



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

ARNALDO FIM NETO

ATIVIDADES INOTRÓPICA E CRONOTRÓPICA DO VASO DORSAL DO INSETO
Tenebrio molitor, LINNAEUS, 1758.

INOTROPIC AND CHRONOTROPIC ACTIVITIES IN THE DORSAL VESSEL OF
THE INSECT *Tenebrio molitor*, LINNAEUS, 1758.

Campinas

2017

ARNALDO FIM NETO

ATIVIDADES INOTRÓPICA E CRONOTRÓPICA DO VASO DORSAL DO INSETO
Tenebrio molitor, LINNAEUS, 1758.

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em ENGENHARIA ELÉTRICA, na área de
ENGENHARIA BIOMÉDICA.*

Orientador: JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Co-orientador: PEDRO XAVIER DE OLIVEIRA

Este exemplar corresponde à versão da tese defendida pelo aluno ARNALDO FIM NETO,
orientada pelo Prof. Dr. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 163911/2012-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

F489a Fim Neto, Arnaldo, 1987-
Atividades inotrópica e cronotrópica do vaso dorsal do inseto *Tenebrio molitor*, LINNAEUS, 1758 / Arnaldo Fim Neto. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani.

Coorientador: Pedro Xavier de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. *Tenebrio*. 2. Serotonina. 3. Atividade inotrópica. 4. Inositol 1,4,5-trifosfato. 5. Retículo sarcoplasmático. I. Bassani, José Wilson Magalhães, 1953-. II. Oliveira, Pedro Xavier de, 1975-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inotropic and chronotropic activities in the dorsal vessel of the *Tenebrio molitor*, LINNAEUS, 1758

Palavras-chave em inglês:

Tenebrio

Serotonin

Inotropic activity

Inositol 1,4,5-triphosphate

Sarcoplasmic reticulum

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

José Wilson Magalhães Bassani [Orientador]

Carolina Reigada Montoya

Guilherme Gomes

Patrícia Jacqueline Thyssen

Antônio Augusto Fasolo Quevedo

Data de defesa: 21-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA – TESE DE DOUTORADO

Candidato: Arnaldo Fim Neto RA: 108806

Data da Defesa: 21 de Junho de 2017

Título da Tese: “Atividades Inotrópica e Cronotrópica do Vaso Dorsal do Inseto *Tenebrio molitor*, Linnaeus, 1758”

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente, FEEC/UNICAMP)

Profa. Dra. Carolina Reigada Montoya (UFSCAR)

Dr. Guilherme Gomes (UFSCAR)

Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen (IB/UNICAMP)

Prof. Dr. Antonio Augusto Fasolo Quevedo (FEEC/UNICAMP)

A ata de defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Julgadora, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

*Dedico, com muito carinho, este trabalho à minha
primeira Professora, minha Mãe Rita de Cássia Silva.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rita de Cássia Silva e Ademir de Albuquerque Fim, e à minha avó Diva de Albuquerque Fim por sempre terem me incentivado a estudar.

Ao meu orientador José Wilson Magalhães Bassani pela oportunidade e orientação.

Ao meu co-orientador Pedro Xavier de Oliveira pela orientação ao desenvolvimento da parte de instrumentação do presente trabalho.

À professora Rosana Almada Bassani pelo constante apoio ao desenvolvimento da parte de experimentação do presente trabalho.

Aos alunos e ex-alunos do Departamento de Engenharia Biomédica e aos colegas de laboratório pelas sugestões: Carlos A. Ferri, João C. M. de Almeida, Marcelo de A. Viana, Marco A. G. Santos e Natália F. Oshiyama.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, especialmente à Adriana C. Cavalcanti, à Elizângela S. de Oliveira, à Larissa R. K. Bueno, à Tônia Márcia de Campos, e à Raffaella Ignarro.

Aos meus colegas da República Pasárgada pelos bons momentos.

Aos meus amigos que sempre torceram pelo desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus familiares.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Samuel, Maria Vitória e Ana Júlia que nunca deixavam de fazer uma festa quando eu voltava para casa.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo nº: 163911/2012-6.

RESUMO

O vaso dorsal do inseto tem sido proposto como novo modelo animal para estudo do funcionamento do coração de vertebrados devido às múltiplas semelhanças genéticas, moleculares e fisiológicas que guardam um com o outro. O vaso dorsal do *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758; Insecta, Coleoptera) apresenta atividades crono e inotrópica dependentes de um retículo sarcoplasmático (RS) funcionalmente ativo que também é essencial durante o efeito cronotrópico positivo exercido pelo agonista serotonina (5-HT). O objetivo do presente trabalho foi estudar, com uma abordagem farmacológica, alguns mecanismos (vias de sinalização e receptores) modulados pela 5-HT no coleóptero. Além disso, foi possível estudar outras fontes de influxo de Ca^{2+} do sarcolema reguladores da atividade inotrópica, que, em contraste com a atividade espontânea, tem sido bem menos estudada. Para estas finalidades, foi desenvolvida uma ferramenta computacional na plataforma Labview para se extrair o diâmetro luminal e a frequência cardíaca (FC) durante aquisição de vídeo e perfusão da preparação *in situ* do besouro. Os principais resultados encontrados foram: a) tratamento do vaso dorsal com o antagonista dos receptores 5-HT₂ (5-HT₂R) exerceu um desvio na curva concentração-efeito à 5-HT. A sensibilidade da preparação ao agonista diminuiu progressivamente durante aumento da concentração do antagonista, mas não ocorreram modificações na resposta cronotrópica máxima (R_{max}); b) a R_{max} à 5-HT foi diminuída durante perfusão das preparações com 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), um inibidor não seletivo dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfatado; c) a FC durante concomitante exposição a 100 nM de 5-HT e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 50 μM) foi ligeiramente maior (~40 %) do que a plena exposição ao IBMX, o que sugeriu a participação do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) na via serotoninérgica; d) o efeito cronotrópico positivo ao IBMX foi possivelmente independente da inibição de receptores de adenosina (ADOR), pois o vaso dorsal apresentou efeito cronotrópico positivo à adenosina (ADO). A sensibilidade a ADO diminuiu durante exposição ao antagonista do ADOR que medeia os níveis citosólicos de AMPc, o que realçou a participação do nucleotídeo na atividade espontânea; e) foi demonstrado, quando as preparações foram estimuladas eletricamente e expostas simultaneamente ao *thapsigargin*, D600 e KB-R7943, que o influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} tipo-L, mas não pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, em associação com a liberação de Ca^{2+} do RS são fontes primárias na regulação da amplitude de contração. Do presente trabalho pôde-se concluir que este foi o primeiro estudo da regulação de canais de Ca^{2+} do sarcolema na atividade inotrópica no coração de insetos. Além disso, segundos mensageiros como AMPc e inositol 1,4,5-trifosfatado, este mobilizado pela ativação de 5-HT₂R, estão envolvidos na via serotoninérgica no vaso dorsal do *T. molitor*.

Palavras-chave: atividade espontânea, atividade inotrópica, canais de Ca^{2+} tipo-L, inositol 1,4,5-trifosfatado, monofosfato cíclico de adenosina, receptor 5-HT₂, retículo sarcoplasmático, serotonina, *Tenebrio molitor*, vaso dorsal.

ABSTRACT

The dorsal vessel from insects has been proposed as an emergent model to understand the physiopathology of the heart due to multiplies genetic, molecular and physiology features with vertebrates as, for instance, chronotropic and inotropic activity regulated by a functional sarcoplasmic reticulum (SR), particularly in *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758; Insecta, Coleoptera), which is also fundamental for responsiveness of the dorsal vessel spontaneous rhythm to agonist serotonin (5-HT). The present study aimed at investigating, with a pharmacological approach, some underlying mechanisms (signaling pathways and receptors) into the positive chronotropic response of the dorsal vessel of the *Tenebrio molitor* to 5-HT. Moreover, other Ca^{2+} sources involved in inotropic activity, whose more substantial information still lacks, were studied. A computer program was developed in Labview 11.0 platform in order to extract the luminal diameter and the heart rate (HR) during real-time videos recording of the perfused *in situ* preparation. The main results were: a) dorsal vessel treatment with the 5-HT₂ receptor antagonist (5-HT₂R) produced a rightward shift of the 5-HT concentration-response curve, by diminishing the sensitivity progressively during increments of the antagonist concentrations, but without modifying the maximum chronotropic response (R_{max}); b) R_{max} to agonist was depressed during perfusion with 2-aminoethoxydiphenyl borate, a non-selective inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor inhibitor; c) the HR during combined exposure to 100 nM of 5-HT plus the 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 50 μM), was slightly greater ($\sim 40\%$) than solely the exposure to IBMX, suggesting also the involvement of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in serotonergic pathway; d) the positive chronotropic effect of IBMX was regardless of the adenosine (ADO) receptor (ADOR) inhibition, once the preparation presented a positive chronotropic response to ADO, whereas the sensitivity to agonist decreased at two concentrations of ADOR-mediated cAMP stimulation antagonist, further highlighting the importance of cAMP cytosolic levels in driving spontaneous rhythm; e) the combined exposure to thapsigargin, D600 and KB-R7943 in a subset of preparations underwent to electrical stimulus unveiled that Ca^{2+} influx via L-type Ca^{2+} channels, but not via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, synergistically with SR regulates the systolic variation in the luminal diameter. In conclusion, this the first demonstration of inotropic activity regulation in insects via Ca^{2+} sources from sarcolemma. Furthermore, the serotonergic pathway involved in positive chronotropic response in beetle is dually coupled to cytosolic mobilization of cAMP and IP₃, this last activated via 5-HT₂R.

Keywords: 5-HT₂ receptor, cyclic adenosine monophosphate, dorsal vessel, inositol 1,4,5-triphosphate, inotropic activity, L-type Ca^{2+} channel, sarcoplasmic reticulum, serotonin, spontaneous rhythm, *Tenebrio molitor*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1 - Resumo simplificado das possíveis vias (com os respectivos receptores) ativadas pela 5-HT em um miócito de mamífero. P: grupo fosfato. Ver texto para detalhes.....24
- Figura 3.1 - A: O coleóptero *T. molitor*. B: Fixação da preparação em uma câmara de perfusão. O vaso dorsal, constituído pelas regiões cefálica (aorta) e abdominal (coração), está localizado na região central do inseto conforme indicam as duas setas bidirecionais.30
- Figura 3.2 – Sistema de geração e aquisição de vídeos da atividade contrátil do coração do *T. molitor*. A: câmara de perfusão no sistema de movimentação tipo charriot; B: seringa de perfusão; C: fonte de luz halógena; D: conjunto de lentes; E: câmera de vídeo; F: notebook com o programa de computador na plataforma Labview versão 11.0.....32
- Figura 3.3 – Quadros de um vídeo do coração da espécie *T. molitor* durante a diástole (A) e durante a sístole (B). A região entre os círculos (bordas, distância entre 1-2 e 3-4 em cada quadro) corresponde ao diâmetro luminal do coração. Número de pixels que correspondem a 100 μm está descrito em B de mesma escala em A.....33
- Figura 3.4 - Fluxograma de funcionamento do programa de computador. A: fluxograma do código principal do programa de computador. As letras B, C, D e E indicam ações paralelas que são feitas durante cliques na interface pelo usuário para atualizar algumas ações do programa de computador.34
- Figura 3.5 – Resumo do protocolo experimental para se investigar as fontes do íon Ca^{2+} envolvidas na origem das atividades crono e inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor*. Durante todo experimento, foi utilizada uma baixa $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5 mM). Após a medição da FC (bpm) na fase pré-estimulação em 0,8 Hz (medição de FS), estes mesmos parâmetros foram novamente calculados após tratamento das preparações por 30 min com thapsigargin (TG). A inibição da ATPase de Ca^{2+} do RS por TG é irreversível, por isso seu efeito se mantém até ao final do experimento (barra cinza). Assim, as preparações foram sucessivamente tratadas com D600 e com KB-R7943 para novas medições dos parâmetros. Durante estimulação, também foram calculados os t_{contr} e $t_{0,5\text{-relax}}$35
- Figura 3.6 – Ilustração dos protocolos para se determinar a influência da inibição das fosfodiesterases na atividade cronotrópica do vaso dorsal do coleóptero sem e durante perfusão com 100 nM de 5-HT. No protocolo incub IBMX + lavagem (A), após medição da frequência basal (CTR), o vaso dorsal foi incubado com 50 μM de IBMX (20 min), mas sem perfusão (20 min) com o fármaco em STM no restante do experimento. No entanto, no

protocolo incub + Perf IBMX (B) as preparações, além de serem incubadas com IBMX, também foram perfundidas com o fármaco após incubação e também durante perfusão em STM contendo 100 nM de 5-HT. Durante perfusão (20 min) após incubação com IBMX, foram medidas as FC espontâneas após 3, 5, 10, 15 e 20 (estabilização) min de perfusão.....38

Figura 4.1 – Interface do programa de computador para monitoramento do diâmetro luminal e de registro dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do coração do T. molitor. A: Está ilustrada a interface em um momento imediato após o usuário ligar o programa de computador. Estão mostrados: (1) campo de seleção da câmera de vídeo; (2) botão para ligar o programa de computador; (3) caixa de diálogo para o usuário nomear o arquivo de vídeo (neste caso nomeado como online processing.txt); (4) cronômetro que mostra a data e o horário; (5) monitor de tempo de aquisição entre dois quadros consecutivos (s); (6) monitor da mudança da taxa de aquisição de quadros (fps, quadros por segundo); (7) chave booleana para gravação em um arquivo de texto do registro do diâmetro luminal ao longo do tempo e também do arquivo de vídeo correspondente. A chave está representada para baixo nesta ilustração, e, portanto, não está gravando nem o registro nem o arquivo de vídeo; (8) botão para desligar o programa de computador. B: Caixa de diálogo que aparece na interface quando a chave booleana for acionada (para cima) para nomear o arquivo de vídeo (nomeado como Video) a ser criado pelo programa.42

