^c	n ^d
isoprenalina				
controle	27,13 ± 6,38	30,01 ± 2,91	8,44 ± 0,16	5
estresse	29,68 ± 3,09	32,18 ± 3,20	8,85 ± 0,09 *	6
noradrenalina				
controle	23,49 ± 2,32	27,06 ± 1,99	8,00 ± 0,03	6
estresse	23,91 ± 1,97	28,22 ± 3,86	7,83 ± 0,01	5
TA-2005				
controle	22,85 ± 2,71	20,24 ± 3,05 ⁺	7,53 ± 0,04	7
estresse	21,18 ± 2,38	19,74 ± 1,03 ⁺⁺	7,49 ± 0,12	8
BRL37344				
controle	27,75 ± 4,24	16,71 ± 1,77 ⁺	6,22 ± 0,09	6
estresse	31,57 ± 9,71	23,15 ± 4,83 ⁺⁺	6,13 ± 0,08	4
CGP12177				
controle	27,00 ± 2,09	7,66 ± 1,76 ⁺	7,24 ± 1,76	8
estresse	24,47 ± 1,86	7,12 ± 1,31 ⁺⁺	7,34 ± 1,31	8

^a Tensão desenvolvida pelos átrios, em 80% do comprimento ótimo, antes da adição do agonista, sob estímulos elétricos (5ms, 2 Hz, 20% acima do limiar) expressa em mN/100 mg de peso úmido de tecido; ^b Resposta máxima obtida (mN/100 mg de peso úmido de tecido); ^c -log da concentração do agonista que determina 50% da resposta máxima; ^d Número de experimentos realizados; * $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo controle (teste t de Student); ⁺ $p < 0,05$ comparado ao controle isoprenalina; ⁺⁺ $p < 0,05$ comparado ao grupo estresse isoprenalina (ANOVA, seguida de teste de Tukey).

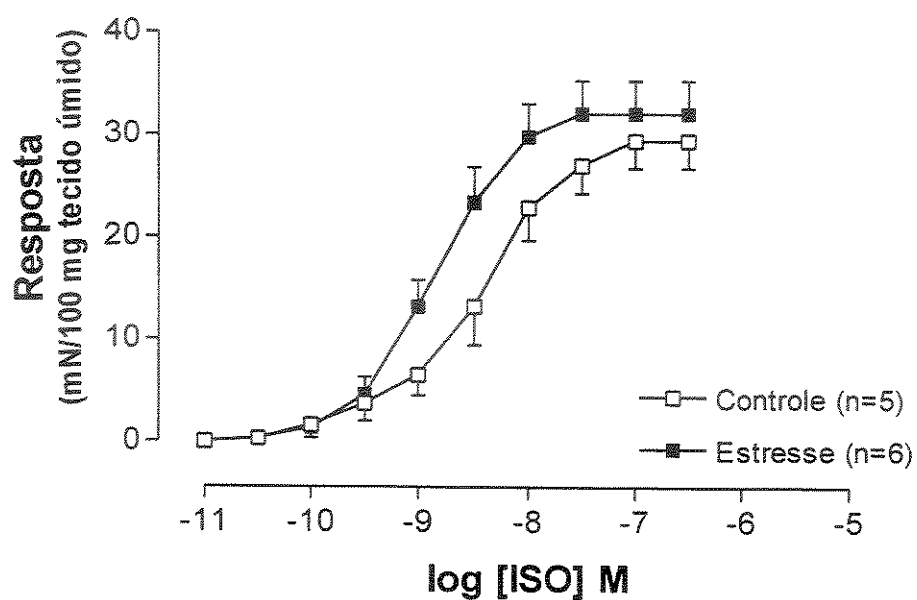


Figura 3 – Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

A curva concentração-efeito da isoprenalina em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas deslocou-se para a esquerda em relação à curva concentração-efeito obtida em átrios esquerdos de ratos do grupo controle (Figura 3) cerca de 2,6 vezes menor ao nível do valor pD_2 ($p < 0,05$; Tabela 1), caracterizando desta forma uma supersensibilidade para este agonista.

A resposta máxima à noradrenalina não foi estatisticamente diferente em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas em relação ao controle (Tabela 1), sendo que a resposta máxima para ambos os grupos foi obtida na concentração de 300 nM.

Em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas não houve diferença significativa na EC_{50} da noradrenalina comparada a átrios esquerdos de ratos controle (Tabela 1, Figura 4A).

Considerando que a estimulação elétrica do tecido poderia causar liberação de noradrenalina endógena, e que esta poderia interferir diferentemente com a resposta inotrópica aos agonistas exógenos aplicados em átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choques nas patas, os átrios esquerdos foram submetidos à desnervação *in vitro* por exposição à 6-hidroxidopamina (CALLIA e DE MORAES, 1984). Após este procedimento foram obtidas as curvas concentração-efeito para a noradrenalina.

A tensão inicial, a resposta máxima e os valores pD_2 da noradrenalina obtidos antes e após a desnervação simpática não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figuras 4A e 4B; Tabela 2).

Não observamos diferença estatisticamente significativa nas curvas concentração-efeito ao TA-2005 obtidas em átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Tabela 1; Figura 5).

Em átrios esquerdos isolados de ratos do grupo controle e do grupo estresse o TA-2005 causou aumento dose-dependente da tensão desenvolvida na faixa de concentrações que vai de 10 a 300 nM (Figura 5). Este dado sugere que a resposta inotrópica positiva eliciada pelo TA-2005 é decorrente da ativação do subtipo β_1 de adrenoreceptores, porque nessa faixa de concentração o agonista

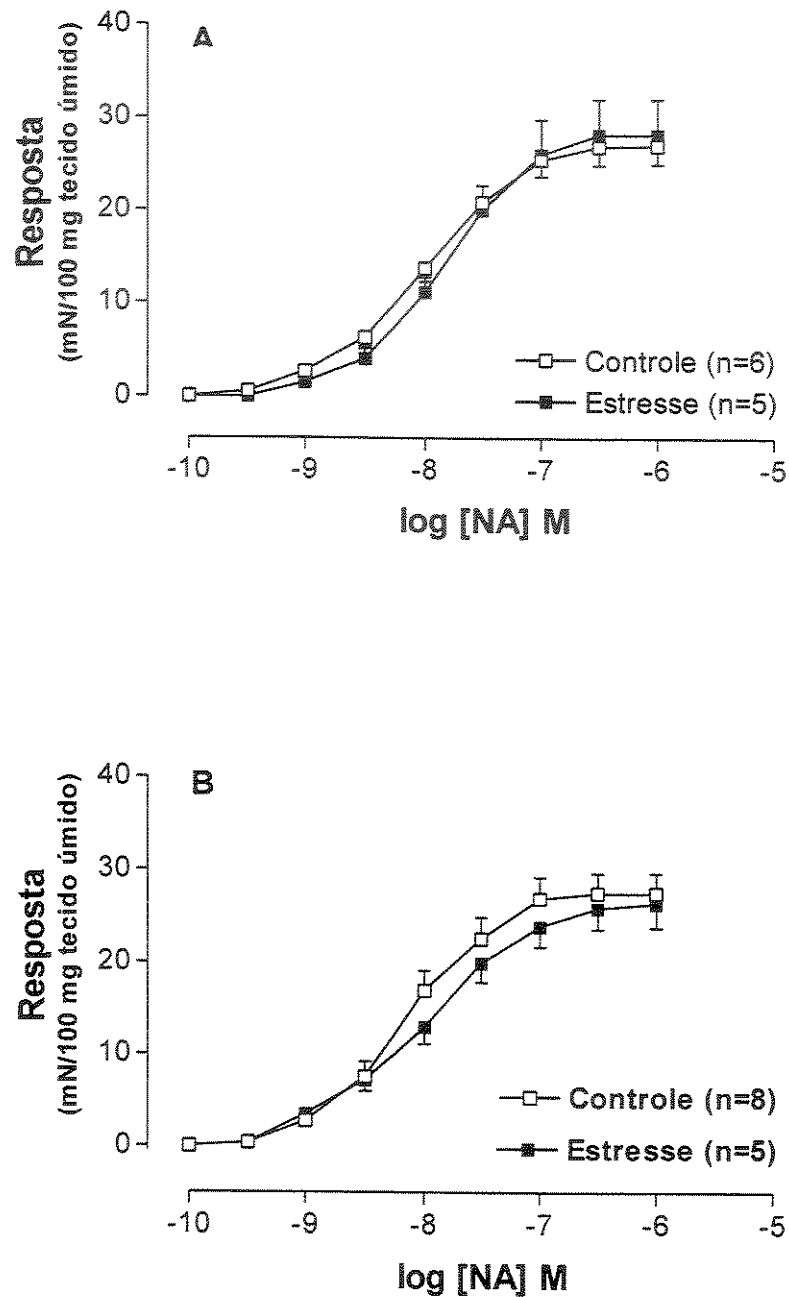


Figura 4 - Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, **(A)** não desnervados e **(B)** submetidos ao processo de desnervação com 6-hidroxidopamina.

Tabela 2 - Tensão inicial (Ti), resposta inotrópica positiva máxima (Rmax) e pD₂ da noradrenalina em átrios esquerdos isolados de ratos controle e ratos submetidos a estresse por choque nas patas tratados ou não *in vitro* com 6-hidroxidopamina.

	Ti ^a	Rmax ^b	pD ₂ ^c	N ^d
não desnervado				
controle	23,49 ± 2,32	27,06 ± 1,99	8,00 ± 0,03	6
estresse	23,91 ± 1,97	28,22 ± 3,86	7,83 ± 0,01	5
desnervado				
controle	22,25 ± 2,06	27,51 ± 2,15	8,11 ± 0,07	9
estresse	18,22 ± 1,99	26,41 ± 2,60	7,97 ± 0,07	5

^a Tensão desenvolvida pelos átrios, mantido em 80% do comprimento ótimo antes da adição do agonista, sob estímulos elétricos (5ms, 2 Hz, 20% acima do limiar) expressa em mN/100 mg de peso úmido de tecido; ^b Resposta máxima ao agonista (mN/100 mg de peso úmido de tecido); ^c – log da concentração do agonista que produz resposta igual a 50% da resposta máxima; ^d Número de experimento).

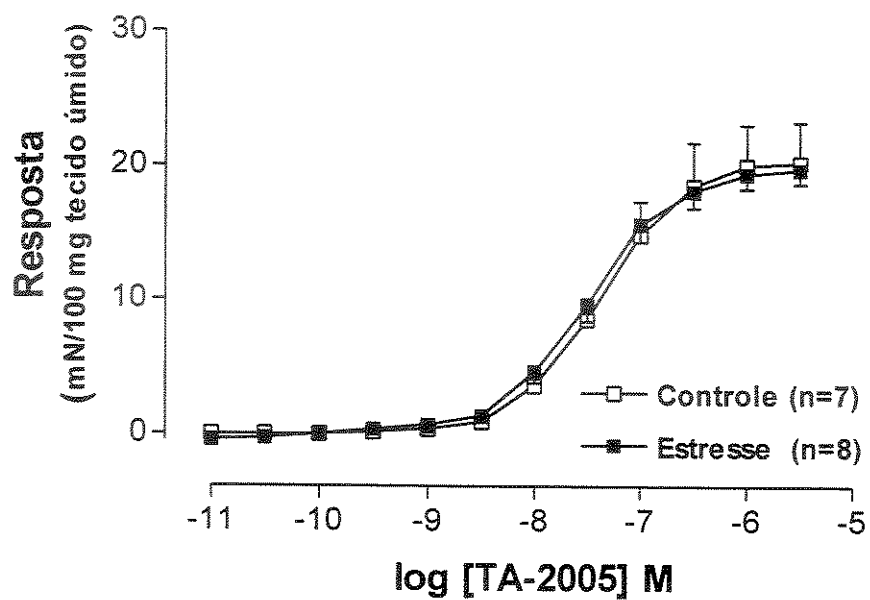


Figura 5 - Curvas concentração-efeito ao TA-2005 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

perde sua seletividade e passa a atuar como agonista parcial eliciando resposta inotrópica positiva nos demais receptores presentes na preparação.