Figura 4.2 - Interface do programa de computador desenvolvido em Labview versão 11.0. Nesta ilustração está detalhado como o usuário pode extrair o diâmetro luminal do coração a partir da ROI no sinal de vídeo e também mostra onde estão exibidos os parâmetros da atividade contrátil do coração do T. molitor. Estão indicados: (1) ROI; (2) sinal de vídeo; (3) posições do início e do fim da ROI na Largura (Width) e na Altura (Height) do sinal de vídeo; (4) comprimento da ROI em pixels; (5) comprimento da ROI em micrômetros; (6) gráfico de intensidade luminosa para cada pixel da ROI; (7) número de pixels do filtro média móvel para filtragem do sinal exibido em 6; (8) valor de intensidade luminosa para contagem de pixels acima deste limiar; (9) constante numérica que converte o número de pixels contados acima do limiar para micrômetros; (10) sinal do diâmetro luminal ao longo dos últimos 300 quadros (10 s para uma taxa de aquisição de quadros constante em 30 quadros por segundo); (11) botão para pausar o sinal em 10; (12) tempo extraído da posição do cursor vertical no sinal; (13) diâmetro luminal extraído da posição do cursor horizontal no sinal; (14) número de vales detectados abaixo do cursor horizontal no sinal; (15) frequência cardíaca extraída a partir do sinal.....44

Figura 4.3 – Registro da variação do diâmetro luminal (μm) vs. tempo (s) do coração durante atividade espontânea. O registro foi obtido a partir de um trecho específico do arquivo de texto gerado pelo programa de computador e que foi exportado para o software GraphPad Prism para então gerar e exibir o registro apresentado.....44

Figura 4.4 - Versão offline do programa de computador para medição do diâmetro luminal e dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do coração do T. molitor. A: está ilustrada a interface do programa, que possui em sua maioria os ícones da interface apresentadas nas Figuras 4.1 e 4.2. B: caixa de diálogo que aparece na interface do programa para que o usuário acesse o arquivo de vídeo a ser reanalisado. C: caixa de diálogo que também aparece na interface para que o usuário nomeie o novo arquivo de texto gerado pela versão offline do programa de computador contendo os valores do diâmetro luminal ao longo do tempo.46

Figura 4.5 - Efeitos da inibição simultânea da ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a) e dos canais de Ca^{2+} tipo-L no coração do T. molitor. A: Contrações (apresentadas como redução do diâmetro luminal (μm)) durante estimulação elétrica em 0,8 Hz (registro das contrações à esquerda, CTR), após incubação com 10 μM de thapsigargin e perfusão em STM (registro das contrações ao centro, thapsigargin) e durante perfusão com 10 μM de D600 (registro das contrações à direita, thapsigargin + D600). B: Amplitude de contrações do coração durante relaxamento, cujos valores, medidos em cada tempo e normalizados pelo diâmetro luminal sistólico (ESD), são exibidos antes (traçado contínuo preto, CTR) e depois da inibição da SERCA2a (traçado contínuo vermelho, thapsigargin). C: FS foi reduzida durante estabilização do efeito do thapsigargin e a média da FS diminuiu um pouco mais durante perfusão com D600. Valores são apresentados como média \pm erro padrão (N = 11). *: Diferença significativa para o CTR (P < 0,05; teste de Bonferroni); #: Diferença significativa para o thapsigargin (P < 0,05; Teste de Bonferroni). N = 11.47

Figura 4.6 - Efeitos da inibição simultânea da ATPase de Ca^{2+} do RS e dos canais de Ca^{2+} tipo-L na atividade cronotrópica espontânea (antes da estimulação em 0,8 Hz) do coração do T. molitor. *Diferença significativa para o grupo CTR (P < 0,05; teste de Bonferroni); #: Diferença significativa para o grupo thapsigargin (P < 0,05; Teste de bonferroni). N = 15....48

Figura 4.7 - Monitoramento do diâmetro luminal (μm) por 10 s em STM contendo 1 nM (parte esquerda) e 100 nM (parte direita) de 5-HT. FC basal do vaso dorsal foi de 56 bpm, valor medido que se manteve durante perfusão contendo 1 nM de 5-HT na STM. A FC do vaso dorsal aumentou para 72 bpm durante perfusão em STM contendo 100 nM de 5-HT....49

Figura 4.8 - Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal à 5-HT expressa em bpm para cada concentração de 5-HT. A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência antes da adição do agonista. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na Tabela 4.2.	50
Figura 4.9 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 3 concentrações do antagonista KET. A: Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de 5-HT. A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência após estabilização da FC na presença do antagonista e imediatamente antes da adição do agonista. B: Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax para melhor realçar modificações na sensibilidade à 5-HT. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax da CCE podem ser encontrados na Tabela 4.2 e também na Tabela 4.4.	52
Figura 4.10 - Gráfico de Schild para o antagonismo exercido pela ketanserina (KET) sobre o efeito cronotrópico positivo da 5-HT no vaso dorsal do T. molitor. (DR: razão das concentrações equiefetivas).	53
Figura 4.11 - Monitoramento do diâmetro luminal do vaso dorsal do T. molitor durante exposição prolongada ao 2-APB. A: Exposição a 80 μ M de 2-APB. CTR corresponde a um trecho do registro em que a FC basal do vaso dorsal estabilizou. É notável que após um período de tempo a contração do vaso dorsal cessa. B: Exposição a 10 μ M de 2-APB. As contrações não cessaram nessa concentração de 2-APB, mas pode ser observado um padrão irregular da atividade contrátil em um tempo de exposição prolongado (> 40 min) ao inibidor.	54
Figura 4.12 - Monitoramento do diâmetro luminal (μ m) do vaso dorsal do T. molitor durante exposição prolongada à baixa concentração de 2-APB. A: Exposição à 2 μ M de 2-APB. CTR corresponde a um trecho do registro em que a FC basal foi estabilizada. Pode ser observado um padrão regular das contrações nesta concentração de 2-APB. B: Exposição de outra preparação à 2 μ M de 2-APB em diferentes concentrações de 5-HT. O padrão regular de contração do vaso dorsal se manteve.	55
Figura 4.13 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 2 concentrações de 2-APB. Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de 5-HT na presença de 10 μ M e de 2 μ M de 2-APB (A). A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência após estabilização com bloqueador do IP3R sem	

adição do agonista. Reposta cronotrópica expressa como % da Rmax para 10 μ M de 2-APB e de 2 μ M (b). Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na Tabela 4.6.56

Figura 4.14 - Monitoramento da FC do vaso dorsal do T. molitor durante 20 min de perfusão (medição da FC em 3, 5, 10, 15 e 20 min) após ser previamente incubado por 20 min em STM contendo 50 μ M de IBMX. Estão demonstradas medições durante perfusão para dois procedimentos: incubação em STM com IBMX seguida de lavagem com STM sem IBMX (inc IBMX + lavagem) e incubação e perfusão com IBMX na STM (inc + perf IBMX). Os pontos indicam média \pm erro padrão. *: Diferença significativa ($P < 0,05$) da FC espontânea medida em tempos prolongados quando comparados os procedimentos (Análise de variância bifatorial).57

Figura 4.15 - FC medida durante perfusão do vaso dorsal (previamente incubado por 20 min com o fármaco) em STM contendo 50 μ M de IBMX. Está mostrada também o resultado da medição de FC durante exposição combinada do vaso dorsal a 100 nM de 5-HT com IBMX. Os pontos indicam média \pm erro padrão. Comparação de médias: *: $P < 0,05$ vs. CTR (Teste de Bonferroni); **: $P < 0,05$ vs. IBMX (Teste de Bonferroni).58

Figura 4.16 - A: Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO. Resposta cronotrópica, expressa em bpm para cada concentração de ADO. B: Resposta cronotrópica do vaso dorsal ao agonista ADO sem e com a presença em STM de duas concentrações do antagonista não seletivo para todos os subtipos de ADOR. Não há desvio para direita da curva CTR durante tratamento da preparação em duas concentrações do antagonista CGS (0,3 e 1 μ M). C: Reposta cronotrópica expressa como % da Rmax. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na Tabela 4.8.60

Figura 4.17 - A: Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO sem e com presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-1 (DPCPX, 1 μ M). Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de ADO. B: Reposta cronotrópica expressa como % da Rmax. O antagonista não desviou a CCE à ADO para direita. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na Tabela 4.9.61

Figura 4.18 – Alteração da resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO pelo antagonista seletivo para ADOR-2a (Zm, 100 nM e 1 μ M). A: Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de ADO. B: Reposta cronotrópica

expressa como % da Rmax. O antagonista desviou a CCE à ADO para a direita nas duas concentrações, mas sem alterar Rmax. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na Tabela 4.10.....62

Figura 4.19 – Após estabilização da FC espontânea do vaso dorsal em STM (CTR), a baixa concentração de Oct (10 fM) diluída em STM não afetou a atividade cronotrópica da preparação. Dados são apresentados como média \pm erro padrão.63

Figura 4.20 – Registros (de 10 s) do diâmetro luminal do vaso dorsal do T. molitor sem (Controle) e com a presença de 10 μ M de Oct (Oct (10 μ M)) em STM. A Oct exerceu um efeito cronotrópico positivo nesta preparação (105 vs. 80 bpm) além de exercer um ligeiro aumento na FS (66 vs. 60 %).63

Figura 4.21 – Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista Oct. A: Após estabilização na STM (CTR), o vaso dorsal foi exposto a três concentrações de Oct (1, 3 e 10 μ M). B: Resposta cronotrópica do vaso dorsal à Oct nas diferentes concentrações. Valores foram calculados pela subtração da FC em cada concentração de Oct da FC antes da adição do agonista. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. *: P < 0,05 vs. CTR (Teste de Bonferroni).64

Figura 5.1 - Principais mecanismos ativados durante o efeito cronotrópico positivo da 5-HT no vaso dorsal do T. molitor que foram elucidados (Apontado como + na Figura) no presente trabalho. Alguns mecanismos sugestivos (Apontado como ?) no controle da atividade espontânea. A 5-HT regula a atividade cronotrópica do coração pela ativação do 5-HT2R que contribui para o aumento da concentração citosólica de IP3. Também, por ativação de receptores ainda não revelados (5-HT4R e 5-HT7R são dois receptores prováveis), a 5-HT contribui para formação de AMPc. Ver texto para mais detalhes. A estimulação do cronotropismo pela ADO é possivelmente mediada pela formação do AMPc por meio da ativação do ADOR-2a.72

Figura A.1 - Interface do módulo Measurement and Automation explorer do Labview versão 11.0. Nesse modulo é possível selecionar as câmeras de video conectadas via USB 2.0 ou superior na parte NI-IMAQdx Devices (A) e os parâmetros de aquisição de vídeo (Video Mode, B). É notável que o Video Mode está separado por espaços em resolução do vídeo (Largura (Width) vs. Altura (Height)), tipo de vídeo e taxa de aquisição de quadros (frames per second, fps). Nesse caso o Video mode selecionado foi de 320X240 YUY2 30.00fps.82

Figura A.2 - Exemplo de um arquivo de texto (nomeado como Online processing.txt) extraído do programa de computador versão online em que está contido o sinal do diâmetro luminal ao longo do tempo. Cada coluna corresponde a uma informação. Estão detalhados o horário da medição (A), data do experimento (B), tempo de medição em segundos (C) e o diâmetro luminal (D). Cada informação na coluna está separada das outras, que estão na mesma na linha, por meio de espaços. Se, por exemplo, múltiplos arquivos de vídeos são gravados, seus registros correspondentes podem ser encontrados no arquivo de texto pelo horário de medição, se anotado corretamente pelo usuário o horário em que foi gravado o arquivo de vídeo.83

Figura A.3 - Exemplo de como o usuário pode organizar em uma planilha do Microsoft Excel as informações da aquisição e gravação dos arquivos de vídeo e também dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do vaso dorsal a partir do sinal mostrado na interface. Estão demonstrados as informações e os parâmetros para um experimento em que após estabilização (Controle), foi adicionada a 5-HT nas concentrações de 1 e 100 nM (Coluna A) no líquido de perfusão. Estão mostrados a Data (Coluna B), horário de início do registro do vídeo (Coluna C), tempo em que a chave booleana do programa de computador ficou acionada para gravar o vídeo e o registro (Coluna D), além do limiar de intensidade luminosa para extrair o diâmetro luminal (Coluna E). Estão mostrados também os parâmetros como registrados pelo usuário como: ESD (Coluna F), o D (Coluna G), a FS (Coluna H), a FC (Coluna I) e o t_{contr} (Coluna J).84