Em cinco dos oito átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse, o TA-2005 não alterou ou causou aumento do inotropismo em todas as concentrações utilizadas (10 pM a 3 μ M), como pode ser visto no traçado representativo destes experimentos mostrado na Figura 6B. Esta resposta foi semelhante à resposta do tecido à isoprenalina (Figura 6A). Entretanto, em três experimentos o TA-2005 causou discreta diminuição da força de contração nas concentrações de 10 pM a 10 nM (Figura 6C). A partir desta última, o TA-2005 causou aumento da resposta inotrópica.

Átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas não apresentaram alterações significativas de resposta máxima e sensibilidade ao BRL37344 (Tabela 1, Figura 7 B).

BRL37344 na faixa de concentração nanomolar, que é tida como seletiva para o subtipo de adrenoceptor β_3 promoveu diminuição da tensão inicial tanto dos átrios esquerdos de ratos controle, como também de átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Figura 7 A). Esta redução da tensão inicial foi da ordem de 6 % para o grupo controle, e 10 % para o grupo de ratos submetidos a estresse na concentração de 3 nM para ambos os grupos, mas não alcançou significância estatística quando comparado a tensão basal. Em concentrações micromolares este agonista promoveu aumento da resposta inotrópica positiva em átrio esquerdo de ratos controle e de ratos submetidos a estresse. Não houve diferença na resposta ao BRL37344 em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse comparados ao controle.

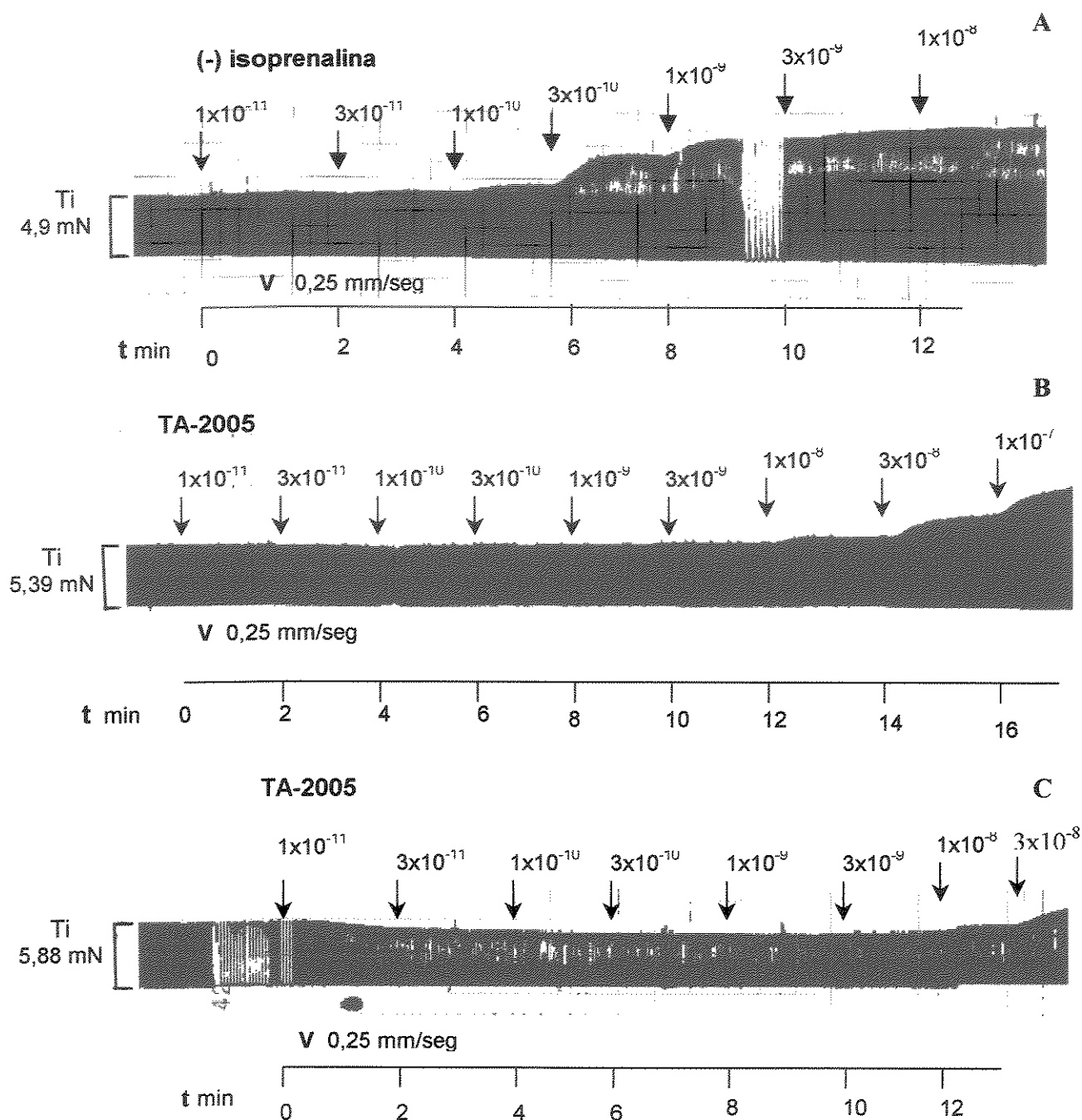


Figura 6 – Registro de curvas concentração-efeito à isoprenalina (A) e TA-2005 (B, C) em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse por choques nas patas. As setas indicam o momento da aplicação e os números indicam a concentração molar do agonista, V indica a velocidade do papel de registro e t o tempo entre a aplicação de cada dose e Ti indica a tensão inicial desenvolvida antes da obtenção das curvas concentração-efeito e sob os estímulos elétricos (2 Hz, 5 ms e voltagem 20% acima do limiar). Note que em C nas três primeiras concentrações de TA-2005 ocorre diminuição da tensão inicial.

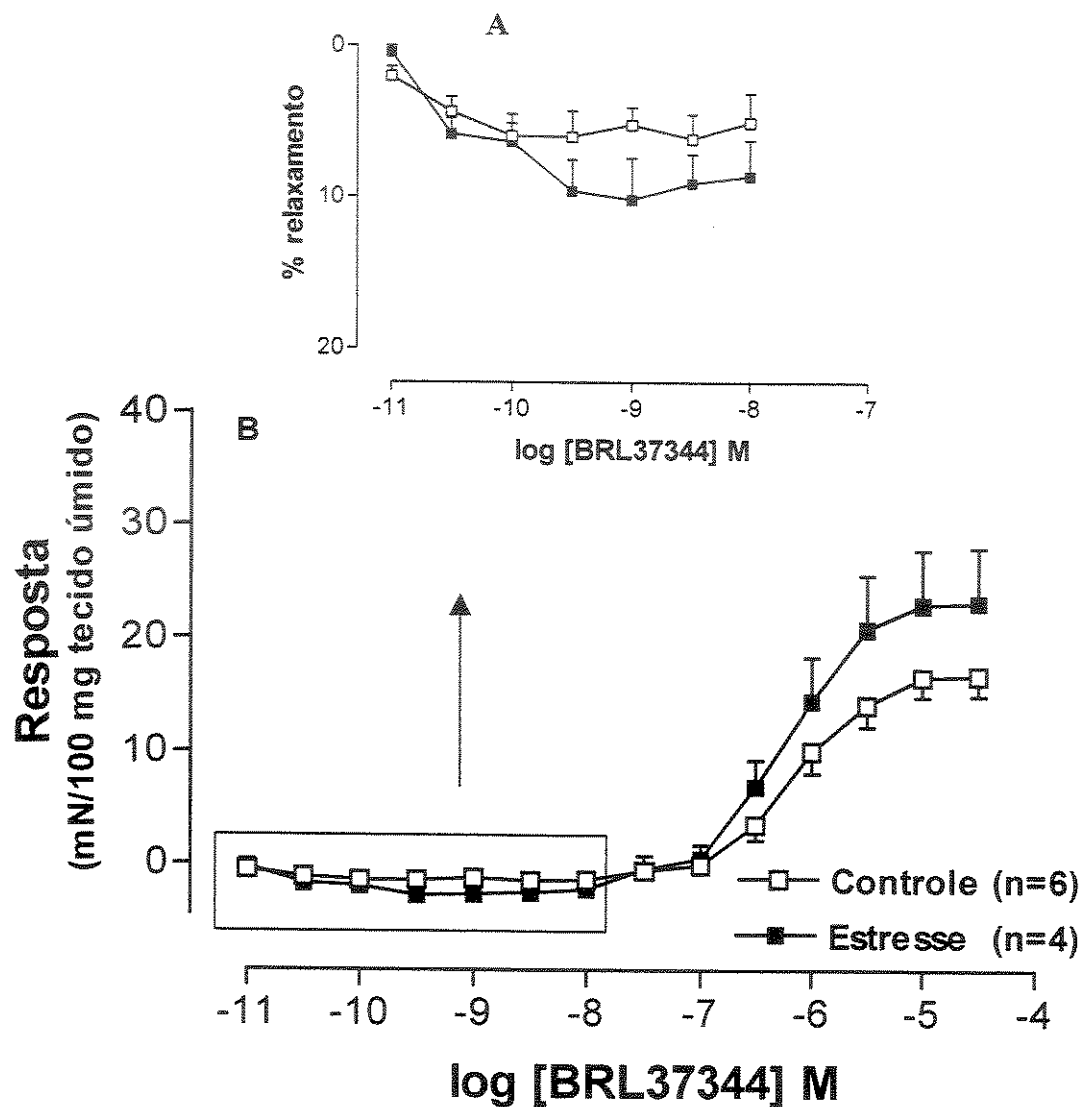


Figura 7 - Curvas concentração-efeito ao BRL37344 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (B). Ampliamos a resposta inotrópica negativa observada em concentrações nanomolares de BRL37344 (A).

Não foram observadas diferenças significativas na resposta máxima e na sensibilidade ao CGP12177 entre os átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Tabela 1, Figura 8).

A resposta máxima obtida para o CGP12177 foi da ordem de 25% da resposta máxima da isoprenalina obtida para o grupo controle e de 22% da resposta máxima da isoprenalina obtida em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse ($p < 0,05$). Estes valores não diferem entre si ($p > 0,05$).

Em concentrações micromolares, o CGP12177 induziu arritmias em um dos oito átrios esquerdos de ratos controle analisados e em três dos oito átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (Figura 9A, B e C).

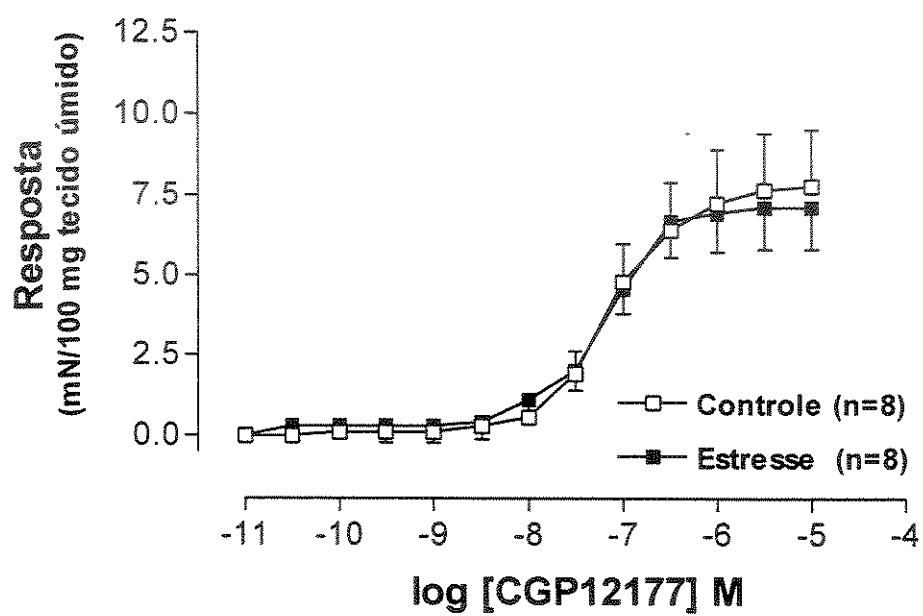


Figura 8 - Curvas concentração-efeito ao CGP12177 em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