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Efeitos da inibição simultânea dos canais de Ca^{2+} da membrana e da liberação de Ca^{2+} pelo RS na frequência cardíaca (FC, bpm), na porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico (FS, %), no tempo de contração (t_{contr} , ms) e no tempo de 50 % do relaxamento ($t_{0,5\text{-relax}}$, ms) do coração do T. molitor. Os parâmetros cardíacos estão mostrados na ausência dos fármacos na perfusão (CTR), e durante exposição: (1) somente ao thapsigargin; (2) ao thapsigargin e ao D600; (3) ao thapsigargin e ao D600, e também ao KB-R7943. N é o número de preparações utilizadas. *: $P < 0,05$ vs. CTR (teste de Bonferroni); #: $P < 0,05$ vs. 1 (teste de Bonferroni).....	49
Tabela 4.2 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.....	50
Tabela 4.3 - Teste de reprodutibilidade da CCE à 5-HT na mesma preparação. Em cada preparação, a CCE à 5-HT foi repetida 4 vezes (ordem crescente de 1 a 4). O tempo de espera entre cada CCE foi de 40 min. Para cada CCE foram calculados, pelo ajuste da função sigmoidal, os valores de pD2 e a Rmax (unidades e abreviaturas mesmos da Tabela 4.1). * não foi possível obter ajuste não linear satisfatório.....	51
Tabela 4.4 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 3 concentrações de KET (100, 300 e 600 nM). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT+KET; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da CCE pela função sigmoidal. Comparação das médias: *: $P < 0,05$ vs. grupo 5-HT (Teste de Newman-Keuls); #: $P < 0,05$ vs. grupo 5-HT+KET (100 nM) (Teste de Newman-Keuls).....	52
Tabela 4.5 - Valores de pA_2 da ketanserina (KET) e coeficiente angular da reta de Schild, obtidas, utilizando 5-HT como agonista no vaso dorsal do T. molitor. Estão apresentados os valores médios acompanhados dos limites do intervalo de confiança para 95% (IC 95%). O número de preparações em cada grupo N está indicado.....	53

Tabela 4.6 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 2 concentrações de 2-APB (2 e 10 μ M). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT+2-APB; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da CCE pela função sigmoidal. Teste de comparação das médias: *: P < 0,05 vs. grupo 5-HT (Teste de Newman-Keuls).	56
Tabela 4.7 - Comparação das FC _{max} e Rmax obtidas das preparações tratadas com IBMX+5-HT (100 nM) e das CCE à 5-HT em outro conjunto de preparações. Valores expressos em bpm. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. Comparação de médias: *: P < 0,05 vs. CCE à 5-HT (Teste de Bonferroni).	58
Tabela 4.8 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO e a ADO na presença de 2 concentrações de CGS (300 nM e 1 μ M). CGS é um antagonista não seletivo para todos os subtipos de ADOR. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+CGS; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.	59
Tabela 4.9 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO sem e com a presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-1 (DPCPX, 1 μ M). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+DPCPX; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.	61
Tabela 4.10 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO sem e com presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-2a (Zm, 0,1 e 1 μ M). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. Rmax: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+Zm; pD2: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Comparação das médias: *: P < 0,05 vs. CCE à ADO (Teste de Newman-Keuls). Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_i:	concentração intracelular de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_o:	concentração extracelular de Ca ²⁺
2-APB:	2-aminoetoxidifenil borato
5-HT:	5-hidroxitriptamina
5-HT1AR:	subtipo 1A de receptor serotoninérgico
5-HT1BR:	subtipo 1B de receptor serotoninérgico
5-HT2R:	subtipo 2 de receptor serotoninérgico
5-HT3R:	subtipo 3 de receptor serotoninérgico
5-HT4R:	subtipo 4 de receptor serotoninérgico
5-HT7R:	subtipo 7 de receptor serotoninérgico
AC:	adenilato ciclase
ADO:	adenosina
ADOR:	receptor de adenosina
ADOR-1:	subtipo 1 de receptor de adenosina
ADOR-2a:	subtipo 2a de receptor de adenosina
AMPC:	monofosfato cíclico de adenosina
ATP:	trifosfato de adenosina
Bpm:	batimentos por minuto
Canais HCN:	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels</i>
Canais SOC:	<i>store-operated calcium channels</i>
CaP60A:	ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático de insetos sensível à <i>thapsigargin</i>
CCE:	curva concentração–efeito
CEB:	Centro de Engenharia Biomédica
CGS15943:	9-Cloro-2-(2-furânil)-[1,2,4]triazol[1,5-c]quinazolina-5-amina
CICR:	<i>Ca²⁺ induced Ca²⁺ release</i>
D600:	metoxi-verapamil
DAG:	diacilglicerol
D:	diâmetro luminal diastólico
DMSO:	dimetilsulfóxido
DPCPX:	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DR:	razão das concentrações equiefetivas

EC50:	valor da concentração molar do agonista que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima
ESD:	diâmetro luminal sistólico
FC:	frequência cardíaca
FC_{max}:	frequência espontânea máxima ao agonista
FC_{basal}:	frequência espontânea antes da aplicação do agonista
FS:	porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico
G_{ai}:	subunidade α da proteína G que inibe a atividade catalítica da adenilato ciclase
G_{aq}:	subunidade q da proteína G que estimula a atividade da fosfolipase C
G_{as}:	subunidade α da proteína G que estimula a atividade catalítica da adenilato ciclase
HEPES:	ácido hidroxietil-piperazina-N''-2-etano-sulfônico
IBMX:	3-isobutil-1-metilxantina
IC 95 %:	intervalo de confiança para 95 %
I_{Ca,L}:	corrente de entrada de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo-L
I_{Ca,T}:	corrente de entrada de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo-T
I_F:	Corrente de entrada de cátions monovalentes ativada por hiperpolarização
INCX:	corrente despolarizante gerada pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
IP3:	inositol 1,4,5-trifosfatado
IP3R:	receptor de inositol 1,4,5-trifosfatado do retículo sarcoplasmático
K_B:	constante aparente de dissociação do antagonista no receptor
KB-R7943:	2-[4-[(4-nitrofenil)metoxi]fenil]etil ester
KET:	ketanserina
LPCv:	Laboratório de Pesquisa Cardiovascular
N:	número de experimentos
NCX:	trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NSA:	nódulo sinusal
Oct:	octopamina
P:	grupo fosfato
PA:	potencial de ação
pA₂:	logaritmo negativo da concentração molar de um antagonista que requer o dobro da concentração do agonista para a produção de um dado nível de resposta

pD₂:	logaritmo negativo da concentração do agonista que evoca uma resposta igual à metade da máxima
PDE:	fosfodiesterase
PKA:	quinase de proteína dependente de AMPc
PKC:	quinase de proteína dependente de Ca ²⁺
PLB:	fosfolamban
PLC:	fosfolipase C
Proteína G:	proteína ligante de nucleotídeos de guanina
R_{max}:	resposta cronotrópica máxima ao agonista
ROI:	<i>region of interest</i>
RS:	retículo sarcoplasmático
RyR:	receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático
SERCA2a:	ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático
STM:	solução “Tenebrio”
T_{0,5-relax}:	tempo igual a 50 % do relaxamento
t_{contr}:	tempo de contração
TnC:	troponina-C
TnI:	troponina-I
t_{relax}:	tempo de relaxamento
Unicamp:	Universidade Estadual de Campinas
VAS:	<i>vision acquisition software</i>
VDM:	<i>vision development module</i>
V_M:	potencial de membrana
Zm241385:	4-(2—[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,4]triazina-5-ilamino]etil)fenil

SUMÁRIO

Capítulo 1 : Introdução	22
Capítulo 2 : Objetivos.....	28
Capítulo 3 : Materiais e Métodos	29
3.1 – Modelo experimental	29
3.2 – Soluções e Fármacos.....	30
3.3 – Programa de computador: Medição do diâmetro luminal.....	31
3.4 –Atividades inotrópica e cronotrópica de preparações tratadas com thapsigargin, D600 e KB-R7943	35
3.5 – Determinação da curva concentração-efeito (CCE) ao agonista 5-HT.....	36
3.6 – Determinação do valor do pA ₂	36
3.7 - Influência da inibição de PDE na atividade cronotrópica	37
3.8 – Determinação da CCE ao agonista ADO.....	38
3.9 – Reposta cronotrópica do vaso dorsal ao agonista Oct	39
3.8 – Análise estatística	39
Capítulo 4 : Resultados.....	40
4.1 – Programa de computador desenvolvido em Labview versão 11.0	40
4.2 – Atividade cronotrópica e inotrópica alteradas pela inibição simultânea do influxo de Ca ²⁺ pelos canais de membrana e pela liberação de Ca ²⁺ do RS	46
4.3 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista 5-HT.....	49
4.4 - Receptor serotoninérgico envolvido no efeito cronotrópico positivo do vaso dorsal ..	51
4.5 – Segundos mensageiros ativados durante o efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal causado pela 5-HT	53
4.6 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista ADO.....	59
4.7 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista Oct.....	63
Capítulo 5 : Discussão	65
Capítulo 6 : Conclusões e Perspectivas	74
Capítulo 7 : Referências Bibliográficas	75
Apêndice A - Informações técnicas complementares de uso do programa de computador de medição do diâmetro luminal do vaso dorsal do T. molitor.....	82
Anexo A - Certificado emitido pela comissão de ética institucional de não obrigatoriedade de um parecer para uso de invertebrados para experimental animal.....	85

Capítulo 1 : Introdução

O principal órgão propulsor da hemolinfa nos insetos é o vaso dorsal, que possui uma estrutura tubular constituída de poucas centenas de miócitos que se estendem em arranjo helicoidal desde a região abdominal, o coração propriamente dito, até a região cefálica, a aorta (Nation, 2008, Glenn et al., 2010). Os músculos alares na cavidade abdominal se inserem longitudinalmente no vaso dorsal, oferecendo sustentação e contribuição no estabelecimento do diâmetro diastólico do coração (Hertel & Pass, 2002, Glenn et al., 2010). A hemolinfa é tipicamente admitida para o lúmen do coração através de pares de *ostia* que se abrem durante o relaxamento (diástole) e é impulsionada para a aorta durante a fase de sístole (Molina & Cripps, 2001). Assim, a hemolinfa é bombeada para as cavidades lacunares que constituem a *hemocele* (Nation, 2008).

Além da principal importância para o ramo da fisiologia comparativa, principal motivo da nova abordagem na espécie estudada, o estudo do funcionamento do vaso dorsal se torna também atraente, dadas as semelhanças genéticas, moleculares e fisiológicas com o coração de mamíferos sobre as quais a literatura é abundante (Bodmer & Venkatesh, 1998, Wolf et al., 2006, Choma et al., 2011, Piazza & Wessells, 2011, Lehmacher et al., 2012, Santalla et al., 2014). Além de possuírem a mesma eficiência no bombeamento de seus respectivos fluidos circulantes (Choma et al., 2011), corações de ambos, mamíferos e insetos, apresentam automatismo miogênico, ou seja, a atividade elétrica espontânea tem origem no próprio músculo cardíaco (Markou & Theophilidis, 2000, Hertel & Pass, 2002, Nation, 2008). O vaso dorsal apresenta atividades crono e inotrópica dependentes da modulação de inúmeros fatores tais como da ação de neurotransmissores e hormônios e da temperatura (Zornik et al., 1999, Johnson et al., 2002, Szymanowska-Dziubasik et al., 2008, Jennings et al., 2009, Feliciano et al., 2011).

A atividade cronotrópica no coração de mamíferos se inicia com a atividade elétrica espontânea das células do marca-passo primário (nódulo sinusal, NSA) e se conduz pelos átrios atingindo o nódulo átrio-ventricular e, em seguida, via sistema His-Purkinje se conduz pelos ventrículos culminando com a ativação dos miócitos ventriculares geradores de força.

Nos miócitos ventriculares, vários mecanismos envolvidos nas alterações da atividade inotrópica estão ligados ao transporte do íon Ca^{2+} , que é o elo entre a excitação elétrica e a contração. A série de eventos associados ao transporte do íon no citosol desde o

disparo do potencial de ação (PA) até a consequente geração de força pelo miócito ventricular é denominada acoplamento excitação-contração (Bers, 2002).

Durante o PA ventricular, o íon entra nas células por meio de canais de Ca^{2+} tipo-L dependentes de tensão (gerando uma corrente de entrada denominada $I_{\text{Ca,L}}$) e se liga aos canais de liberação (também chamados de receptores de rianodina, RyR) de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), provocando a liberação maciça de Ca^{2+} da organela. O aumento de cerca de 10 vezes na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) leva à ligação do íon à troponina-C (TnC) dos miofilamentos, disparando o processo de encurtamento da célula e consequente geração de força (Bers, 2002). Esta dependência que a liberação do Ca^{2+} reticular apresenta do Ca^{2+} do meio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) é denominada de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (*Ca^{2+} induced Ca^{2+} release*, CICR) (Fabiato, 1983). Embora $I_{\text{Ca,L}}$ seja a principal via de entrada de Ca^{2+} para ativação do RS, há um pequeno influxo de Ca^{2+} para o citosol por outras vias como os canais de Ca^{2+} tipo-T (corrente de entrada $I_{\text{Ca,T}}$) e o mecanismo de contra transporte (bidirecional) denominado de trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

O relaxamento ocorre à medida que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é reduzida pelo transporte por meio de dois mecanismos rápidos, quais sejam, a recaptção de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a), cuja atividade é modulada pelo peptídeo fosfolamban (PLB), e extrusão de Ca^{2+} da célula via NCX, além de dois mecanismos mais lentos de redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a extrusão da via ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e o transporte, via uniporter mitocondrial de Ca^{2+} , para o interior das mitocôndrias (Bassani et al., 1992, Bassani et al., 1994).