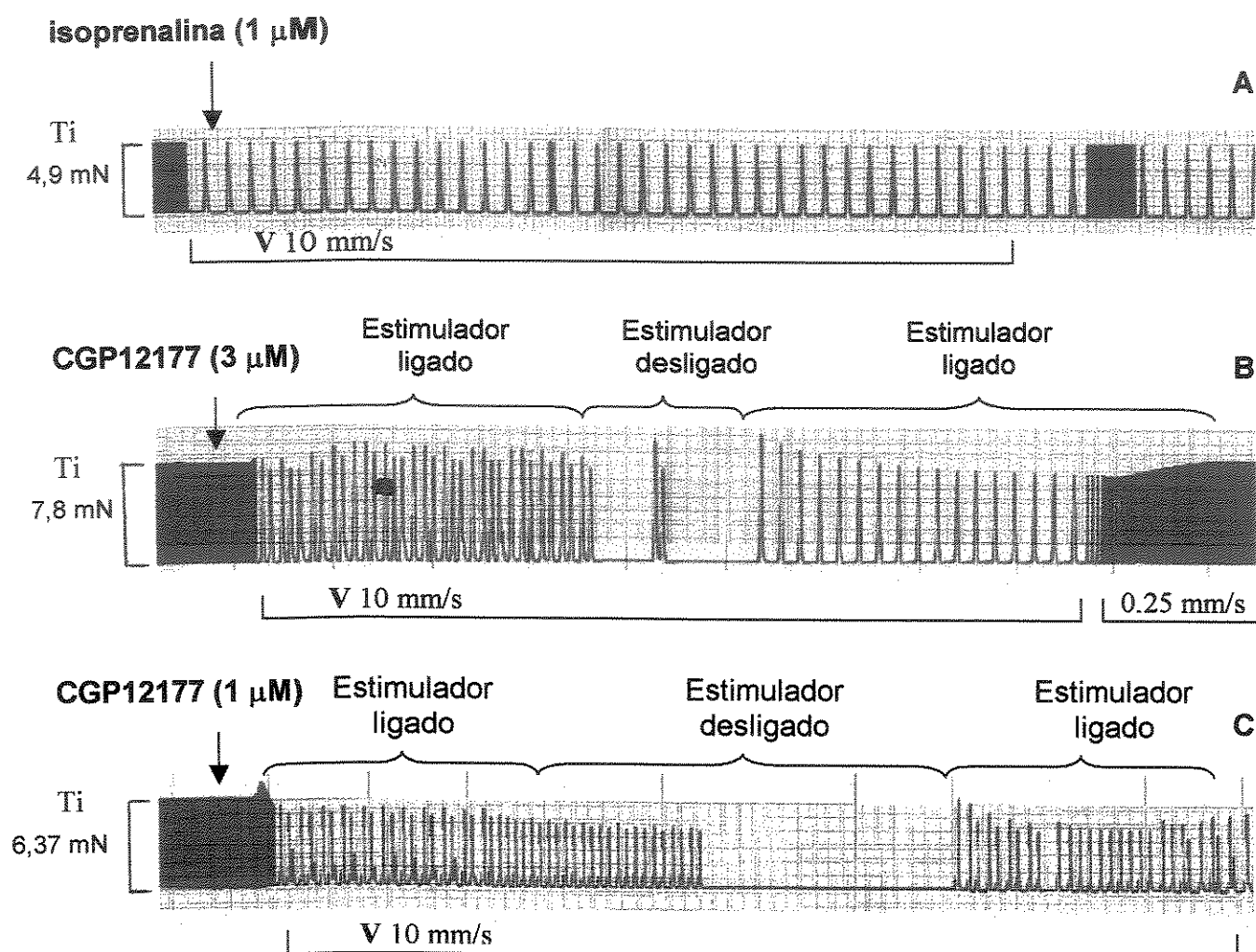


Figura 9 – Registro de freqüência desenvolvida por átrios esquerdos isolados de ratos controle durante as curvas concentração-efeito da isoprenalina e do CGP12177 (A e B, respectivamente) e em átrio esquerdo de rato submetido a estresse por choque nas patas (C) onde o CGP12177 foi o agonista; e Ti indica a tensão inicial desenvolvida antes da obtenção das curvas concentração-efeito sob os estímulos elétricos (2 Hz, 5 ms e voltagem 20% acima do limiar); V é a velocidade do papel.

4.3 Efeitos do ICI118.551 na resposta inotrópica à isoprenalina

Em átrios esquerdos de ratos controle ou submetidos a estresse por choque nas patas o ICI118.551 não causou nenhuma alteração na tensão inicial, nem na resposta máxima à isoprenalina (Tabela 3; $p > 0,05$).

Em átrios esquerdos de ratos controle, o antagonista seletivo de adrenoreceptores β_2 , ICI118.551, na concentração de 50 nM, não deslocou significativamente a curva concentração efeito à isoprenalina (Figura 10A), enquanto que em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, o ICI118.551 provocou um deslocamento para a direita de cerca de 1,8 vezes, ao nível da EC_{50} da curva concentração-efeito à isoprenalina em relação à curva obtida na ausência deste antagonista (Figura 10B). A supersensibilidade à isoprenalina em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse foi anulada por este antagonista (Tabela 3). Não foi possível determinar os valores pK_B para ICI118.551, porque o deslocamento provocado por este antagonista na curvas concentração-efeito à isoprenalina foi menor que duas vezes.

4.4 Efeitos do CGP20712A na resposta inotrópica à isoprenalina e à noradrenalina

Não observamos diferença significativa na tensão inicial e na resposta máxima em nenhum dos grupos experimentais (Tabelas 3 e 4). Este antagonista de β_1 -adrenoreceptores, em qualquer das concentrações usadas, cancelou a diferença do valor pD_2 observada entre os grupos controle e submetidos a estresse onde a isoprenalina foi utilizada como agonista (Tabela 3).

O CGP20712A deslocou para a direita, de modo dose-dependente, as curvas concentração-efeito à isoprenalina (Figuras 11 e 12) e à noradrenalina (Figuras 13 e 14), em átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, em relação às curvas obtidas na ausência de antagonista (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Tensão inicial (Ti), resposta inotrópica positiva máxima (Rmax) e pD₂ da isoprenalina na ausência e na presença de antagonistas de β-adrenoceptores em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

	Ti ^a	Rmax ^b	pD ₂ ^c	pK _B ^d	CR ^e
sem antagonista					
controle (5) ^f	27,13 ± 6,38	30,01 ± 2,91	8,44 ± 0,16		
estresse (6) ^f	29,68 ± 3,09	32,18 ± 3,20	8,85 ± 0,09 *		
ICI118.551 (50 nM)					
controle (7) ^f	22,77 ± 2,90	31,04 ± 2,31	8,43 ± 0,11	—	1
estresse (6) ^f	23,54 ± 1,96	27,81 ± 2,11	8,60 ± 0,11	—	1,8
CGP20712A (10 nM)					
controle (8) ^f	26,60 ± 2,98	26,09 ± 1,62	7,88 ± 0,17	8,65 ± 0,03	4
estresse (8) ^f	23,94 ± 1,25	22,08 ± 2,56	7,60 ± 0,06 [†]	9,20 ± 0,06 *	18
CGP20712A (30 nM)					
controle (5) ^f	31,12 ± 5,08	29,52 ± 3,83	7,54 ± 0,16 ^{††}	8,41 ± 0,09	8
estresse (5) ^f	26,86 ± 0,88	28,51 ± 1,95	7,23 ± 0,18 [†]	8,57 ± 0,20	42
CGP20712A (100 nM)					
controle (6) ^f	34,89 ± 3,50	28,42 ± 1,96	6,81 ± 0,14 ^{††, °}	8,50 ± 0,16	43
estresse (8) ^f	26,16 ± 6,18	23,18 ± 2,84	6,82 ± 0,10 ^{†, *}	8,96 ± 0,10	107
CGP20712A (10 nM) + ICI118,551 (50 nM)					
controle (6) ^f	23,51 ± 1,99	32,32 ± 1,96	7,72 ± 0,08 ^{††}		5
estresse (8) ^f	20,87 ± 1,98	31,44 ± 2,92	7,72 ± 0,07 [†]		14

^a Tensão desenvolvida pelos átrios, em 80% de comprimento ótimo antes da adição do agonista sob estímulos elétricos (5ms, 2 Hz, 20% acima do limiar) expressa em mN/100 mg de peso úmido de tecido; ^bResposta máxima ao agonista (mN/100 mg de peso úmido de tecido); ^c -log da concentração molar do agonista que produz resposta igual a 50% da resposta máxima; ^d Valores pK_B estimados para cada dose do antagonista; ^eantilog da diferença entre os valores pD₂ na ausência e na presença do antagonista; ^f Número de experimentos; * p < 0,05 comparado ao seu respectivo grupo controle (teste t de Student); [†] p < 0,05 comparado ao estresse sem antagonista; ^{††} p < 0,05 comparado ao controle sem antagonista; [°] p < 0,05 comparado ao controle na presença de CGP20712A (10 e 30 nM); * p < 0,05 comparado ao estresse na presença de antagonista (10 nM; ANOVA seguida de Tukey).

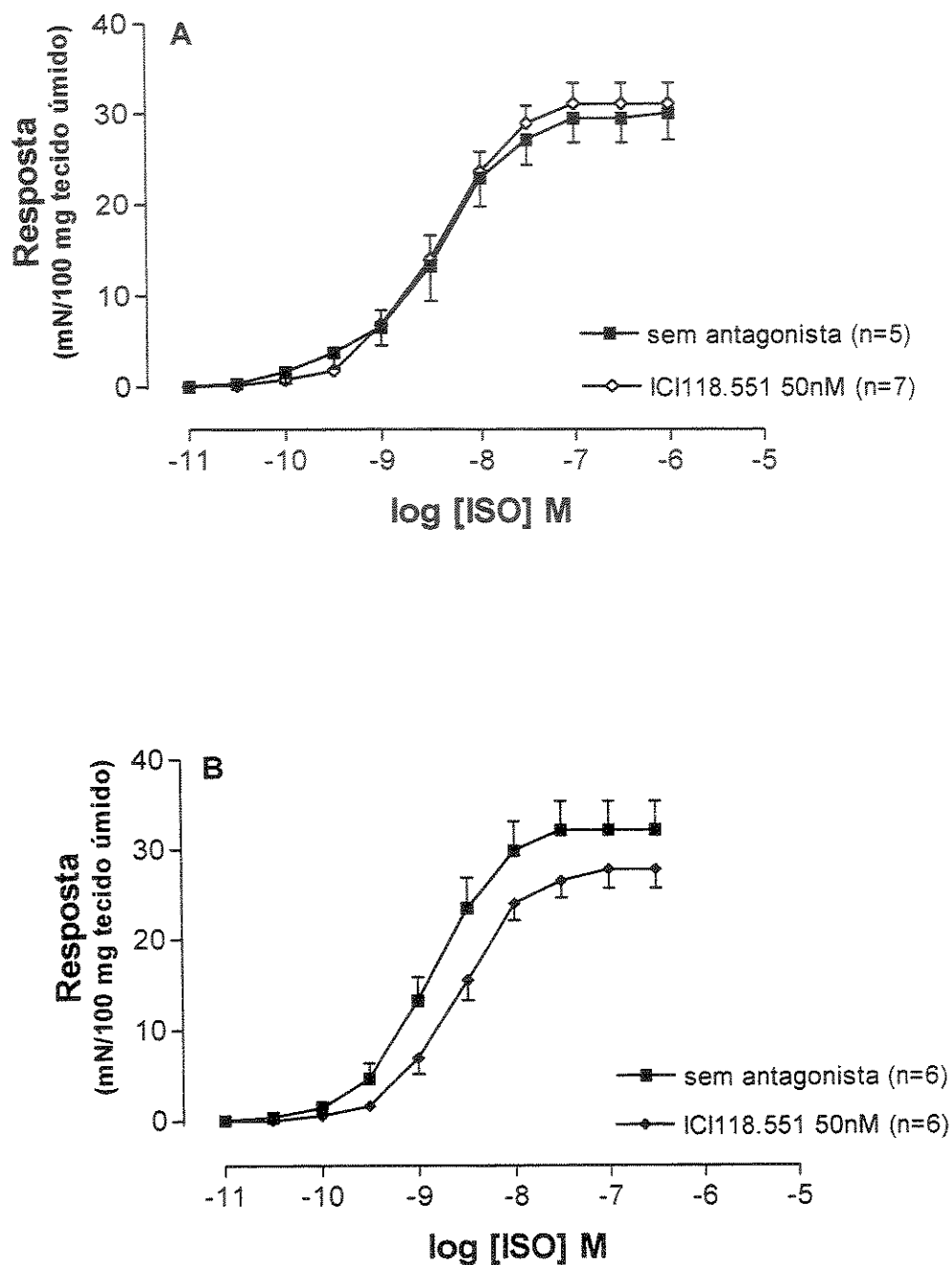


Figura 10 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) na presença e na ausência de antagonista ICI118.551 (50 nM), **(A)** em átrios esquerdos isolados de ratos controle (CO) e **(B)** em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (ST).