Nas células marca-passo do NSA, mecanismos envolvidos nas alterações na atividade cronotrópica estão associados à ativação e inativação de correntes iônicas de canais de membrana (*membrane clock*) em diferentes instantes, assim como de correntes geradas pelo transporte do Ca^{2+} liberado pelo RS (*calcium clock*) (Lakatta et al., 2006).

Quando o potencial de membrana (V_M) atinge o limiar para ativação da $I_{\text{Ca,L}}$, V_M tende a potenciais menos negativos e constitui a fase de despolarização rápida das células marca-passo. Após a máxima despolarização (*action potential upstroke*), a inativação de $I_{\text{Ca,L}}$ e a ativação da corrente de saída de K^+ implicam no consequente retorno de V_M para valores mais negativos (fase de repolarização).

Durante a fase de despolarização diastólica, que precede o próximo PA, os valores de V_M sofrem alterações ligadas à ativação de várias outras correntes iônicas (Maltsev et al., 2006, Maltsev & Lakatta, 2008). A corrente de entrada de cátions monovalentes ativada por hiperpolarização (I_F) pelos canais HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) e contribui para então levar V_M , quase “linearmente” para valores menos negativos

(Alig et al., 2009, DiFrancesco, 2010). Em seguida, na ausência de influxo substancial de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} tipo-L, o RS passa a desempenhar uma função importante no controle de V_M . Liberações espontâneas, locais, de Ca^{2+} (*local Ca^{2+} release*) via canais de liberação de Ca^{2+} do RS (Rigg & Terrar, 1996, Li et al., 1997, Satoh, 1997, Vinogradova et al., 2004) acabam por causar o transporte do íon para fora da célula *via* trocador NCX (estequiometria $1\text{Ca}^{2+} / 3\text{Na}^{+}$) gerando (durante a diástole) uma corrente elétrica resultante despolarizante (I_{NCX}) (Zhou & Lipsius, 1993, Bogdanov et al., 2001) que adicionada a $I_{\text{Ca,T}}$ contribui para que V_M se desloque para valores menos negativos na fase final da despolarização diastólica, quando então o limiar para disparo de PA é novamente atingido.

As atividades cronotrópica e inotrópica podem ser estimuladas pela 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) que é sabido ser ativo também em insetos, contudo, o pouco que se sabe sobre as vias de ativação dos subtipos de receptores serotoninérgicos é essencialmente de estudos feitos em mamíferos (**Figura 1.1**).

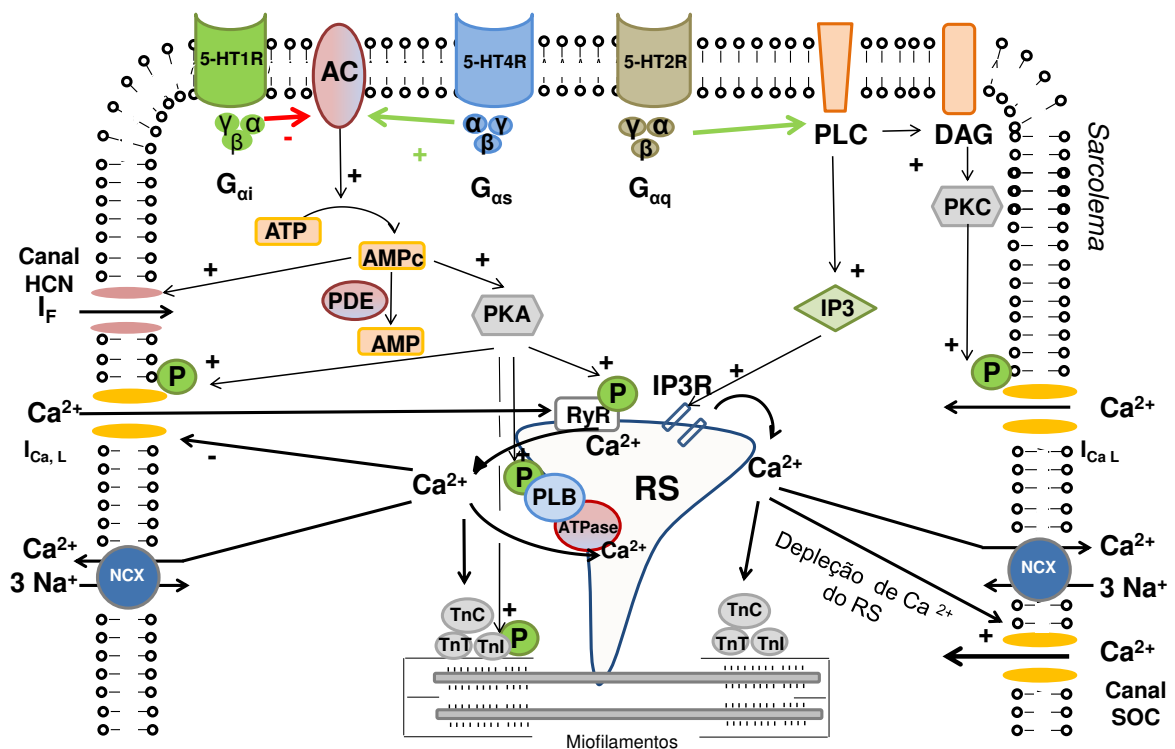


Figura 1.1 - Resumo simplificado das possíveis vias (com os respectivos receptores) ativadas pela 5-HT em um miócito de mamífero. P: grupo fosfato. Ver texto para detalhes.

O aumento da atividade inotrópica no rato e no cobaia está associado, respectivamente, ao subtipo 2 de receptor serotoninérgico (5-HT2R) e ao subtipo 3 de receptor serotoninérgico (5-HT3R) (Tramontana et al., 1993, Lær et al., 1998). Além disso, 5-HT exerce efeitos cronotrópico e inotrópico positivos nos átrios de camundongo e de

humano quando o neurotransmissor se liga ao subtipo 4 de receptor serotoninérgico (5-HT₄R) (Kaumann et al., 1994, Pino et al., 1998, Kaumann & Levy, 2006, Gergs et al., 2013). O subtipo 7 de receptor serotoninérgico 5-HT₇ (5-HT₇R) tem efeitos vasodilatadores na coronária de rato (Chang Chien et al., 2015).

Os receptores da 5-HT são acoplados às proteínas ligante de nucleotídeos de guanina (proteínas G de subunidade α da proteína G que inibe a atividade catalítica da adenilato ciclase (G_{ai}), de subunidade q da proteína G que estimula a atividade da fosfolipase C (G_{aq}) e de subunidade α da proteína G que estimula a atividade catalítica da adenilato ciclase (G_{as})), com exceção apenas do 5-HT₃R que é um tipo de canal iônico dependente de ligante (Hoyer et al., 1994, Hannon & Hoyer, 2008). Os 5-HT₄R, subtipo 6 de receptor serotoninérgico e 5-HT₇R, acoplados a proteína G_{as} , quando ligados a 5-HT, também mobilizam a enzima adenilato ciclase (AC) para conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), que por fim é convertido em monofosfato de adenosina (AMP) pelas fosfodiesterases (PDE). O AMPc modula I_F (Pino et al., 1998) e também se liga à região regulatória da quinase de proteína dependente de AMPc (PKA), tornando-a ativa. Logo, a difusão da subunidade catalítica da PKA, ativa no citosol, torna diversos substratos fosforilados, dentre eles os RyR, PLB, canais de Ca^{2+} tipo-L do sarcolema e a troponina-I (TnI) dos miofilamentos (Ouadid et al., 1992, Bers, 2002). A ativação dos subtipos 1A de receptor serotoninérgico (5-HT_{1A}R), dos subtipos 1B de receptor serotoninérgico (5-HT_{1B}R) e dos subtipos 5 de receptor serotoninérgico, todos acoplados às proteínas G_{ai} , levam a inibição da formação de AMPc.

Os receptores acoplados à proteína G_{aq} (5-HT₂R), ao serem estimulados, ativam a fosfolipase C (PLC) que cliva os fosfolipídeos de membrana em diacilglicerol (DAG) e em inositol 1,4,5-trifosfatado (IP₃). O DAG se mantém na membrana, ativando a quinase de proteína dependente de Ca^{2+} (PKC), que fosforila os canais de Ca^{2+} tipo-L (Kamp & Hell, 2000). A interação do IP₃ com o receptor de inositol 1,4,5-trifosfatado (IP₃R) do retículo sarcoplasmático aumenta a liberação de Ca^{2+} da organela (Kapur & Banach, 2007, Domeier et al., 2008) e o íon pode, competitivamente, ser transportado para fora da célula *via* NCX (Kapoor et al., 2014, Kapoor et al., 2015), recaptado pela ATPase de Ca^{2+} do RS ou se ligar à TnC dos miofilamentos. Canais SOC (*Store-Operated Calcium Channels*) podem ser ativados indiretamente pela depleção de Ca^{2+} do RS, mas ainda há poucas evidências de seu papel na geração da atividade espontânea (Ju et al., 2007).

Nos insetos, receptores serotoninérgicos foram caracterizados principalmente no sistema nervoso. Foram revelados três receptores principais: 5-HT₁R e 5-HT₇R (Witz et al.,

1990, Saudou et al., 1992, Becnel et al., 2011, Vleugels et al., 2014) em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830; Diptera: Drosophilidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797; Coleoptera: Tenebrionidae); e 5-HT_{2R} (Johnson et al., 2009, Gasque et al., 2013, Thamm et al., 2013) em *D. melanogaster* e *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758; Hymenoptera: Apidae).

Em *D. melanogaster*, a via AMPc-PKA-RS não parece participar do aumento da atividade cronotrópica (Majeed et al., 2013, Majeed et al., 2014). As modificações da resposta cronotrópica do vaso dorsal desta espécie, tratado com antagonista dos 5-HT_{2R}, indicam que a principal via seria a que envolve PLC-IP₃-PKC (Majeed et al., 2013). Um subtipo de 5-HT_{2R} foi revelado no coração da espécie *Rhodnius prolixus* (Stål, 1989; Hemiptera: Reduviidae) (Paluzzi et al., 2015).

O vaso dorsal do *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758; Coleoptera: Tenebrionidae) responde (crono e inotropicamente) à 5-HT (Feliciano et al., 2011, Fim Neto, 2012), contudo, estudos das possíveis vias de ativação ainda não estão disponíveis.

Feliciano et al. (2011) demonstraram que na ausência de um RS funcionalmente ativo, o efeito cronotrópico positivo da 5-HT e do aumento da $[Ca^{2+}]_o$ são abolidos no coração do *T. molitor*. Assim, uma das premissas do presente trabalho foi considerar que a ativação de canais de Ca^{2+} tipo-L de membrana e/ou HCN não fosse fundamental para estabelecimento do efeito cronotrópico positivo da 5-HT nesta espécie. Nosso ponto de partida, então, foi estabelecer que os 5-HT_{2R} poderiam, como ocorre na *D. melanogaster*, ativar a via PLC-IP₃-RS. Deste modo, a extrusão do Ca^{2+} liberado pelo RS, via NCX (de modo eletrogênico), a partir da ativação dos IP₃R poderia constituir um dos mecanismos de modulação de I_{NCX} durante a fase despolarização diastólica. Contudo, não é plausível descartar a ativação da via da AC-AMPc-PKA durante estimulação do cronotropismo da 5-HT na espécie *T. molitor*.

Embora já esteja claro que o RS exerça um papel importante na regulação da atividade cronotrópica, tanto durante atividade basal quanto durante a ação de neurotransmissores, em pelo menos duas espécies de insetos como *T. molitor* (Feliciano et al., 2011) e *D. melanogaster* (Lin et al., 2011), na atividade inotrópica praticamente nada é conhecido. Uma das possíveis razões para escassez deste tipo de estudo é que como o vaso dorsal apresenta atividade espontânea, não é possível estudar regulação dos transportadores na atividade inotrópica na presença de variações da atividade cronotrópica (o encurtamento do vaso dorsal do *T. molitor* é frequência-dependente, Fim Neto, 2012). Em trabalho anterior, este problema foi contornado com o procedimento de aplicar estímulos elétricos no vaso dorsal do *T. molitor* para controle (*overdrive*) da frequência espontânea (Fim Neto, 2012).

Apesar de ter sido possível adiantar o conhecimento de vários aspectos da atividade inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor* (e.g. papel do Ca^{2+} liberado do RS e do proveniente do meio externo), a ferramenta computacional não permitia um estudo mais aprofundado, como por exemplo, as vias para entrada de Ca^{2+} com um possível envolvimento de transporte pelo NCX.

Desta forma no presente estudo foram estudados múltiplos aspectos das atividades crono e inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor* com foco nas vias bioquímicas para atividade cronotrópica da 5-HT e nos mecanismos envolvidos na oferta e regulação do íon Ca^{2+} tanto na atividade cronotrópica quanto na atividade inotrópica. Para dar suporte ao estudo, foi aprimorada a ferramenta computacional, desenvolvida no estudo anterior, com uma interface mais amigável de extração dos parâmetros em estudo.

Capítulo 2 : Objetivos

1. Aprimorar a ferramenta computacional para estudo da frequência espontânea e amplitude de contrações do vaso dorsal do *T. molitor*;
2. Estudar mecanismos envolvidos na regulação da atividade inotrópica da espécie. Estudar um possível sinergismo do influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} do sarcolema com a liberação de Ca^{2+} do RS na regulação da atividade inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor*;
3. Estudar mecanismos envolvidos na regulação da atividade cronotrópica do vaso dorsal do coleóptero e a possibilidade de identificar vias bioquímicas envolvidas na atividade cronotrópica da 5-HT.

Capítulo 3 : Materiais e Métodos

3.1 – Modelo experimental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv) do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Embora não exista obrigatoriedade de parecer da Comissão de Ética no uso de animais para estudo de invertebrados, segundo a legislação brasileira (Certificado de não obrigatoriedade no **Anexo A**), todos os cuidados foram tomados para evitar sofrimento aos animais e/ou uso no número exagerado de insetos.

Os insetos foram mantidos em recipientes plásticos com aeração, a temperatura 25 °C, umidade relativa de aproximadamente 65% e fotoperíodo de 12 h. Foram utilizados coleópteros adultos (**Figura 3.1-A**) de ambos os sexos, alimentados com batata, cenoura e farelos de trigo e milho.

Foi estudada a espécie *T. molitor* por várias razões: 1) o coleóptero é de fácil manuseio; 2) colônia de fácil manutenção; 3) não se trata de uma espécie peçonhenta; 4) não se trata de espécie em extinção; 5) o estudo da origem da atividade espontânea do vaso dorsal é escasso. Contudo, poucos estudos sobre os mecanismos associados à origem desta atividade estão disponíveis no *T. molitor* (Markou & Theophilidis, 2000; Feliciano et al., 2011).

Para exposição do vaso dorsal, os insetos foram anestesiados com éter etílico, decapitados e tiveram os élitros, as pernas e asas removidas com materiais cirúrgicos (World Precision I Brasil LTDA). Uma incisão longitudinal no abdômen e tórax foi feita para remoção do trato digestivo, parede dos músculos abdominais e glândulas para expor o vaso dorsal (Markou & Theophilidis, 2000, Szymanowska-Dziubasik et al., 2008, Feliciano et al., 2011). A preparação *in situ* consistiu, portanto, do coração, alguns músculos abdominais. A cutícula dorsal do inseto então foi aderida sobre uma lamínula ao fundo de uma câmara de perfusão (desenvolvida no CEB/Unicamp) por meio de uma camada fina de vaselina (Vaselina sólida comercial, LabCenter, Campinas-SP-Brasil), como ilustrado na **Figura 3.1-B**. Posteriormente, a câmara foi colocada em um sistema de microscopia para estudo da atividade contrátil do coração (Fim Neto, 2012) .

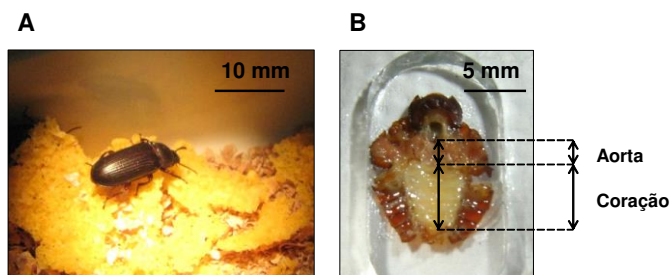


Figura 3.1 - A: O coleóptero *T. molitor*. **B:** Fixação da preparação em uma câmara de perfusão. O vaso dorsal, constituído pelas regiões cefálica (aorta) e abdominal (coração), está localizado na região central do inseto conforme indicam as duas setas bidirecionais.

3.2 – Soluções e Fármacos

A solução utilizada para os experimentos foi a Solução “Tenebrio” (STM) composta por: 274 NaCl; 19 KCl; 4 CaCl₂; 5 ácido hidroxietil-piperazina-N’’-2-etano-sulfônico (Hepes); 5 glicose com seu pH ajustado para 7,0 por NaOH (Szymanowska-Dziubasik et al., 2008, Feliciano et al., 2011). A STM foi preparada com água ultrafiltrada tipo I (Easypure UF, Barnstead International, Dubuque, IA, EUA e filtro da Milliuni Comércio e Representações LTDA Me) com resistividade > 18 MΩ. As soluções e as concentrações de seus solutos estão expressas em milimolar (mM).

Como existem poucos estudos da biologia molecular do *T. molitor*, todos os tratamentos farmacológicos foram baseados naqueles disponíveis na literatura para o coração de mamíferos e em uma pequena parcela, para o vaso dorsal da *D. melanogaster*. Com exceção do antagonista seletivo para o subtipo 1 de receptor de adenosina (ADOR-1, acoplado à proteína G_{ai}), 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX, 10 mM), que foi gentilmente fornecido pelo Professor Edson Antunes, todos os fármacos foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e com eles foram preparadas soluções estoque. As soluções estoque de metoxi-verapamil (D600), inibidor seletivo do influxo de Ca²⁺ pelos canais de Ca²⁺ tipo-L, e de 5-HT foram preparadas nas concentrações de 5 e 20 mM, respectivamente, com água ultrapura e mantida em -20 °C. Usou-se dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente das soluções estoques do inibidor seletivo da SERCA2a (*thapsigargin*, 10 mM); do inibidor não seletivo do influxo de Ca²⁺ pelo NCX, 2-[4-[(4-nitrofenil)metoxi]fenil]etil ester (KB-R7943, 10 μM); do antagonista do 5-HT_{2R}, ketanserina (KET, 5 mM); do bloqueador não seletivo do IP₃R, 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB, 20 mM); do inibidor não seletivo de PDE, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 10 mM); do antagonista não seletivo de receptores de ADO (ADOR), 9-Cloro-2-(2-furânil)-

[1,2,4]triazol[1,5-c]quinazolina-5-amina (CGS15943, 10 mM); e do antagonista seletivo para o subtipo 2a de receptor de adenosina (ADOR-2a, acoplado à proteína G_{as}), 4-(2—[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,4]triazina-5-ilamino]etil) fenil (Zm241385, 10 mM); do agonista octopamina (Oct) (20 mM). A concentração de DMSO final nas soluções ficou abaixo de 0,1%. Todas as soluções estoques foram mantidas a -20 °C por no máximo 3 meses e diluídas em água deionizada imediatamente antes do uso para preparo de soluções de trabalho, mantidas em banho de gelo. Não foi feita solução estoque para a Adenosina (ADO). Neste caso, foram pesados 4 mg de ADO e mantidos a -20 °C de modo que nos dias de uso fosse utilizado 15 mL de STM como solvente para um estoque diário de 1 mM de ADO.

3.3 – Programa de computador: Medição do diâmetro luminal

A câmara de perfusão (conforme mostrada na seção **Figura 3.1**) foi colocada no sistema com base em um microscópio (Carl Zeiss) equipado com sistema de movimentação tipo *charriot* e sistema para ampliação e focalização da imagem da região do coração do vaso dorsal. A preparação foi iluminada por uma fonte de luz halógena de alta intensidade, sendo sua imagem projetada, por meio de uma objetiva (Carl Zeiss, aumento de 2,5 X e plan 0,06), em uma câmera de vídeo (Philips, modelo SPC1030NC/00) para geração e visualização de vídeos em um *notebook* (Dell Computadores do Brasil Ltda). A aquisição e processamento do sinal de vídeo foram feitos por duas ferramentas da plataforma *Labview* versão 11.0 (National Instruments): *Vision Acquisition Software* (VAS) e *Vision Development Module* (VDM). O sistema de microscopia juntamente com sistema de aquisição de vídeos está detalhado com seus principais elementos na **Figura 3.2**.

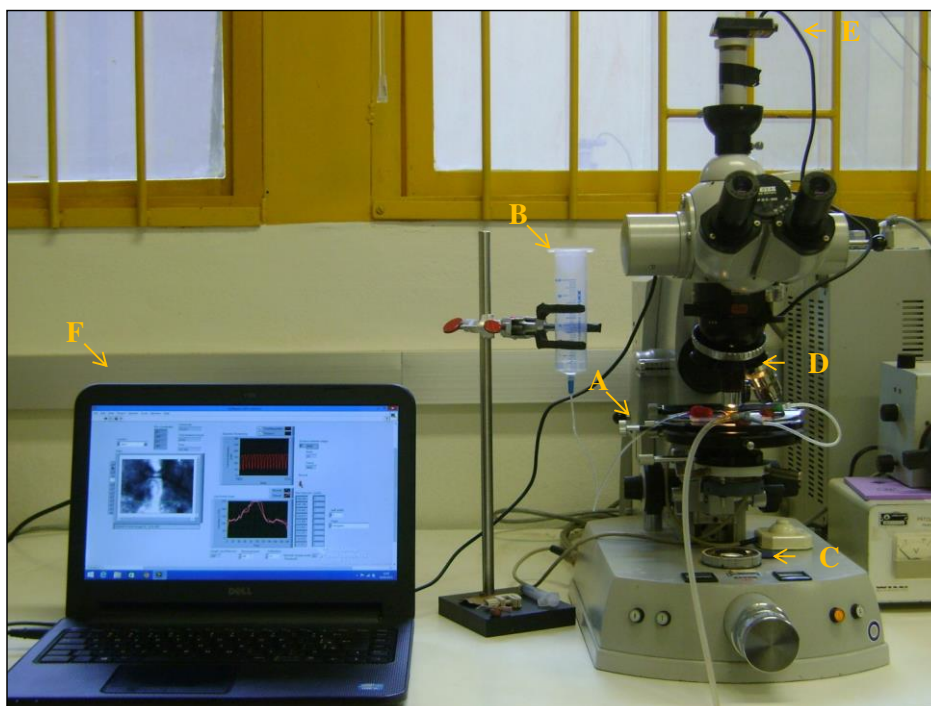


Figura 3.2 – Sistema de geração e aquisição de vídeos da atividade contrátil do coração do *T. molitor*. **A:** câmara de perfusão no sistema de movimentação tipo *charriot*; **B:** seringa de perfusão; **C:** fonte de luz halógena; **D:** conjunto de lentes; **E:** câmera de vídeo; **F:** *notebook* com o programa de computador na plataforma *Labview* versão 11.0

Para medição da frequência espontânea do vaso dorsal (FC, batimentos por minuto (bpm)), variações no diâmetro luminal do coração (μm), do diâmetro luminal diastólico (D, μm), do diâmetro luminal sistólico (ESD, μm), da porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico (FS, %), do tempo de contração (t_{contr} , ms), do tempo de relaxamento (t_{relax} , ms) e do tempo igual a 50 % do relaxamento ($t_{0,5\text{-relax}}$), vídeos da atividade contrátil do vaso dorsal (região do coração) foram adquiridos a uma taxa de 30 quadros/s. Com esta taxa de aquisição, a resolução temporal foi cerca de 33 ms, suficiente para se adquirir um bom número de pontos do diâmetro luminal para se reproduzir a contração completa do vaso dorsal. A frequência de *Nyquist* estimada para o sinal de contração do vaso dorsal é inferior a 10 Hz. Um programa de computador foi desenvolvido para estimar o diâmetro luminal do coração a fim de extrair todos os parâmetros citados acima. Para uma breve descrição de como se medir o diâmetro luminal do coração, podemos observar na **Figura 3.3** dois exemplos de quadros de um vídeo do coração (região entre A1 e A6) durante a diástole (**painel A**) e na sístole (**painel B**). A luz transmitida através do lúmen do coração é maior do que a luz transmitida pelos tecidos adjacentes, por isso esta região do coração aparece mais clara na imagem do que os outros tecidos. Além disso, essa região mais clara mais larga na diástole do que na sístole. A distância entre as bordas (região entre os

círculos extremos 1-2 e 3-4 nos **painéis A e B**, respectivamente) em uma ROI (*region of interest*) do sinal de vídeo, posicionada sobre o maior diâmetro luminal diastólico do coração, diminui à medida que o coração se contrai ou aumenta progressivamente durante o relaxamento do coração até a restauração da diástole. O código do programa de computador conta o número de *pixels* com intensidades luminosas maiores que o limiar, determinado pelo usuário (limiar não deve ser menor do que 10 % da maior intensidade de luz transmitida pela região do lúmen), na ROI do sinal de vídeo e estima a distância entre as bordas em cada quadro do vídeo, que é convertida para micrômetros. Uma grátícula micrométrica substituiu a preparação no sistema de microscopia e foi calculado um fator de calibração, ou seja, o fator de conversão entre número *pixels* e comprimento, que é dependente do aumento e da resolução da câmera de vídeo. Foi obtida uma resolução espacial de $\sim 3,5 \mu\text{m}$ para cada *pixel* para uma resolução de 320 vs. 240 *pixels* (largura vs. altura dos quadros de vídeo) da câmera de vídeo (lentes de magnificação 2,5 X) e uma resolução espacial de $\sim 1,5 \mu\text{m}$ para cada *pixel* uma resolução de 352 vs. 464 *pixels* da câmera de vídeo (magnificação da lente de 6,2 X). Com estas resoluções espaciais, o erro percentual de medição do diâmetro luminal foi inferior a 5 %. A distância de 100 μm (resolução de câmera de 352 vs. 464 *pixels*) está ilustrada no **painel B** de mesma escala no **painel A** (**Figura 3.3**).