Tabela 4 – Tensão inicial (Ti), resposta inotrópica máxima (Rmax) e pD₂ da noradrenalina na ausência e na presença de antagonistas de β-adrenoceptores em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

	Ti ^a	Rmax ^b	pD ₂ ^c	pK _B ^d	CR ^e
sem antagonista					
controle (6) ^f	23,49 ± 2,32	27,06 ± 1,99	8,00 ± 0,03		
estresse (5) ^f	23,91 ± 1,97	28,22 ± 3,86	7,83 ± 0,01		
CGP20712A (10 nM)					
controle (5) ^f	26,33 ± 3,75	24,58 ± 3,27	6,62 ± 0,15 ^{††}	9,34 ± 0,16	24
estresse (4) ^f	30,85 ± 2,19	26,22 ± 1,83	6,63 ± 0,17 [†]	9,24 ± 0,17	16
CGP20712A (30 nM)					
controle (3) ^f	28,37 ± 3,56	26,52 ± 1,02	6,13 ± 0,08 ^{††}	9,37 ± 0,08	74
estresse (3) ^f	25,90 ± 1,49	27,75 ± 2,37	6,38 ± 0,06 [†]	8,96 ± 0,07	28
CGP20712A (100 nM)					
controle (4) ^f	28,14 ± 3,92	23,42 ± 2,85	5,89 ± 0,03 ^{††, #}	9,09 ± 0,03	129
estresse (5) ^f	26,61 ± 4,16	27,36 ± 0,66	5,55 ± 0,07 ^{†, °}	9,28 ± 0,07	191

^a Tensão desenvolvida pelos átrios, em 80% do comprimento ótimo, antes da adição do agonista, sob estímulos elétricos (5ms, 2 Hz, 20% acima do limiar) expressa em mN/100 mg de peso úmido de tecido; ^b Resposta máxima ao agonista (mN/100 mg de peso úmido de tecido); ^c -log da concentração molar do agonista, que produz resposta igual a 50% da resposta máxima; ^d Valores pK_B estimados para cada dose do antagonista; ^e antilog da diferença entre os valores pD₂ na ausência e na presença do antagonista; ^f Número de experimentos; ^{††} p < 0,001, comparados ao controle na ausência de antagonista; [†] p < 0,001, comparados ao estresse na ausência de antagonista; [#] p < 0,05 comparado ao controle na presença de antagonista (10 nM); [°] p < 0,05 comparado ao estresse na presença de antagonista (10 e 30 nM; ANOVA seguida de teste de Tukey, respectivamente).

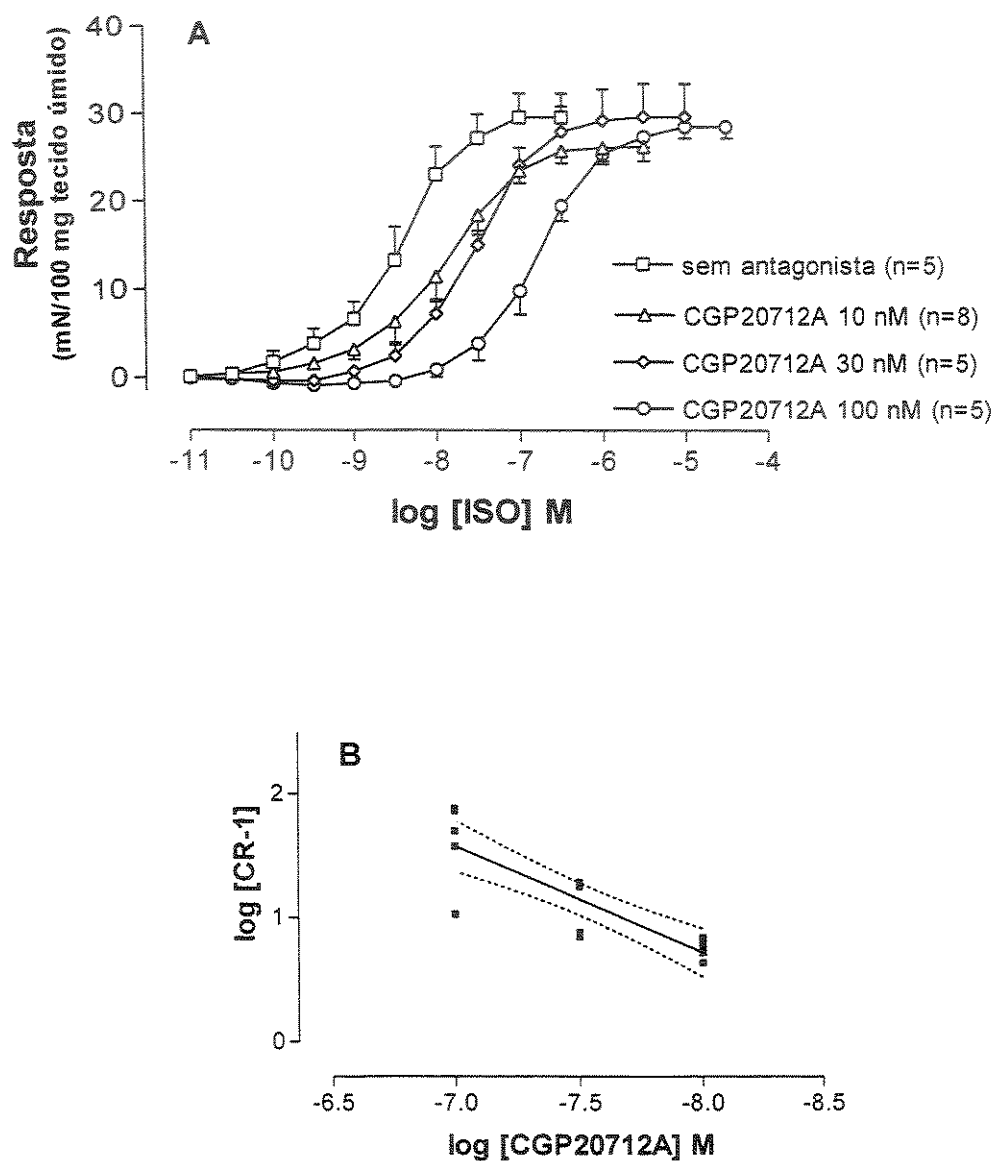


Figura 11 – Curvas concentração-efeito da isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos controle **(A)** na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild **(B)**.

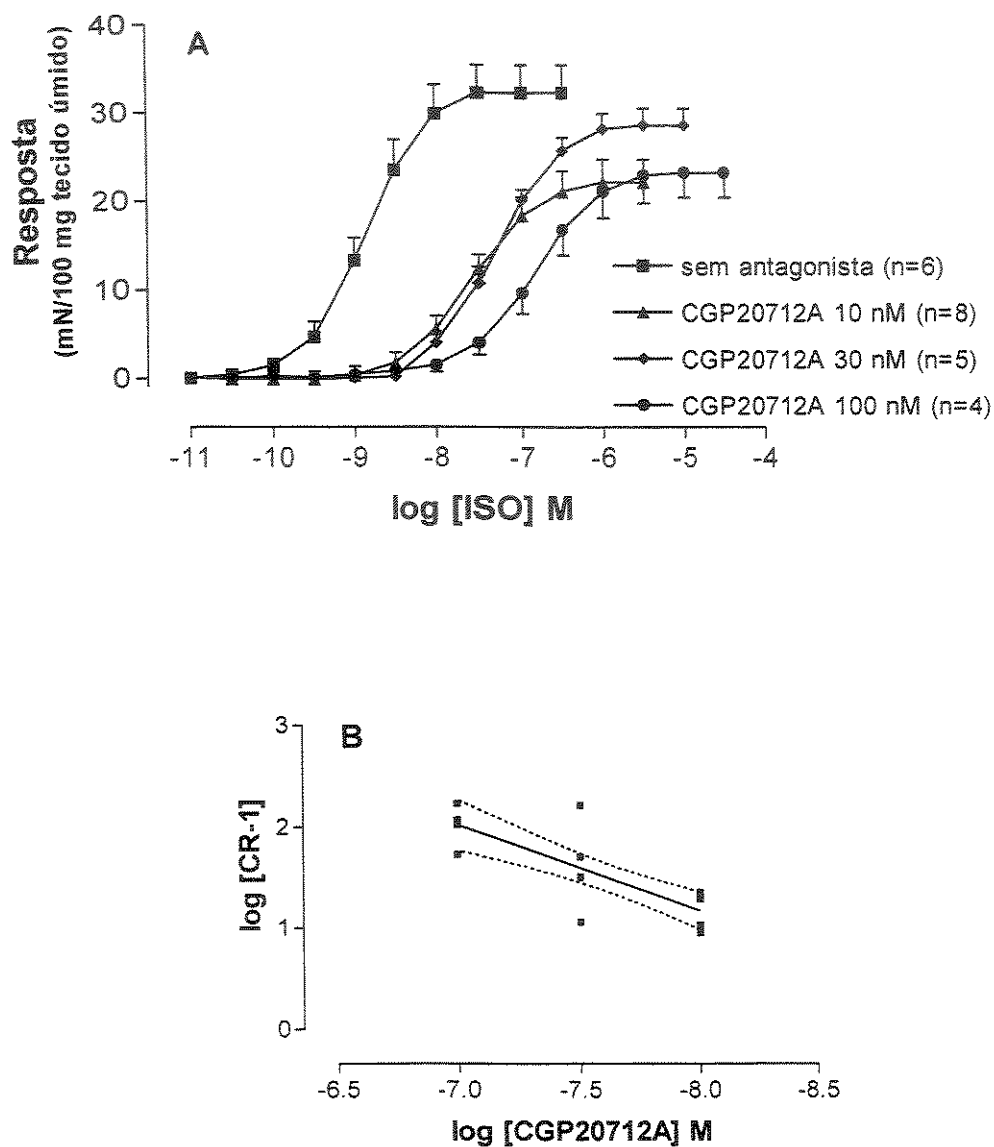


Figura 12 – Curvas concentração-efeito da isoprenalina (ISO) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (**A**) na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild (**B**).