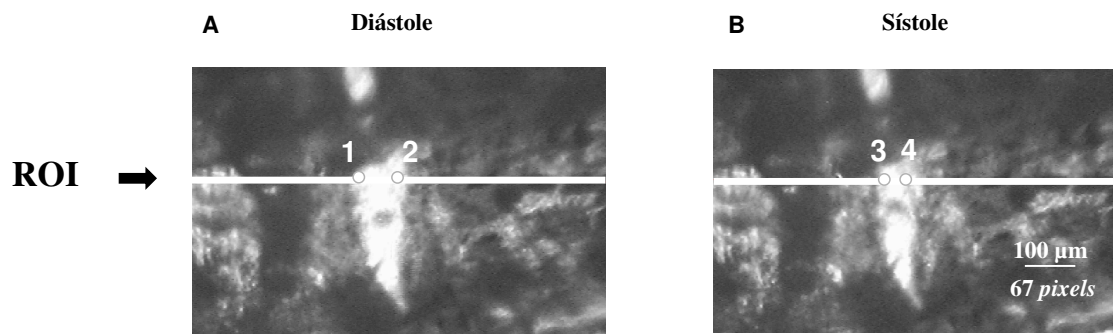


Figura 3.3 – Quadros de um vídeo do coração da espécie *T. molitor* durante a diástole (**A**) e durante a sístole (**B**). A região entre os círculos (bordas, distância entre 1-2 e 3-4 em cada quadro) corresponde ao diâmetro luminal do coração. Número de *pixels* que correspondem a 100 μm está descrito em **B** de mesma escala em **A**.

Um fluxograma do funcionamento do programa de computador é ilustrado na **Figura 3.4**.

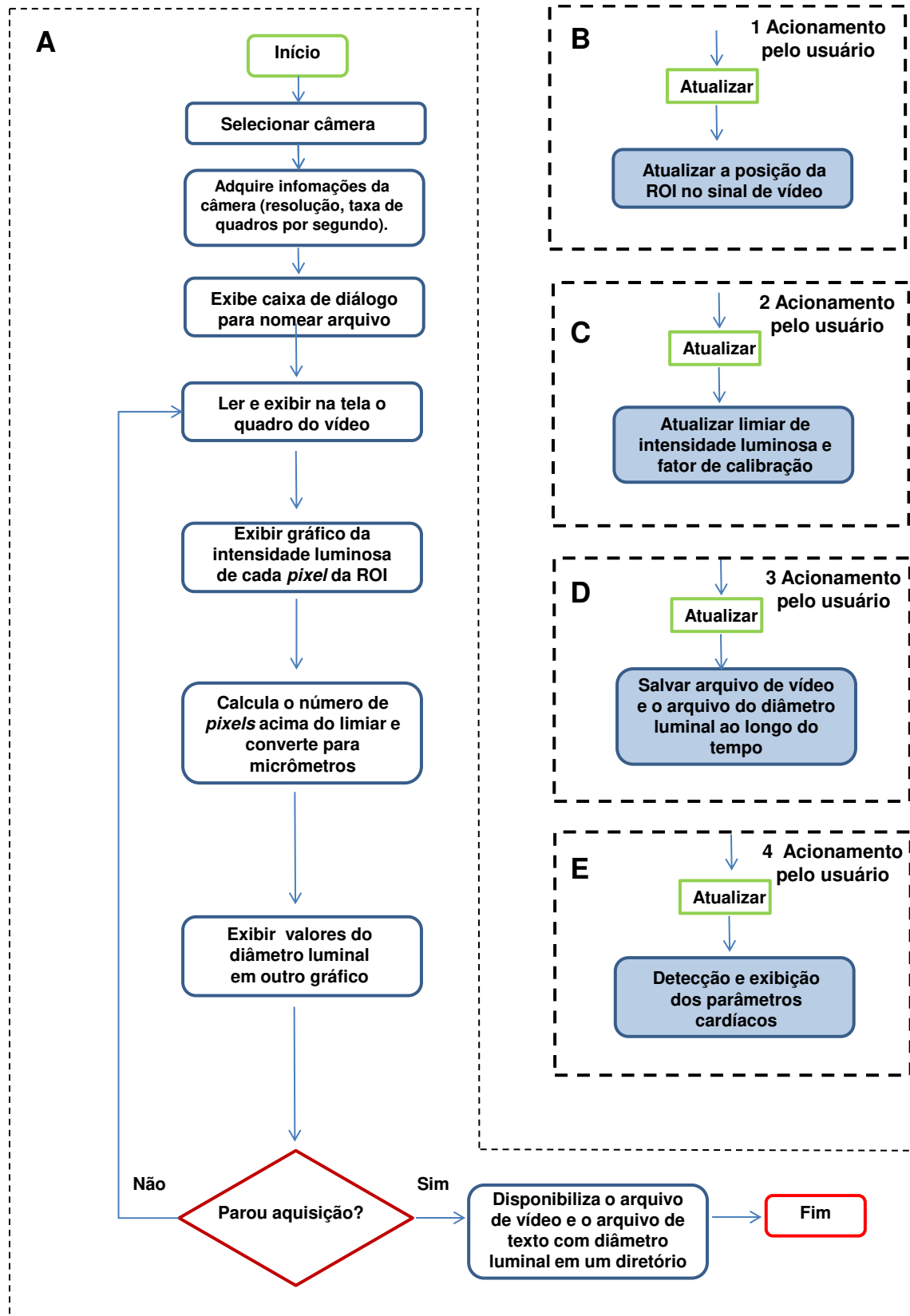


Figura 3.4 - Fluxograma de funcionamento do programa de computador. **A:** fluxograma do código principal do programa de computador. As letras **B**, **C**, **D** e **E** indicam ações paralelas que são feitas durante cliques na interface pelo usuário para atualizar algumas ações do programa de computador.

3.4 –Atividades inotrópica e cronotrópica de preparações tratadas com *thapsigargin*, D600 e KB-R7943

Para se investigar a função dos diferentes transportadores de Ca^{2+} na atividade inotrópica, sem interferência da atividade espontânea causada pela $[\text{Ca}^{2+}]_o$ e por outros fármacos (Feliciano et al., 2011), preparações foram estimuladas em uma frequência de 0,8 Hz, próxima à FC basal do *T. molitor* (Markou & Theophilidis, 2000, Feliciano et al., 2011). Os efeitos inotrópicos da inibição combinada da liberação de Ca^{2+} pelo RS e do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo-L foram estudados em um conjunto de corações perfundidos com baixa $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5 mM) e estimulados em 0,8 Hz. Após estabilização da FC espontânea seguida de estimulação (CTR), as preparações foram incubadas (15 min) no escuro com 10 μM de *thapsigargin*, um inibidor irreversível da SERCA2a (Kirby et al., 1992, Sagara et al., 1992, Bassani et al., 1993), com STM e sem a presença de Ca^{2+} no líquido de perfusão. Após lavagem por 15 min em STM ($[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,5 mM) até estabilização da FC espontânea, as preparações foram novamente estimuladas a 0,8 Hz. A seguir, os corações foram sucessivamente perfundidos com D600, inibidor seletivo do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo-L (Affolter & Coronado, 1986, McDonald et al., 1989), e com inibidor não seletivo do influxo de Ca^{2+} via NCX, KB-R7943 (Watano et al., 1996, Birinyi et al., 2005). Durante estimulação, em todos tratamentos farmacológicos e na ausência dos fármacos na perfusão (CTR), foram calculadas FS, t_{contr} e $t_{0,5\text{-relax}}$. Também foram medidas FC espontâneas, após estabilização, em todos os eventos pré-estimulação. A **Figura 3.5** ilustra o protocolo experimental.

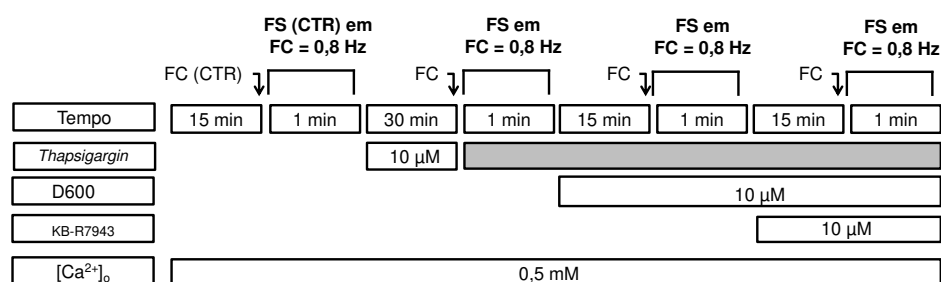


Figura 3.5 – Resumo do protocolo experimental para se investigar as fontes do íon Ca^{2+} envolvidas na origem das atividades crono e inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor*. Durante todo experimento, foi utilizada uma baixa $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5 mM). Após a medição da FC (bpm) na fase pré-estimulação em 0,8 Hz (medição de FS), estes mesmos parâmetros foram novamente calculados após tratamento das preparações por 30 min com *thapsigargin* (TG). A inibição da ATPase de Ca^{2+} do RS por TG é irreversível, por isso seu efeito se mantém até ao final do experimento (barra cinza). Assim, as preparações foram sucessivamente tratadas com D600 e com KB-R7943 para novas medições dos parâmetros. Durante estimulação, também foram calculados os t_{contr} e $t_{0,5\text{-relax}}$.

3.5 – Determinação da curva concentração-efeito (CCE) ao agonista 5-HT

Foi possível aplicar protocolos experimentais para determinar a via de sinalização associada ao efeito cronotrópico causado pela 5-HT, uma vez que FC do coração do *T. molitor* foi obtida a partir dos registros gerados pelo programa de computador. Foram determinadas CCEs por aumento gradativo e logarítmico (incremento de 0,5 casa logarítmica) da concentração molar do agonista 5-HT, e um período entre pelo menos 5 min e no máximo até 7 min foi aguardado para estabilização da FC em cada concentração. Com isso, a relação entre a resposta cronotrópica ($FC_{(bpm)}$) e o logarítmico da concentração molar da 5-HT ($[5-HT]$) foi descrita por uma função sigmoidal:

$$FC_{(bpm)} = FC_{basal} + \frac{(FC_{max} - FC_{basal})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - [A])^N}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde FC_{basal} e FC_{max} correspondem respectivamente à frequência espontânea mínima e máxima ao agonista, no caso 5-HT cuja concentração de 5-HT é representada como $[A]$ na equação. R_{max} corresponde à diferença entre FC_{max} e FC_{basal} ; EC_{50} corresponde ao valor da concentração molar do agonista que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima (no caso R_{max}) alcançada pela preparação; e N é o coeficiente de Hill considerado igual a 1. Foram aproveitadas CCEs com ajuste não linear satisfatório ($R^2 > 0,90$).

A CCE à 5-HT foi repetida na presença de 3 concentrações do antagonista KET (100, 300 e 600 nM) e em 2 concentrações de 2-APB (2 e 10 μ M). Além da estabilização da FC basal em um período de pelo menos 20 min, foi necessário também um período de pelo menos 20 min para estabilização da FC do vaso dorsal em cada concentração de KET e de 2-APB antes das adições sucessivas de 5-HT.

3.6 – Determinação do valor do pA_2

O método de ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959 foi aplicado para caracterizar a afinidade do antagonista competitivo KET pelos 5-HT_{2R}. Com esse método, pode-se estimar a constante aparente de dissociação do antagonista no receptor (K_B) a partir da relação entre o desvio produzido na CCE de 5-HT e a concentração molar do antagonista ($[KET]$). Um método quantitativo (Tallarida et al., 1979) prevê que a presença do antagonista reduz a ocupação do agonista pelo receptor para uma dada $[5-HT]$, e para se restaurar o efeito do agonista é necessária uma maior concentração do agonista ($[5-HT]'$). Considerando a razão das concentrações equiefetivas ($[5-HT]'/[5-HT]$) como DR, tem-se que:

$$\log (DR-1) = \log [KET] - \log K_B \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo assim, foi definido o pA_2 como logaritmo negativo da concentração molar de um antagonista que requer o dobro da concentração do agonista para a produção de um dado nível de resposta, e neste caso $pA_2 = -\log K_B$ (ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959, Tallarida et al., 1979).

O gráfico de Schild, no caso particular de antagonismo competitivo, é a relação linear entre $\log (DR-1)$ e $-\log [KET]$ com coeficiente angular unitário com intersecção no eixo das abscissas correspondente ao valor de $-\log K_B$ (Tallarida et al., 1979). A DR foi calculada dividindo o EC50 em cada CCE das 3 concentrações de KET pelo EC50 médio obtido das CCEs à 5-HT, e assim foi possível exibir o gráfico de Schild.

3.7 - Influência da inibição de PDE na atividade cronotrópica

O vaso dorsal foi exposto ao IBMX para se determinar a influência da inibição da PDE, e uma possível participação da formação de AMPc, na FC basal e na FC durante exposição ao agonista 5-HT. Para isso, após um período de estabilização da FC basal de pelo menos 20 min, um grupo de preparações foi incubado por 20 min em STM contendo 50 μM de IBMX e em seguida a preparação foi perfundida por 20 min em STM sem a presença de IBMX. A seguir, foi adicionado 100 nM de 5-HT à STM. Esse procedimento foi denominado *incub IBMX + lavagem* (**Figura 3.6-A**). Em outro grupo de preparações, o mesmo protocolo foi aplicado, mas após incubação com IBMX, as preparações foram perfundidas com STM contendo a mesma concentração de IBMX. A seguir, novamente foi aplicado 100 nM de 5-HT à perfusão juntamente com 50 μM de IBMX. Esse último procedimento foi denominado de *incub + perf IBMX* (**Figura 3.6-B**). Em todos os tratamentos, foi medida a FC do vaso dorsal.