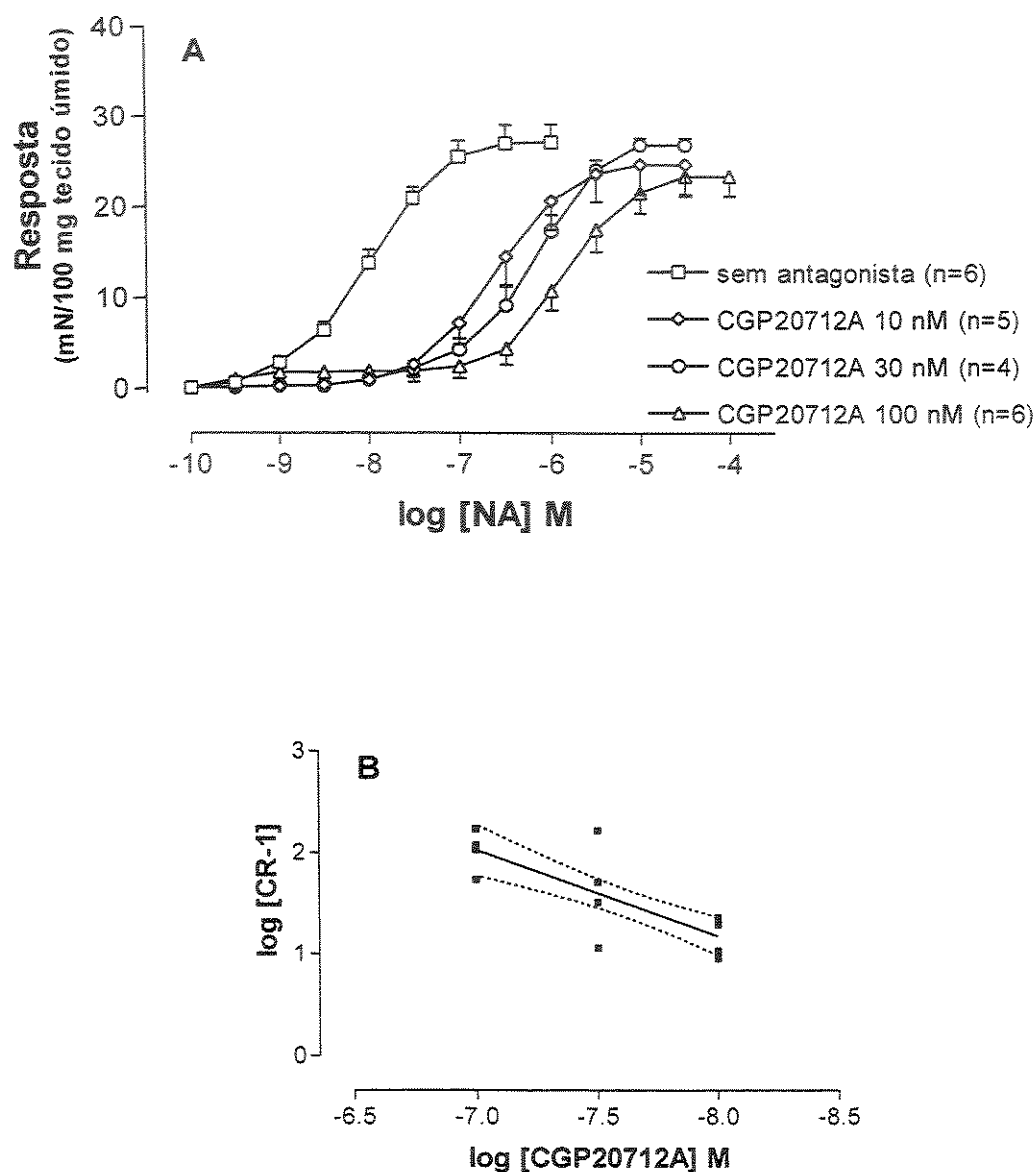


Figura 13 – Curvas concentração-efeito da noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos controle **(A)** na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild **(B)**.

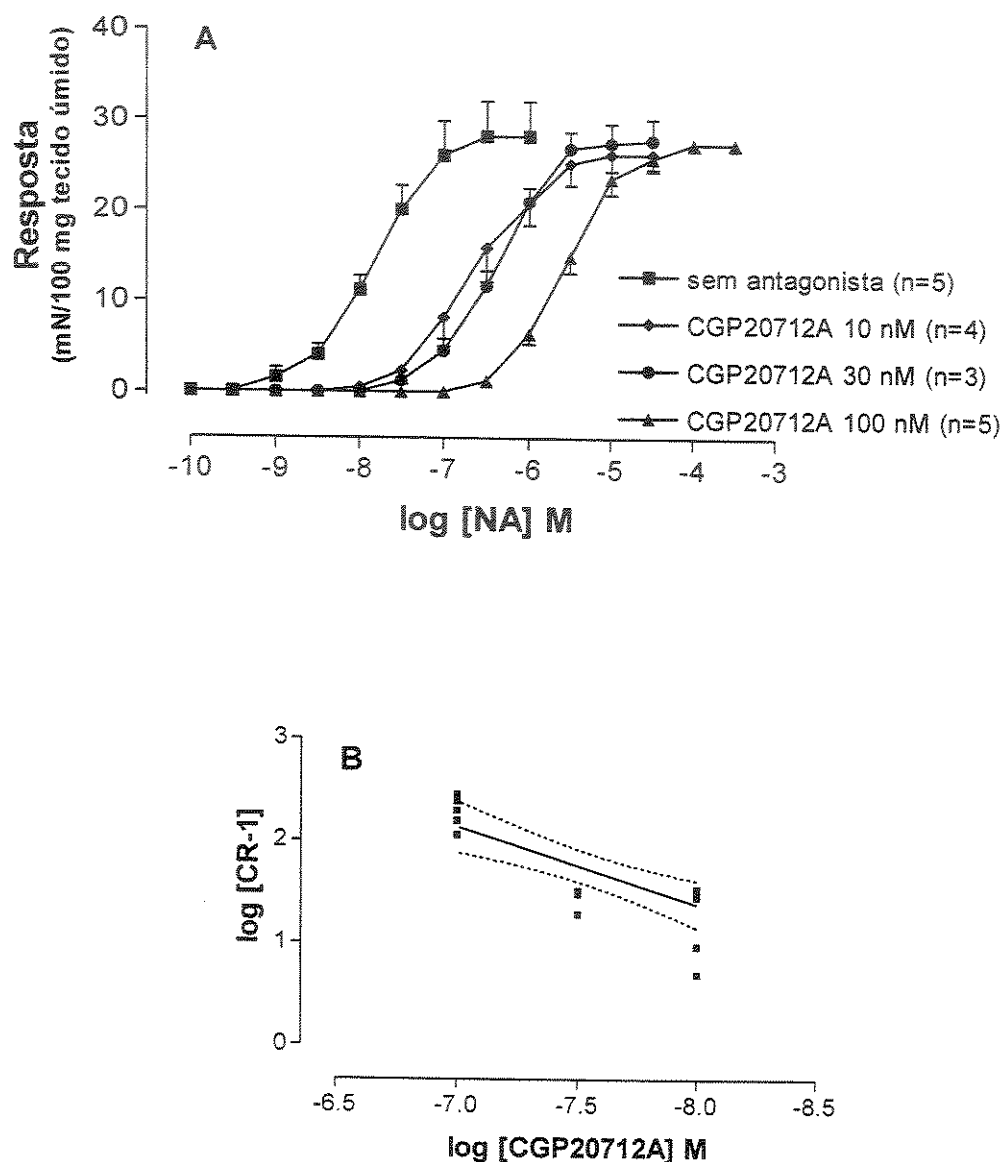


Figura 14 – Curvas concentração-efeito da noradrenalina (NA) em átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas **(A)** na ausência e na presença de CGP20712A nas concentrações de 10, 30 e 100 nM e sua respectiva reta de regressão linear de Schild **(B)**.

Apesar do intervalo de confiança incluir a unidade, este é muito amplo demonstrando que há variação dentro do grupo. Além disto, os coeficientes angulares das retas de regressão de Schild diferiram estatisticamente da unidade em todos os grupos como pode ser visto pelo valor de “p” do slope das retas de regressão linear de Schild (Tabela 5). Em átrios esquerdos de ratos controle não houve variação no valor pK_B em função da dose do antagonista (Tabelas 3 e 4). Porém, os valores pK_B estimados em curvas concentração-efeito nas quais isoprenalina foi utilizada como agonista (Tabela 3) foram significativamente menores do que aqueles obtidos quando a noradrenalina foi usado como agonista (Tabela 4). Na Tabela 5 as medidas dos valores pK_B são apresentados para facilitar esta comparação. Em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse, o valor pK_B do CGP20712A foi dependente da dose utilizada do antagonista quando a isoprenalina foi utilizada como agonista (Tabela 3) mas não quando a noradrenalina foi utilizada (Tabela 3).

4.5 Resposta inotrópica à isoprenalina na presença de ICI118.551 e de CGP20712A

Em átrios esquerdos de ratos controles e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas a presença dos antagonistas não alterou a tensão inicial nem a resposta máxima à isoprenalina (Tabela 3, Figura 15A).

Os valores pD_2 da isoprenalina foram significativamente menores em ambos os grupos quando comparados aos valores obtidos na ausência de antagonistas ou apenas na presença de ICI118.551 (Tabela 3). Não houve nenhuma diferença significativa dos valores pD_2 entre os grupos controle e submetidos a estresse por choque nas patas na presença de ambos os antagonistas ou quando as curvas concentração-efeito obtidas na presença dos dois antagonistas foram comparadas com aquelas obtidas na presença apenas de CGP20712A na concentração de 10 nM (Tabela 3). O deslocamento causado nas curvas concentração-efeito à isoprenalina pelos dois antagonistas foi significativamente maior ($p < 0,05$) em

átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choques nas patas do que em átrios esquerdos isolados de ratos controle (Tabela 3).

Tabela 5 - pK_B do CGP20712A, coeficientes angulares (α), com os intervalos de confiança de 95% (I.C.), coeficientes de correlação (r^2) e valores de p do slope (p) das retas de regressão de Schild em átrio esquerdo de ratos controle e ratos submetidos a estresse por choque nas patas, utilizando isoprenalina (ISO) ou noradrenalina (NA) como agonistas.

	Controle		Estresse	
	ISO	NA	ISO	NA
pK_B^a	$8,52 \pm 0,07$	$9,26 \pm 0,09^*$	$8,91 \pm 0,17$	$9,16 \pm 0,10^*$
α	0,86	0,75	0,84	1,04
I.C.	0,55 - 1,16	0,39 - 1,11	0,50 - 1,19	0,63 - 1,45
r^2	0,74	0,68	0,65	0,74
p	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,001
N^b	15	12	17	13

Valores médios seguidos do erro padrão da média do pK_B^a que corresponde à constante de dissociação do complexo antagonista-receptor; N^b número de experimentos; $^* p < 0,05$ comparado ao grupo controle isoprenalina (teste *t* de Student).

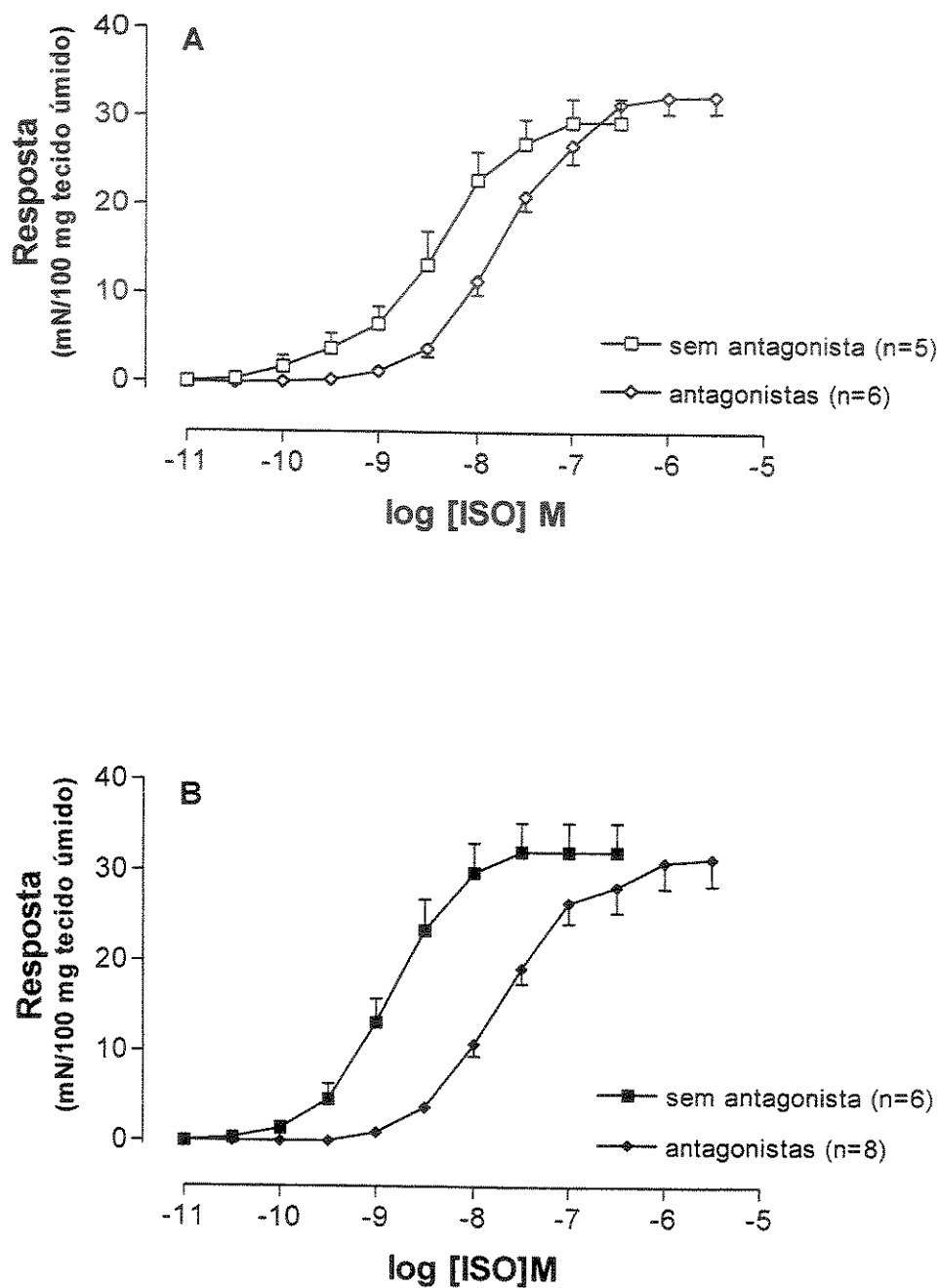


Figura 15 - Curvas concentração-efeito da isoprenalina (ISO) na presença ou ausência de ambos os antagonistas IC1118.551 e CGP20712A nas concentrações de 50 e 10 nM, respectivamente, em átrios esquerdos isolados de ratos controle (A) e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas (B).