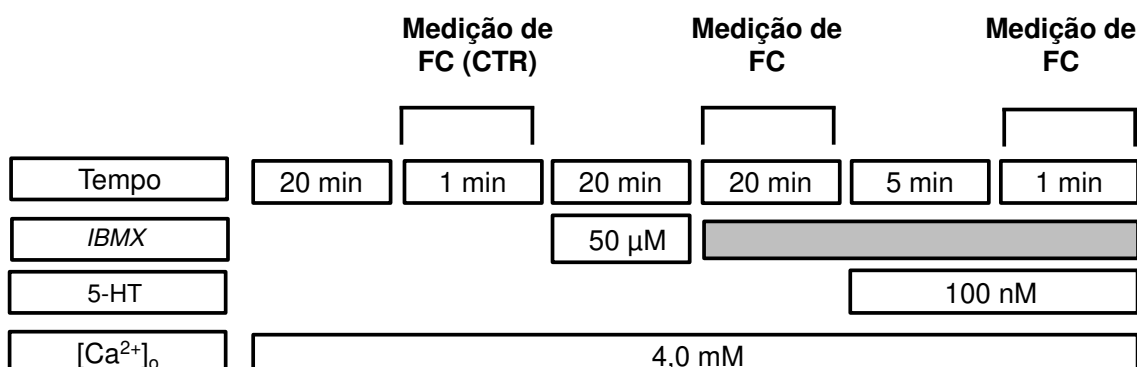
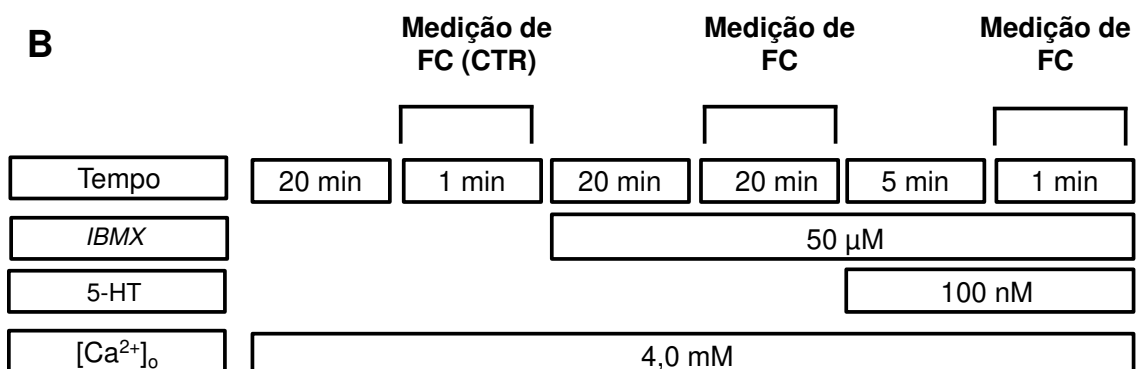
A**B**

Figura 3.6 – Ilustração dos protocolos para se determinar a influência da inibição das fosfodiesterases na atividade cronotrópica do vaso dorsal do coleóptero sem e durante perfusão com 100 nM de 5-HT. No protocolo *incub IBMX + lavagem* (A), após medição da frequência basal (CTR), o vaso dorsal foi incubado com 50 μ M de IBMX (20 min), mas sem perfusão (20 min) com o fármaco em STM no restante do experimento. No entanto, no protocolo *incub + Perf IBMX* (B) as preparações, além de serem incubadas com IBMX, também foram perfundidas com o fármaco após incubação e também durante perfusão em STM contendo 100 nM de 5-HT. Durante perfusão (20 min) após incubação com IBMX, foram medidas as FC espontâneas após 3, 5, 10, 15 e 20 (estabilização) min de perfusão

3.8 – Determinação da CCE ao agonista ADO

Como IBMX é um fármaco não seletivo e possui efeitos inibitórios em ADOR (Daly et al., 1987), foram determinadas CCEs ao agonista ADO. A CCE ao agonista foi repetida na presença de 2 concentrações do antagonista CGS15943 (CGS, 300 nM e 1 μ M), de uma concentração de DPCPX (1 μ M) e de duas concentrações de Zm241385 (Zm, 100 nM e 1 μ M). Em todos os casos, foi aguardado um período de pelo menos 20 min de estabilização da FC basal e da FC na presença das diferentes concentrações dos antagonistas antes do

aumento gradativo das concentrações de ADO. Os parâmetros como R_{max} e o EC_{50} foram extraídos da equação 1 utilizando a ADO como agonista em [A].

3.9 – Reposta cronotrópica do vaso dorsal ao agonista Oct

Também foi estudado um possível efeito cronotrópico da Oct, um clássico neurotransmissor com efeitos cronotrópicos positivos e negativos no vaso dorsal (Lin et al., 2011, Papaefthimiou & Theophilidis, 2011). Após estabilização da FC em STM (CTR), um conjunto de preparações foi submetido a 10 fM de Oct e medida a FC estabilizada do coração nesta concentração. Em outro conjunto de preparações, o efeito de três concentrações micromolares (1, 3 e 10 μ M) de Oct na atividade cronotrópica do vaso dorsal também foi estudado. A FC do vaso dorsal foi medida, após estabilização, na ausência (CTR) e na presença de cada uma das concentrações de Oct.

3.8 – Análise estatística

Os dados estão apresentados como médias \pm erro-padrão da média. Para melhor realçar variações na sensibilidade das preparações, o EC_{50} foi convertido para seu logaritmo negativo (pD_2). Para comparação estatística foi utilizado o teste t de *Student* para dados pareados para comparação das FC antes e depois da aplicação dos fármacos. Utilizou-se a análise de variância mono e bifatorial para amostras pareadas ou não pareadas. Quando necessário, foi utilizado o teste auxiliar de *Newman-Keuls* e de Bonferroni para comparação das médias de pD_2 e R_{max} em diferentes grupos. Significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* Prism versão 5.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

Capítulo 4 : Resultados

4.1 – Programa de computador desenvolvido em *Labview* versão 11.0

Para estudo da frequência e amplitude de contrações do coração, foi desenvolvido um programa de computador em *Labview* versão 11.0 (Licença FEEC/UNICAMP) anexado à uma interface amigável ao usuário. Desde que a plataforma *Labview* (pelo menos na versão 11.0) juntamente com os módulos VAS e VDM sejam devidamente instalados, o programa de computador pode ser copiado para qualquer diretório para que seja então acessado, sem a necessidade de instalação. O princípio de medição do diâmetro luminal do coração segue aquele desenvolvido em trabalho anterior (Fim Neto, 2012), mas os códigos de processamento foram incorporados à interface para um usuário visualizar os vídeos e sinais de medição do diâmetro luminal da atividade contrátil do coração durante o experimento. As configurações dos parâmetros de aquisição da câmera de vídeo sempre foram feitas na plataforma *Measurement and automation explorer* (Ver **Apêndice A.1** para mais detalhes). Uma vez configurados os parâmetros, o programa de computador pôde ser acessado no diretório em que foi inserido, sem a obrigatoriedade de se configurar novamente os parâmetros de aquisição da câmera de vídeo em novos acessos do programa de computador. As configurações dos parâmetros só deveram ser alteradas novamente em caso de necessidade de mudanças dos parâmetros de aquisição ou de uso de uma nova câmera de vídeo.

A **Figura 4.1** ilustra a interface do programa de computador logo que o usuário inicia seu uso, e também mostra como podem ser gravados os sinais do diâmetro luminal e os arquivos de vídeo. Depois que o usuário selecionar a câmera (**seta 1** da **Figura 4.1**) e iniciar aquisição do programa de computador (**seta 2**), uma caixa de diálogo aparece na interface (**seta 3**) para que o usuário especifique um diretório e nomeie o arquivo de texto no qual o sinal do diâmetro luminal ao longo do tempo será inserido. Depois desse procedimento, um cronômetro, com precisão de milissegundos (também é mostrada a data), inicia a contagem do tempo do experimento (**seta 4**). Além disso, como a taxa de aquisição da câmera de vídeo selecionada pelo usuário pode mudar durante oscilações da iluminação incidente, dois monitores foram adicionados à interface. Estão mostrados os monitores da variação do tempo de aquisição entre dois quadros consecutivos (**seta 5**) e também da variação da taxa de quadros (**seta 6**). Quando o usuário acionar a chave booleana (**Seta 7**), uma nova caixa de diálogo aparece na interface (**Figura 4.1-B**) para que o usuário nomeie o arquivo de vídeo a ser criado e para que os valores do diâmetro luminal ao longo do tempo sejam inseridos no arquivo de texto (exemplo do arquivo de texto com os registros no **Apêndice A.2**). Embora,

todo o sinal do diâmetro luminal ao longo do tempo seja inserido em um único arquivo de texto disponível após o usuário finalizar o programa de computador (**seta 8** da **Figura 4.1-A**), é disponibilizado um determinado número de arquivos de vídeo no diretório (selecionado pelo usuário) correspondente ao número de vezes em que o usuário acionou a chave (**seta 7** da **Figura 4.1**).

O tempo de cada arquivo de vídeo será o tempo em que a chave ficou acionada. O usuário sempre deve anotar, auxiliado pelo cronômetro do programa de computador, o tempo e a duração da aquisição do vídeo de modo que sempre se torne possível acessar no arquivo de texto o trecho do sinal correspondente a cada um dos vídeos.

A **Figura 4.2** ilustra detalhadamente todos os elementos da interface para o usuário extrair o sinal do diâmetro luminal do coração a partir do sinal de vídeo e registrar os parâmetros cardíacos. Depois que a caixa de diálogo para nomear o arquivo de texto (já detalhada na **seta 3** da **Figura 4.1-A**) desaparece da interface, o usuário pode mover uma ROI (linha verde, **seta 1** da **Figura 4.2**) no vídeo (**seta 2**). Devido às diferenças do diâmetro do lúmen do coração em cada linha do sinal de vídeo, como critério para padronização de todas as medições do diâmetro luminal, sempre que possível o usuário deve posicionar via inspeção visual a ROI em uma região do sinal de vídeo contendo o máximo D. As posições do início e do fim da ROI na altura e na largura no sinal de vídeo (**seta 3**), seu comprimento em *pixels* (**seta 4**) e em micrômetros (**seta 5**) são também exibidos na interface. Depois de posicionada a ROI no sinal de vídeo, um gráfico da intensidade luminosa de cada *pixel* da ROI é exibido (**seta 6**), a cada quadro. O sinal apresentado nesse gráfico pode ser filtrado por um filtro média móvel com número de *pixels*, que compõem a média, determinado pelo usuário (**seta 7**). O método de medição se baseia em estimar o diâmetro luminal do coração a partir da contagem de *pixels*, dentro da ROI do sinal de vídeo, acima de um limiar cujo valor aparece na tela do programa (**seta 8**) e que pode ser modificado pelo usuário com o cursor do *mouse* (linha amarela, **seta 6**). O perfil deste gráfico pode mudar em diferentes preparações, por isso a necessidade de permitir ao usuário a flexibilidade de escolher o valor do limiar. Esta contagem de número de *pixels* mais claros é convertida para micrômetros por uma constante numérica (**seta 9**) e o sinal do diâmetro luminal é exibido em um gráfico (**seta 10**) contendo 10 s de informação, o que corresponde a 300 quadros (taxa de amostragem 30 quadros por segundo).