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que ratos submetidos a três sessões de choques nas patas não apresentaram alterações no peso dos átrios esquerdos ou no limiar de estimulação. Entretanto, os átrios esquerdos destes animais apresentaram supersensibilidade à isoprenalina. Este ultimo dado está de acordo com resultados encontrados anteriormente em átrio direito de ratos (BASSANI e DE MORAES, 1987, 1988; VANDERLEI et al., 1996; MARCONDES et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al., 1999), indicando aumento da participação do subtipo β_2 de adrenoceptor, o que sugere que ambos os átrios apresentariam comportamento semelhante quanto aos mecanismos adaptativos cardíacos desencadeados por este estressor.

A supersensibilidade à isoprenalina foi cancelada pelo ICI118.551 na concentração em que este antagonista é seletivo para o subtipo β_2 de adrenoceptor, confirmando a participação deste receptor no aumento da sensibilidade da resposta inotrópica positiva ao agonista em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse.

Quando os átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas foram incubados com antagonista para o subtipo β_1 de adrenoceptor, CGP20712A na concentração de 10 nM, as curvas concentração-efeito da isoprenalina, foram deslocadas paralelamente à direita cerca de 18 vezes, enquanto que as curvas concentração-efeito em átrios esquerdos de ratos controle foram deslocadas à direita aproximadamente 4 vezes. O valor pK_B estimado para o CGP20712A foi maior em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse do que em átrios esquerdos de ratos controle. Estes resultados sugerem que a supersensibilidade à isoprenalina poderia ser devida a uma alteração conformacional dos receptores que resultaria em aumento da afinidade do subtipo β_1 de adrenoceptor pelo agonista e pelo antagonista, e não ao aumento da população de adrenoceptores β_2 .

A obtenção de curvas monofásicas para o TA-2005, que interage seletivamente com adrenoceptores do subtipo β_2 em concentrações nanomolares e com ambos os subtipos em concentrações maiores (KIKKAWA et al. 1991, 1998; VOSS et al., 1992, 1994; SPADARI-BRATFISCH et al., 1999; SOUZA, 2001), não fornece suporte para a hipótese de que o subtipo β_2 de adrenoceptores participa da resposta inotrópica de átrios esquerdos de ratos aos agonistas de adrenoceptores β .

Com o objetivo de identificar os mecanismos envolvidos com as alterações de sensibilidade da resposta inotrópica aos agonistas adrenérgicos em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse passamos a utilizar a análise de regressão linear de Schild (SCHILD, 1947; ARUNLAKSHANA e SCHILD, 1959), onde, curvas concentração-efeito para o agonista, são geradas na ausência e na presença de diversas concentrações do antagonista. Desta forma, alterações da afinidade entre o antagonista e a população de receptores fornecem indicações seguras sobre alterações na estrutura e/ou subtipo de receptores envolvidos com a resposta que está sendo analisada sem contaminação por eventos intracelulares que possam mascarar os efeitos ao nível do receptor (KENAKIN, 1993). A análise de regressão linear de Schild (LEMOINE e KAUMANN, 1983; KENAKIN, 1993) permite esclarecer se a população de receptores do átrio esquerdo de ratos é homogênea ou heterogênea e, se esta sofre alterações em resposta ao estresse.

Naqueles tecidos onde a população de adrenoceptores do subtipo β_1 é homogênea, espera-se que o CGP20712A, na concentração seletiva para este sub-tipo (10 nM), proporcione um deslocamento de 30 vezes nas curvas concentração-efeito à isoprenalina e, se houver uma participação de 5 a 10 % do subtipo β_2 na resposta ao agonista, este antagonista, nesta mesma concentração, proporcionaria um desvio de 10 vezes (LEMOINE e KAUMANN, 1983). O desvio causado pelo CGP20712A (10 nM) na curva concentração-efeito à isoprenalina em átrios de ratos controle, onde julgávamos que haveria homogeneidade de receptores do subtipo β_1 , foi de apenas 4 vezes. Apenas em altas concentrações (100 nM) obtivemos um desvio maior que 30 vezes. Em átrio de ratos submetidos a estresse, o desvio foi de 18 vezes. Estes resultados sugerem que, mesmo em

átrios de ratos controle, a população de adrenoreceptores é heterogênea. Entretanto, a curva concentração-efeito à isoprenalina não é deslocada pelo ICI118.551, como esperado se a população contivesse adrenoreceptores do subtipo β_2 . Por outro lado, a análise da regressão linear de Schild nos mostra que o valor pK_B do CGP20712A em átrio esquerdo de ratos controle é agonista-dependente, em quanto que em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse, o valor pK_B do CGP20712A variou em função da concentração do antagonista, reforçando a hipótese de uma população heterogênea de adrenoreceptores neste tecido (KENAKIN, 1993).

Átrios esquerdos de ratos controle e de ratos submetidos a estresse, apresentaram resposta inotrópica negativa ao BRL37344 na faixa de concentração nanomolar, mas esta não atinge significância estatística.

Efeito inotrópico negativo provocado pelo BRL37344 foi demonstrado em biópsias de septo interventricular de corações humanos transplantados, onde o BRL37344 e a isoprenalina em presença de antagonista não seletivo para os subtipos de adrenoreceptores β_1 e β_2 , nadolol, na concentração de 10 μM , provocaram resposta inotrópica negativa (GAUTHIER et al., 1996). Estes efeitos do BRL37344 ocorreriam por intermédio da estimulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS₃), que promoveria aumento da concentração de óxido nítrico (NO) na célula cardíaca, e este, por sua vez, promoveria diminuição da força de contração do músculo cardíaco através do aumento da concentração de GMPc (GAUTHIER et al., 1996, 2000; BALLIGAND, 1999, 2000; PAULUS e SHAH, 1999). Nossos resultados ainda não permitem afirmar se realmente este efeito ocorre uma vez que os demais subtipos de adrenoreceptores β ou a NOS não foram bloqueados, mas levantam esta possibilidade.

O CGP12177 é classificado como um agonista parcial não convencional (KAUMANN, 1989). Esta denominação foi baseada na observação de que o CGP12177, em baixas concentrações, é um antagonista de receptores adrenérgicos do subtipo β_1 e β_2 , mas em altas concentrações pode promover efeitos cardioestimulantes (cronotrópico, inotrópico e lusitrópico) através de um subtipo de adrenoreceptor β diferente dos subtipos β_1 , β_2 e β_3 . Os efeitos do

CGP12177 não seriam abolidos por antagonistas convencionais de adrenoceptores dos subtipos β_1 e β_2 como, por exemplo, o propranolol, mas poderiam ser moderadamente bloqueados por bupranolol e CGP20712A. Desta forma, o CGP12177 exerceria seus efeitos através de um proposto adrenoceptor β_4 , o qual promoveria aumento da concentração de AMPc intracelular. Portanto, utilizando a mesma via de sinalização dos subtipos de adrenoceptor β_1 e β_2 (KAUMANN, 1989, 1997; KAUMANN e MOLENAAR, 1996; PAK e FISHMAN, 1996), este receptor eliciaria um aumento do transiente de cálcio em miócitos ventriculares (KAUMANN e FREESTONE, 1997) e da condutância de canais de potássio em coração de furão (LOWE et al., 1998) e, por este motivo, poderia induzir arritmias.

Nós demonstramos que, em átrio direito de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, ocorre desensibilização da resposta à noradrenalina, mas nenhuma alteração da resposta ao CGP12177 (SANTOS e SPADARIBRATFISCH, 2001). Estes resultados sugerem que ou são dois receptores distintos ou que os dois sítios do adrenoceptor β_1 apresentam comportamento independente.

Nossos dados atuais não permitem dizer com certeza se os efeitos do CGP12177 em átrio esquerdo de ratos são decorrentes da ativação de um proposto adrenoceptor β_4 ou de um estado de baixa afinidade do adrenoceptor β_1 . Nossos dados mostram ainda que o CGP12177 em concentrações micromolares promoveu arritmias em tecido atrial esquerdo de ratos submetidos a estresse com maior frequência do que em átrio esquerdo de ratos controle, mas não houve alteração nem na resposta máxima, nem da sensibilidade ao agonista. Em um estudo realizado por Li et al. (2001) foi demonstrado que miócitos isolados de átrio esquerdo de cão possui uma maior expressão de canais de potássio tipo I_{Kr} , do que miócitos isolados de átrio direito, os quais poderiam ser responsáveis pela maior predisposição do átrio esquerdo desenvolver arritmias, uma vez que o período refratário do átrio esquerdo é menor que aquele visto para o átrio direito (PAPAGEORGIOU et al., 1996; SIH et al., 1997). Desta forma, é possível que o tecido atrial esquerdo de ratos submetidos a estresse por choque nas patas

apresente alteração na expressão deste tipo de canal de potássio e, por isto, seria mais propenso a desenvolver arritmias do que os átrios esquerdos isolados de ratos controle em resposta ao CGP12177. Para provar esta hipótese é necessário que novos estudos sejam realizados.

Assim sendo, nossos resultados sugerem que em átrios esquerdos de ratos submetidos a estresse por choques nas patas ocorrem alterações na população de adrenoceptores que levam a um aumento da sensibilidade à isoprenalina. Os ensaios com antagonistas parecem confirmar a heterogeneidade da população de adrenoceptores em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse por choques nas patas. Entretanto, as alterações observadas parecem ser muito menos pronunciadas do que ocorre em átrio direito (SPADARI-BRATFISCH et al., 1999). Esta diferença é coerente com as especificidades dos dois tecidos bem como também com as características de inervação dos mesmos. Por exemplo, a densidade da inervação adrenérgica é maior em tecido atrial direito do que esquerdo. Assim sendo, quando ocorre aumento da atividade simpática, como no estresse, os miócitos do átrio direito estariam submetidos a uma maior estimulação pelo neurotransmissor noradrenalina do que os miócitos atriais esquerdos. Este fato já poderia explicar a diferença de intensidade dos efeitos do estresse sobre os dois tecidos.

O papel fisiológico do átrio esquerdo na dinâmica de enchimento do ventrículo esquerdo, especialmente durante o período de contração atrial (GUYTON e HALL, 1996; LI et al., 1994, 1999) justificaria a necessidade evolutiva de proteção deste tecido contra alterações marcantes de densidade e subtipos de receptores. De fato, durante a fase diastólica, o átrio e o ventrículo esquerdo tornam-se uma câmara comum, desde que não haja disfunção de válvula mitral (LI et al., 1999). Até algum tempo atrás, esta função do átrio esquerdo estava esquecida, mas recentes estudos relatam que em estados patológicos como fibrilação atrial, estenose de válvula mitral, coarctação de aorta e até mesmo após processos de cardioversão, pode haver prejuízo desta função acessória do átrio esquerdo, com formação de trombos na câmara atrial esquerda, que teriam como conseqüências tardias a instalação de hipertensão pulmonar e ventricular direita,

falência cardíaca congestiva e embolia (POLLICK e TAYLOR, 1991; LI et al., 1994, 1999; NOSAKA et al., 1999; TÜKEK et al., 2001). As células endoteliais endocárdicas (EECs), bem como células endoteliais vasculares (VECs), produzem substâncias vasoativas como PGI_2 (MEBAZAA et al., 1993a), EDRF (NO; BRUTSAERT, 1989), fator de contração miocárdico, também chamado de “endocardina” (SMITH et al., 1991) e endotelina (MEBAZAA et al., 1993b). Acredita-se que as EECs, podem modular a contração miocárdica e prevenir a formação intraventricular de trombos (NOSAKA et al., 1997), uma vez que a incidência de formação de trombos é mais comum em átrio esquerdo que nas demais câmaras cardíacas (WALLER et al., 1995). Uma possível causa para esse problema, seria o fato de o átrio esquerdo produzir menos PGI_2 que as demais câmaras cardíacas (NOSAKA et al., 1999).

Levando em conta estas peculiaridades do átrio esquerdo e os resultados obtidos, nós sugerimos que o comportamento desta câmara cardíaca não difere daquela do átrio direito (BASSANI e DE MORAES, 1987, 1988; VANDERLEI et al., 1996; MARCONDES et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al., 1999) no que se refere aos mecanismos adaptativos ao estresse envolvendo os adrenoreceptores β_2 . Nossos resultados também sugerem que a população de adrenoreceptores do átrio esquerdo de ratos controle é heterogênea e sofre modificações em átrio esquerdo de ratos submetidos a estresse por choques nas patas.

6 CONCLUSÕES

- A população de adrenocetores em átrio esquerdo de ratos controle e de ratos submetidos a estresse por choque nas patas é heterogênea.
- A supersensibilidade da resposta inotrópica à isoprenalina em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse é mediada por um aumento da participação de adrenocetores do subtipo β_2 .
- O mecanismo adaptativo ao estresse envolvendo a resposta mediada pelo subtipo β_2 de adrenocetor em átrios esquerdos isolados de ratos, parece ser similar àquele descrito em átrio direito de ratos e de ratas sacrificadas em diestro.
- Adrenocetores β_3 parecem mediar uma resposta inotrópica negativa em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse.
- O CGP12177 elicia resposta inotrópica positiva em átrios esquerdos isolados de ratos controle e de ratos submetidos a estresse e, esta não se altera com o estresse.
- Átrios esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas são mais propensos a desenvolver arritmias mediadas pelo CGP12177 do que átrios esquerdos isolados de ratos controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLQUIST, R. P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 153, p. 586-600, 1948.

ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* v.14, p. 48-58, 1959.

BALLIGAND, J. L. Regulation of β -adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc. Res.*, v. 43, p. 607-620, 1999.

BALLIGAND, J. L.; FERON, O.; KELLY, R. A. Role of nitric oxide in myocardial function. In: IGNARRO, L. J. **Nitric oxide: biology and pathobiology**. San Diego: Academic Press: 2000. p. 585-607. chap. 36.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanism. *Trends. Pharmacol. Sci.*, v. 14, p. 436-441, 1993.

BASSANI, R. A.; DE MORAES, S. Subsensitivity to β -adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock stressed rats. *Gen. Pharmacol.*, v. 18, p. 473-477, 1987.

———. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 246, p. 316-321, 1988.

BERKOWITZ, D. E.; NARDONE, N. A.; SMILEY, R. M.; PRICE, D. T.; KREUTTER, D. K.; FREMEAU, R. T.; SCHWINN, D. A. Distribution of β_3 -adrenoceptor mRNA in human tissues. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 289, p. 223-228, 1995.

BESSE, J. C.; FURCHGOTT, R. F. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 197, p. 66-78, 1976.

BILSK, A. J.; HALLIDAY, S. E.; FITZGERALD, J. D.; WALE, J. L. The pharmacology of a β_2 -selective adrenoceptor antagonist (ICI118,551). *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 5, p. 430-437, 1983.

BLINKS, J. R. Convenient apparatus for recording contractions of isolated muscle. *J. Appl. Physiol.*, v. 20, p. 755-757, 1965.

BOHM, M.; GIERSECHIK, P.; JAKOBS, K. H.; PIESKE, B.; SCHNABEL, P.; UNGERER, M.; ERDMANN, E. Increase of G_i in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, v. 82, p. 1249-1265, 1990.

———.; ESCHENHAGEN, T.; GIERSECHIK, P.; LARISCH, K.; LENSCH, H.; MENDE, U.; SCHMITZ, W.; SCHNABEL, P.; SCHOLZ, H.; STEINFATH, M.; ERDMANN, E. Radioimmunochemical quantification of G_i in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 26, p.133-149, 1994a.

———.; LOHSE, M. J. Quantification of β -adrenoceptors and β -adrenoceptor kinase on protein and mRNA levels in heart failure. *Eur. Heart J.*, v. 15, p. 30-34, 1994b.

———.; KIRCHMAYR, R.; ERDMANN, E. Myocardial G_i -protein levels in patients with hypertensive cardiac hypertrophy, ischemic heart disease and cardiogenic shock. *Cardiovasc. Res.*, v. 30, p. 611-618, 1995.

BONISCH, H.; TRENDLENBURG, U. Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 283, p. 191-218, 1974.

BRODDE, O. E. β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.*, v. 43, p. 203-242, 1991.

———.; ZERKOWSKI, H. R.; SCHRANZ, D.; BROEDE-SITZ, A.; MICHEL-REHER, M.; SCHAFER-BEISENBUSCH, E.; PIOTROWSKI, J. A.; OELERT, H. Age-dependent changes in the β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 26, p. 20–26, 1995.

———.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.*, vol. 51, p. 651-681, 1999.

BRUTSAERT, D. L. The endocardium. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 51, p. 263-273, 1989.

CALLIA, M. L.; DE MORAES, S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 230, p. 450-454, 1984.

CANNON, W. B. *The wisdom of the body*. New York: Norton, p. 228, 1939.

CARLSSON, E.; ABLAD, B.; BRANDSTROM, A.; CARLSSON, B. Differentiated blockade of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. *Life Sci.*, n. 11, p. 953-958, 1972.

CHAUDRY, A.; McKENZIE, R. G.; GEORGIC, L. M.; GRANNEMAN, J. G. Differential interaction of β_1 - and β_3 -adrenergic receptors with G_i in rat adipocytes. *Cell Signal*, v. 6, p. 457-465, 1994.

CHIU, P.; COOK, S. J.; SMALL, R. C. β -adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K^+ -channels in bovine tracheal muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 109, p. 1149-1156, 1993.

CHUNG, F. Z.; LENTES, K. U.; GOCAYNE, J.; FITZGERALD, M.; ROBINSON, D.; KERLAVAGE, A. R.; FRASER, C. M.; VENTER, J. C. Cloning and sequence analysis of the human brain β -adrenergic receptor. *FEBS Lett.*, v. 211, p. 200-206, 1987.

CLAPHAM, D. E. Direct G protein activation of ion channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 17, p. 441-464, 1994.

COLLINS, S.; OSTROWSKI, J.; LEFKOWITZ, R. J. Cloning and sequence analysis of the human beta 1-adrenergic receptor 5'-flanking promoter region. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1172, p. 171-174, 1993.

COOK, S. J.; SMALL, R. C.; BERRY, J. L.; CHIU, P.; DOWING, S. J.; FOSTER, R. W. β -adrenoceptor subtypes and plasmalemmal K^+ -channels in trachealis muscle. *Br. J. Pharmacol.*, v. 109, p. 1140-1148, 1993.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. Switching of coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, v. 390, p. 88-91, 1997.

DIXON, R. A. F.; KOBILKA, B. K.; STRADER, D. J.; BENOVIC, J. L.; DOHLMAN, H. G.; FRIELLE, T.; BOLANOWSKI, M. A.; BENNETT, C. D.; RANDS, E.; DIEHL, R. E. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, v. 321, p75-79, 1986.

EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M. M.; PATEY, G.; TATE, K.; De LAVIER-KLUTCHKO, C.; STROSBERG, A. D. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, v. 245, p. 118-1121, 1989.

EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; DELAVIER-KLUTCHKO, C.; KAVERI, S. V.; DURIEU-TRAUTMANN, O.; STROSBERG, A. D. Structure of the gene for human β_2 -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 6995-6999, 1987.

EULER, V. S.; FRANCKSSON, C.; HELLSTRO, J. Adrenaline and noradrenaline output in urine after unilateral and bilateral adrenalectomy in man. ***Acta Physiol. Scand.***, v. 31, p. 1-5, 1954.

FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; WOLF-NUNES, V.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. ***J. Lipid Res.***, v. 40, p. 1-8, 1999.

FÈVE, B.; EMORINE, L. J.; BRIEND-SUTREN, M.; LASNIER, F.; STROSBERG, A. D.; PAIRAULT, J. Differential regulation of β_1 - and β_2 -adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. ***J. Biol. Chem.***, v. 265, p. 16343-16349, 1990.

FOSTER, S. J.; HARDEN, T. K. Dexamethasone increases β -adrenoceptor density in human astrocytoma cells. ***Biochem. Pharmacol.***, v. 29, p. 2151-2153, 1980.

FRASER, C. M.; VENTER, J. C. The synthesis of beta-adrenergic receptors in cultured human being cells induced by glucocorticoids. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, v. 94, p. 390-397, 1980.

FREESTONE, N. S.; HEUBACH, J. F.; WETTWER, E.; RAVENS, U.; BROWN, D.; KAUMANN, A. J. β_4 -adrenoceptors are more effective than β_1 -adrenoceptors in mediating arrhythmic Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes. ***Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*** v. 360, p. 445-456, 1999.

FRIELLE, T.; COLLINS, S.; DANIEL, K. W.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J.; KOBILKA, B. K. Cloning of the cDNA for the human β_1 -adrenergic receptor. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** v. 84, p. 7920-7924, 1987.

FURCHGOTT, R. F.; BURSZTYN, P. Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. ***Ann. N. Y. Acad. Sci.***, v. 144, p. 882-889, 1967.

GAUTHIER, C.; TAVERNIER, G.; CHARPENTIER, F.; LANGIN, D.; MAREC, H. L. Functional β_3 -adrenoceptors in the human heart. *J. Clin. Invest.*, v. 98, p. 556-562, 1996.

———.; LEBLAIS, V.; KOBZIC, L.; TROCHU, J. N.; KHANDOUDI, N.; BRIL, A.; BALLIGAND, J. L.; LE MAREC, H. The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.*, v. 102, p. 1377-1384, 1998.

———.; LANGIN, D.; BALLIGAND, J. L. β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends. Pharmacol. Sci.*, v. 21, p. 426-431, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Heart muscle: the heart as a pump*. In: ———. **Textbook of medical physiology**. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 107-119.

HARDING, S. E. Lack of evidence for β_3 -adrenoceptor modulation of contractile function in human ventricular myocytes. *Circulation*, v. 96, suppl., p. I-53, 1997.

IVERSEN, L. L.; SALT, P. J. Inhibition of catecholamine uptake₂ by steroids in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol.*, v. 40, p. 528-530, 1970.

———.; WILSON, H. A. Inhibition of catecholamines uptake in isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.*, v. 46, p. 647-657, 1972.

JOHNSON, M. The β -adrenoceptor. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, v. 158, p. s146-s153, 1998.

JUBERG, E. N.; MINNEMAN, K. P.; ABEL, P. W. β_1 - and β_2 -adrenoceptor binding and functional responses in right and left atria of rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 330, p. 193-202, 1985.

KAUMANN, A. J. Is there a third heart β -adrenoceptor? *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 10, p. 316-320, 1989.

———. Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 18, p. 71-76, 1997.

———.; FREESTONE, N. Atypical β -adrenoceptor activation by (-)-CGP 12177 increases cytosolic calcium in rat ventricular myocytes. *The Pharmacologist*, v. 39, 1997.

———.; LYNHAM, J. A. (-)-CGP 12177 stimulates cyclic AMP-dependent protein kinase in rat atria through atypical β -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.*, v. 120, p. 1187-1189, 1997.

———.; MOLENAR, P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, v. 118, p. 2085-2098, 1996.

———.; MOLENAAR, P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 355, p. 667-681, 1997.

———.; HALL, J. A.; MURRAY, K. J.; WELLS, F. C.; BROWN, M. J. A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of β_1 - and β_2 -adrenoceptor in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. *Eur. Heart J.* v. 10, p. 29-37, 1989.

———.; ENGELHARDT, S.; HEIN, L. Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptor four putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 363, p. 87-93, 2001.

KENAKIN, T. Competitive antagonism. In: ———. *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. 2th ed. New York: Raven Press. 1993. chap. 9, p. 278-322.

KIKKAWA, H.; NAITO, K.; IKESAWA, K. Tracheal relaxing effects and β_2 -selectivity of TA-2005, a newly developed bronchodilating agent, in isolated guinea pig tissues. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 57, p. 175-85, 1991.

———.; ISOGAYA, M.; NAGAO, T.; KUROSE, H. The role of the seventh transmembrane region in high affinity binding of a β_2 -selective agonist TA-2005. *Mol. Pharmacol.*, v. 53, p. 128-134, 1998.

KILTS, J. D.; GERHARDT, M. A.; RICHARDSON, M. D.; SREERAM, G.; MACKENSEN, G. B.; GROCOTT, H. P.; WHITE, W. D.; DAVIS, R. D.; NEWMAN, M. F.; REVES, J. G.; SCHWINN, D. A.; KWATRA, M. M. β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both Gs and Gi. *Circ. Res.* v. 87, p. 17-21, 2000.

KOMPA, A. R.; SUMMERS, R. J. Desensitization and resensitization of β_1 - and putative β_4 -adrenoceptor mediated responses occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Br. J. Pharmacol.*, v. 128, p. 1399-1406, 1999.

KRIEF, S.; LÖNNQVIST, F.; RAIMBAULT, S.; BANDE, B.; VAN SPRONSEN, A.; ARNER, P.; STROSBERG, D.; RICQUIER, D.; EMORINE, L. J. Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 344-349, 1993.

KUSCHEL, M.; ZHOU, Y. Y.; CHENG, H.; ZHANG, S. J.; CHEN, Y.; LAKATTA, E. G.; XIAO, R. P. Gi protein-mediated functional compartmentalization of cardiac β_2 -adrenergic signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 22048-22052, 1999.

LANDS, A. M.; ARNOLD, A.; McAULIF, J. P.; LUDUENHA, F. P.; BROWN, T. G. Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, v. 214, p. 597-598, 1967.

LEFKOWITZ, R. J.; CARON, M. G. Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Recent Prog. Horm. Res.*, v. 43, p. 469-497, 1984.

LEMOINE, H.; KAUMANN, A. J. A model for the interaction of competitive antagonists with two receptor-subtypes characterized by Schild-plot with apparent slope unity. Agonist-dependent enantiomeric affinity ratios for bupranolol in tracheae but not in right atria of guinea pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 322, p. 11-120, 1983.

LI, Y. H.; LAI, L. P.; SHYU, K. G.; HWANG, J. J.; MA, H. M.; KO, Y. L.; KUAN, P.; LIEN, W. P. Clinical implications of left atrial appendage function: its influence on thrombus formation. *Int. J. Cardiol.*, v. 43, p. 43-61, 1994.

———.; TSAI, L. M.; TSAI, W. C.; CHAO, T. H.; LIN, L. J.; CHEN, J. H. Decreased left atrial appendage function is an important predictor of elevated left ventricular filling pressure in patients with congestive heart failure. *Int. J. Cardiol.*, v. 68, p. 39-45, 1999.

LI, D.; ZHANG, L.; KNELLER, J.; NATTEL, S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ. Res.* v. 88, p. 1168-1175, 2001.

LOWE, M. D.; GRACE, A. A.; VANDENBERG, J. I.; KAUMANN, A. J. Action potential shortening through the putative β_4 -adrenoceptor in ferret ventricle: comparison with β_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated effects. *Br. J. Pharmacol.*, v. 124, p. 1341-1344, 1998.

———.; GRACE, A. A.; KAUMANN, A. J. Blockade of putative β_4 -adrenoceptor and β_1 -adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. ***Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.***, v. 359, p. 400-403, 1999.

———.; LYANHAM J. A.; GRACE, A. A.; KAUMANN, A. J. Comparison of the affinity of beta-blockers for two states of the β_1 -adrenoceptor in ferret ventricular myocardium. ***Br. J. Pharmacol.***, v. 135, p. 451-461, 2002.

MALINOWSKA, B.; SCHLICHER, E. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors. ***Br. J. Pharmacol.***, v. 117, p. 943-949, 1996.

MARCONDES, F. K.; VANDERLEI, L. C. M.; LANZA, L. L. B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. ***Can. J. Physiol. Pharmacol.***, v. 74, p. 663-669, 1996.

MEBAZAA, A.; MARTIN, L. D.; ROBOTHAMA, J. L.; MAEDA, K.; GABRIELSON, E. W.; WETZEL, R. C. Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE_2 . ***J. Mol. Cell. Cardiol.***, v. 25, p. 245-248, 1993a.

———.; MAYOUX, E.; MAEDA, K.; MARTIN, L. D.; LAKATTA, E. G.; ROBOTHAM, J. L.; SHAH, A. M. Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. ***Am. J. Physiol.***, v. 265, p. H1841-H1846, 1993b.

MEERSON, F. Z. **Adaptation, stress and prophylaxis**. Berlin: *Springer-Verlag*. 1984. 329 p.

MINNEMAN, K. P.; HEGSTRAND, L. R. K.; MOLINOFF, P. B. Simultaneous determination of β_1 - and β_2 -adrenoceptor in tissues containing both subtypes. ***Mol. Pharmacol.***, v. 16, p. 34-46, 1979.

MOLENAAR, P.; SUMMERS, R. J. Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in guinea-pigs atrium: functional and receptor binding studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 241, p. 1041-1047, 1987.

———.; SARSERO, D.; KAUMANN, A. J. Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the 'putative beta 4-adrenoceptor' in mammalian heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 24, p. 647-656, 1997.

MONTE, F. del; KAUMANN, A. J.; POOLE-WILSON, P. A.; WYNNE, D. G.; PEPPER, J.; HARDING, S. E. Coexistence of functioning β_1 - and β_2 -adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation*, v. 88, p. 854-863, 1993.

NORRIS, J. S.; BROWN, P.; COHEN, J.; CORNETT, L. E.; KOHLER, P. O.; MACLEOD, S. L.; POPOVICH, K.; ROBEY, R. B.; SIFFORD, M.; SYMS, A. J. Glucocorticoid induction of beta-adrenergic receptors in the DDT1 MF-2 smooth muscle cell line involves synthesis of new receptor. *Mol. Cel. Biochem.*, v. 74, p. 21-27, 1987.

NOSAKA, S.; HASHIMOTO, M.; SASAKI, T.; KWANSONG, K.; SAITOH, Y.; HANADA, T.; YAMAUCHI, M.; MASUMURA, S.; NAKAYAMA, K.; TAMURA, K. Antithrombotic effects of endocardial endothelial cells-comparison with coronary endothelial cells. *Prostaglandins*, v. 53, p. 305-319, 1997.

———.; HASHIMOTO, M.; SASAKI, T.; HANADA, T.; YAMAUCHI, M.; NAKAYAMA, K.; MASUMURA, S.; TAMURA, K. Left atrial endocardium and prostacyclin. *Prost. Lipid Mediat.*, v. 57, p. 173-178, 1999.

NOURANI, F. R. R.; SPADARI, R. C.; 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.*, v. 23, p. 787-791, 1992.

ONARAN, H. O.; COSTA, T.; RODBARD, D. 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.*, v. 43, p. 245-256, 1993.

PAK, M. D.; FISHMAN, P. H. Anomalous behavior of CGP 12177A on β_1 -adrenergic receptors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, v. 16, p. 1-23, 1996.

PAPAGEORGEOU, P.; MONAHAN, K.; BOYLE, N. G.; SEIFERT, M. J.; BESWICK, P.; ZEBEDE, J.; EPSTEIN, L. M.; JOSEPHSON, M. E. Site-dependent intra-atrial conduction delay: relationship to initiation of atrial fibrillation. *Circulation*, v. 94, p. 384-389, 1996.

PAULUS, W. J.; SHAH, A. M. NO and cardiac diastolic function. *Cardiovasc. Researc.*, v. 43, p. 595-606, 1999.

POLLICK, C.; TAYLOR, D. Assessment of left atrial appendage function by transesophageal echocardiography: implications for the development of thrombus. *Circulation*, v. 84, p. 223-231, 1991.

ROBISON, G. A.; BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 319, p. 703-723, 1967.

ROSEWICZ, S.; MCDONALD, A. R.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D.; MIESFELD, R. L.; LOGSDON, C. D. Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 2581-2584, 1988.

SALT, P. J. Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 20, p. 329-340, 1972.

SANTOS, I. N.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Chronotropic response to ($\pm$)-CGP12177 in right atria of stressed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 79, p. 393-399, 2001.

———. **Receptores de glicocorticóides e subtipos de adrenoceptores β em átrio direito de ratos submetidos a estresse.** 2002. 126 fs. Tese (Doutorado em biologia funcional e molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SARSERO, D.; MOLENAAR, P.; KAUMANN, A. J. Validity of (-)-[3H]-CGP12177A as a radioligand for the "putative β_4 -adrenoceptor" in rat atrium. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 371-380, 1998.

SCARPACE, P. J.; BARESI, L. A.; SANFORD, D. A.; ABRASS, I. B. Desensitization and resensitization of β -adrenergic receptors in a smooth muscle cell line. **Mol. Pharmacol.** v. 28, p. 495-501, 1985.

SCHILD, H.O. pA_2 and competitive drug antagonism. **Br. J. Pharmacol.**, v. 2, p.185, 1947.

SIH, H. J.; BERBARI, E. J.; ZIPES, D. P. Epicardial maps of atrial fibrillation after linear ablation lesions. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** v. 8, p. 1046-1054, 1997.

SELYE, H. **The stress of life.** Auckland: Mc Graw-Hill. 1956. 324 p.

SMITH, J. A.; SHAH, A. M.; LEWIS, M. N. J. Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. **J. Physiol.**, v. 439, p. 1-14, 1991.

SOUZA, A. R. T. **Estresse e sensibilidade às catecolaminas em átrio de cobaia.** 2001. 57 fs. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SPADARI, R. C.; DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmacol.**, v. 19, p. 553-557, 1988.

SPADARI-BRATFISCH, R. C.; SANTOS, I. N.; VANDERLEI, L. C. M.; MARCONDES, F. K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptors in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 77, p. 432-440, 1999.

STROSBERG, A. D. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 37, p. 421-450, 1997.

TÜKEK, T.; ATILGAN, D.; AKKAYA, V.; KUDAT, H.; DEMIREL, S.; OZCAN, M.; KORKUT, F. Assessment of left atrial appendage function and its relationship to pulmonary venous flow pattern by transesophageal echocardiography. *Int. J. Cardiol.* v. 78, p. 121-126, 2001.

VAN ROSSUM, J. M. 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.*, v. 143, n. 3-4, p. 229-330. 1963.

VANDERLEI, L. C. M.; MARCONDES, F. K.; LANZA, L. L. B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to footshock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, p. 619-627, 1996.

VERAGO, J. L.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz J. Med. Biol. Res.* v. 34, p. 1197-1207, 2001.

VOSS, H. P.; O'DONNELL, D.; BAST, A. A. L. T. Atypical molecular pharmacology of a new long-acting β_2 -adrenoceptor agonist, TA 2005. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 227, p. 403-409, 1992.

———.; SHUKRULA, S.; WU, T. S.; O'DONNELL, D.; BAST, A. A. L. T. A functional β_2 -adrenoceptor-mediated chronotropic response in isolated guinea pig heart tissue: selectivity of the potent beta-2 adrenoceptor agonist TA 2005. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 271, p. 386-389, 1994.

WALLER, B. F.; GRIDER, L.; ROHR, T. H.; MCLAUGHLIN, T.; TALIERCIO, C. P.; FETTERS, J. Intracardiac thrombi: frequency, location, etiology and complications: a morphologic review – Part IV. *Clin. Cardiol.*, v. 18, p. 669-674, 1995.

WILLIAMS, L. T.; LEFKOWITZ, R. J.; WATANABE, A. M.; HATHAWAY, D. R.; BOSCH, H. R. Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 2787-2789, 1977.

XIAO, R. P.; JI, X.; LAKATTA, E. G. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, v. 47, p. 322-329, 1995.

———.; AVDONIN, P.; ZHOU, Y. Y.; CHENG, H.; AKHTER, S. A.; ESCHENHANGEN, T.; LEFKOWITZ, R. J.; KOCH, W. J.; LAKATTA, E. G. Coupling of β_2 -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ. Res.*, v. 84, p. 43-52, 1999a.

———.; CHENG, H.; ZHOU, Y. Y.; KUSCHEL, M.; LAKATTA, E. G. Recent advances in cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ. Res.*, v. 85, p. 1092-1100, 1999b.

ZOU, Y.; KOMURO, I.; YAMAZAKI, T.; KUDOH, S.; UOZUMI, H.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 9760-9770, 1999.