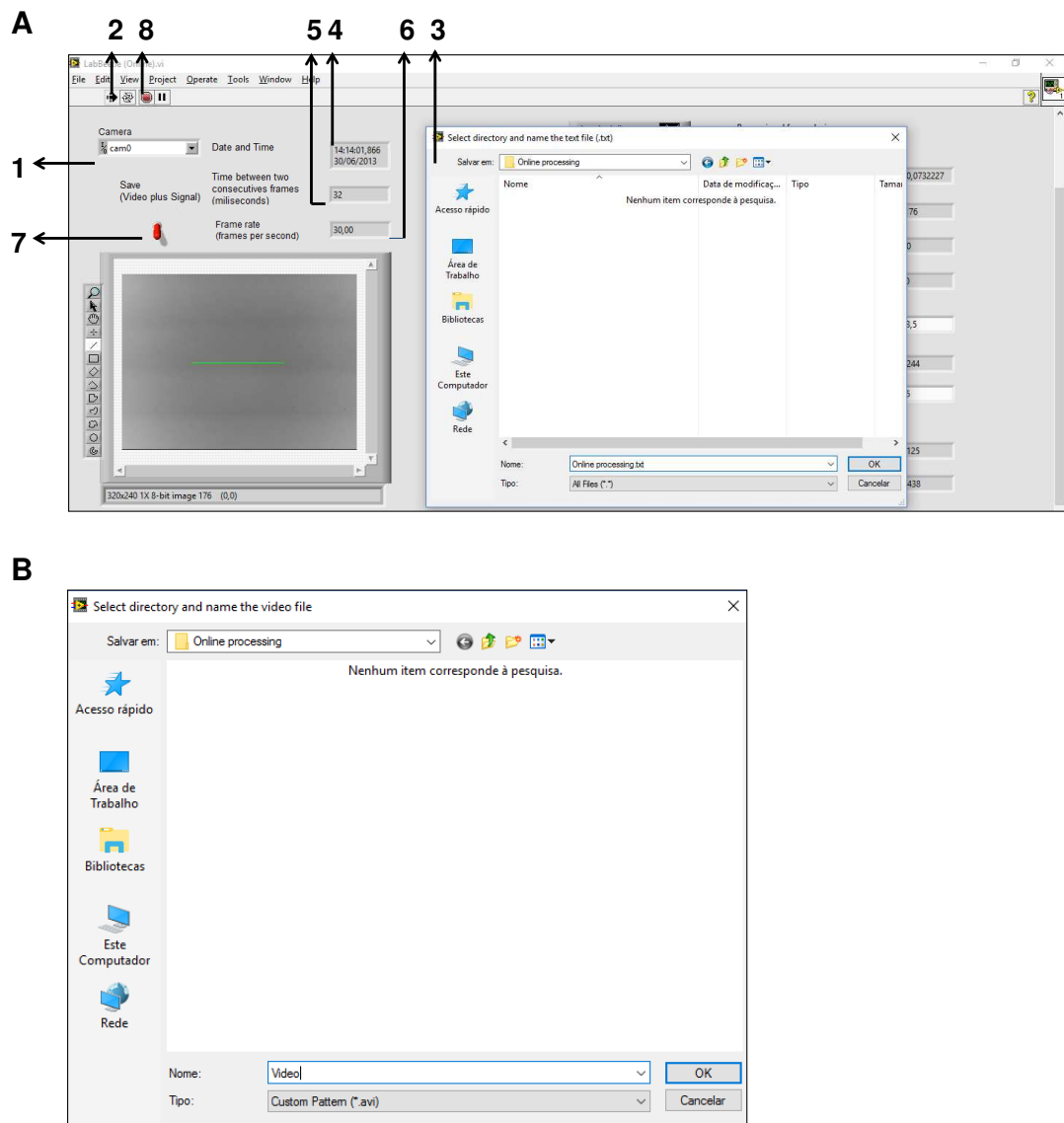


Figura 4.1 – Interface do programa de computador para monitoramento do diâmetro luminal e de registro dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do coração do *T. molitor*. **A:** Está ilustrada a interface em um momento imediato após o usuário ligar o programa de computador. Estão mostrados: (1) campo de seleção da câmera de vídeo; (2) botão para ligar o programa de computador; (3) caixa de diálogo para o usuário nomear o arquivo de vídeo (neste caso nomeado como *online processing.txt*); (4) cronômetro que mostra a data e o horário; (5) monitor de tempo de aquisição entre dois quadros consecutivos (s); (6) monitor da mudança da taxa de aquisição de quadros (*fps*, quadros por segundo); (7) chave booleana para gravação em um arquivo de texto do registro do diâmetro luminal ao longo do tempo e também do arquivo de vídeo correspondente. A chave está representada para baixo nesta ilustração, e, portanto, não está gravando nem o registro nem o arquivo de vídeo; (8) botão para desligar o programa de computador. **B:** Caixa de diálogo que aparece na interface quando a chave booleana for acionada (para cima) para nomear o arquivo de vídeo (nomeado como *Video*) a ser criado pelo programa.

O sinal pode ser pausado (**seta 11**) pelo usuário para estimar os parâmetros cardíacos. Um cursor vertical é utilizado para medir o tempo (**seta 12**) em um dado ponto do

sinal, por meio do *mouse*. Quando o usuário posicionar corretamente esse cursor em um ponto no início de uma contração e em um ponto contendo o vale de uma contração, pode-se calcular o t_{contr} pela diferença entre os tempos. Um outro cursor horizontal é utilizado para medir o diâmetro luminal (**seta 13**), por meio do *mouse*. O D e o ESD são medidos quando o cursor for posicionado corretamente pelo usuário, ou seja, posicionados sobre o valor máximo e mínimo de uma contração, respectivamente. Depois de registrar os valores, o usuário pode então calcular a FS pela equação 4:

$$FS = [(D - ESD) * 100] / D \quad \text{Equação 3}$$

O programa também calcula o número de vales de contração abaixo do cursor horizontal (**seta 14**) para estimar a FC (**seta 15**) a partir do inverso da média dos tempos entre dois vales consecutivos. Durante pausa do sinal, o usuário pode registrar valores dos parâmetros D, ESD e t_{contr} em diferentes contrações do sinal de encurtamento em uma planilha (Exemplo de como organizar os dados em uma planilha no **Apêndice A.3**).

O usuário pode pausar várias vezes o sinal para registrar os parâmetros cardíacos simultaneamente à gravação de um arquivo de vídeo que é de seu interesse. Depois de pausar o sinal, os últimos parâmetros calculados pelo programa de computador ficam permanentes na interface até a próxima pausa para uma nova medição dos parâmetros.

A **Figura 4.3** ilustra um exemplo de registro extraído do arquivo de texto fornecido pelo programa de computador.

Para estimativa do tempo para 50% do período do relaxamento ($T_{0.5\text{-relax}}$), foi necessária uma análise *offline* do sinal. Esse parâmetro pôde ser extraído por meio de uma regressão não-linear (decaimento exponencial) em uma parte do registro que contenha os valores do diâmetro luminal entre o início e o fim do relaxamento do coração.

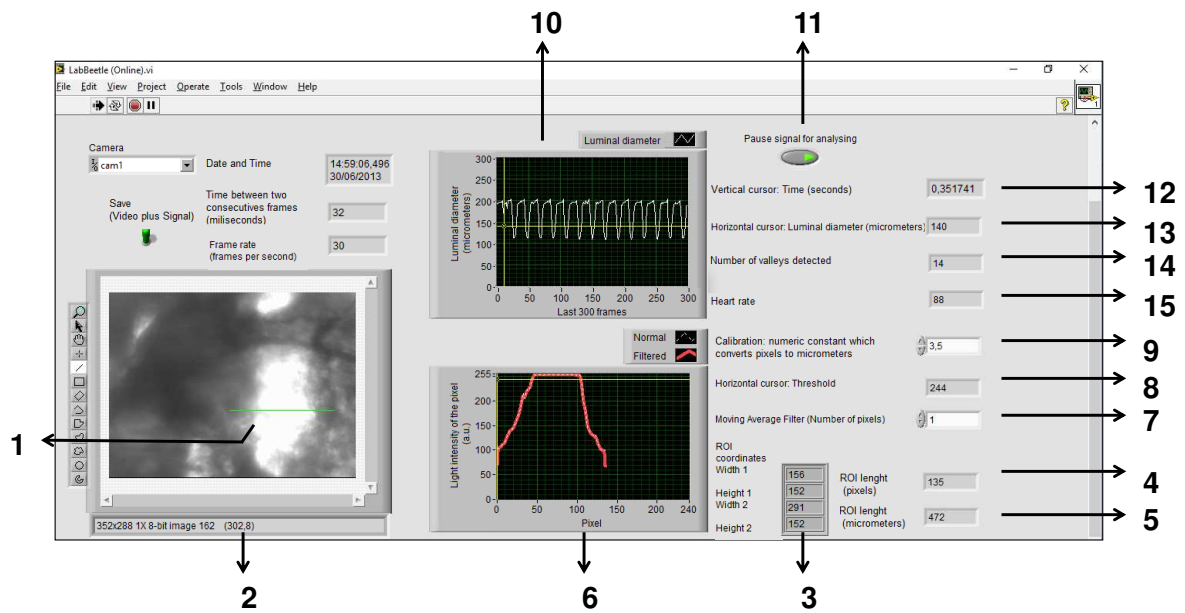


Figura 4.2 - Interface do programa de computador desenvolvido em *Labview* versão 11.0. Nesta ilustração está detalhado como o usuário pode extrair o diâmetro luminal do coração a partir da ROI no sinal de vídeo e também mostra onde estão exibidos os parâmetros da atividade contrátil do coração do *T. molitor*. Estão indicados: (1) ROI; (2) sinal de vídeo; (3) posições do início e do fim da ROI na Largura (*Width*) e na Altura (*Height*) do sinal de vídeo; (4) comprimento da ROI em *pixels*; (5) comprimento da ROI em micrômetros; (6) gráfico de intensidade luminosa para cada *pixel* da ROI; (7) número de *pixels* do filtro média móvel para filtragem do sinal exibido em 6; (8) valor de intensidade luminosa para contagem de *pixels* acima deste limiar; (9) constante numérica que converte o número de *pixels* contados acima do limiar para micrômetros; (10) sinal do diâmetro luminal ao longo dos últimos 300 quadros (10 s para uma taxa de aquisição de quadros constante em 30 quadros por segundo); (11) botão para pausar o sinal em 10; (12) tempo extraído da posição do cursor vertical no sinal; (13) diâmetro luminal extraído da posição do cursor horizontal no sinal; (14) número de vales detectados abaixo do cursor horizontal no sinal; (15) frequência cardíaca extraída a partir do sinal.

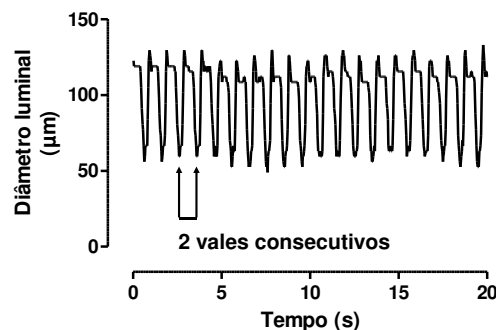
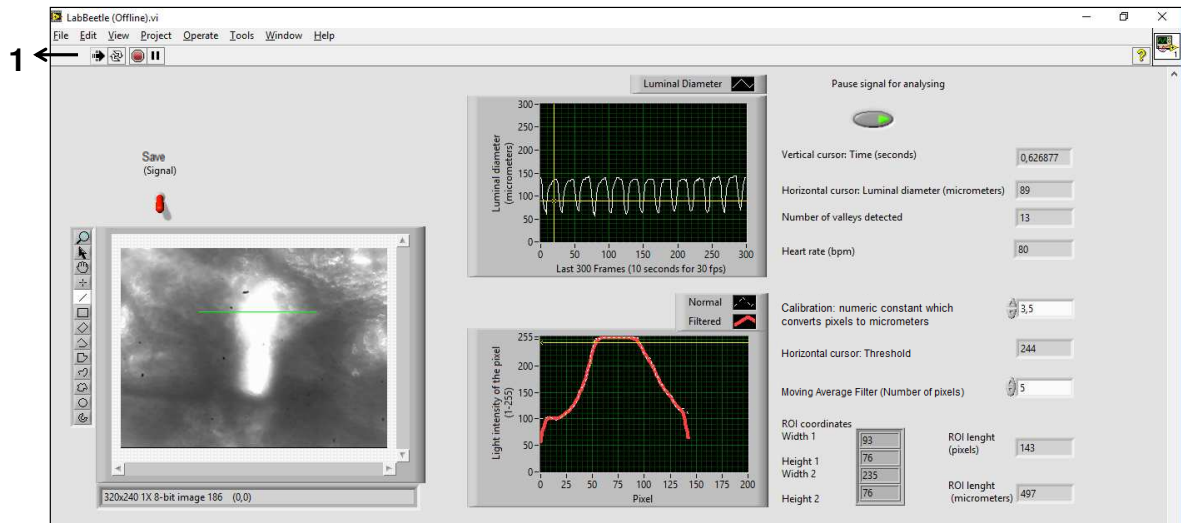


Figura 4.3 – Registro da variação do diâmetro luminal (μm) vs. tempo (s) do coração durante atividade espontânea. O registro foi obtido a partir de um trecho específico do arquivo de texto gerado pelo programa de computador e que foi exportado para o *software* GraphPad Prism para então gerar e exibir o registro apresentado.

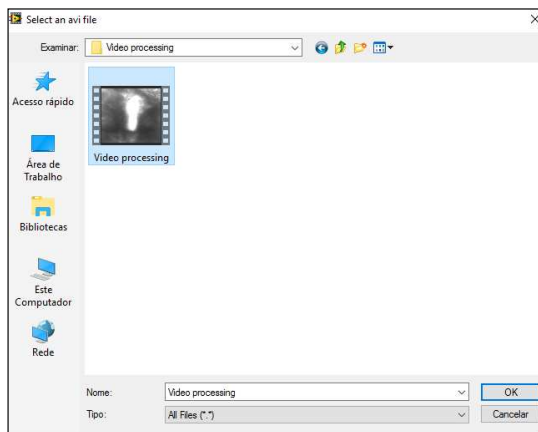
Caso o registro do sinal do diâmetro luminal durante os experimentos estivessem com muito ruído, o arquivo de vídeo gravado era reanalisado em uma outra versão do programa de computador (versão *offline*) para uma melhor estimativa dos parâmetros da atividade contrátil do vaso dorsal. Vale ressaltar que ambas versões funcionam de maneira independente, ou seja, o usuário pode optar por extrair os parâmetros durante ou até mesmo após o experimento (método *offline*) por meio dos arquivos de vídeo previamente gravados.

A **Figura 4.4-A** ilustra a interface deste programa, que usa o mesmo princípio de processamento da versão utilizada durante os experimentos, mas o sinal de vídeo provém de um arquivo de vídeo, não da câmera de vídeo, e alguns ícones da interface não estão presentes. Após ligar o programa (**seta 1**), uma caixa de diálogo aparece na interface (exemplo na **Figura 4.4-B**) para que o usuário acesse o arquivo de vídeo a ser novamente analisado. Após acessar o arquivo de vídeo, uma nova caixa de diálogo (**Figura 4.4-C**) aparece para o usuário nomear o arquivo de texto em que será inserido o sinal do diâmetro luminal ao longo do tempo. Na versão *offline* do programa de computador, no arquivo de texto só está contido o sinal do diâmetro luminal e tempo.

A



B



C

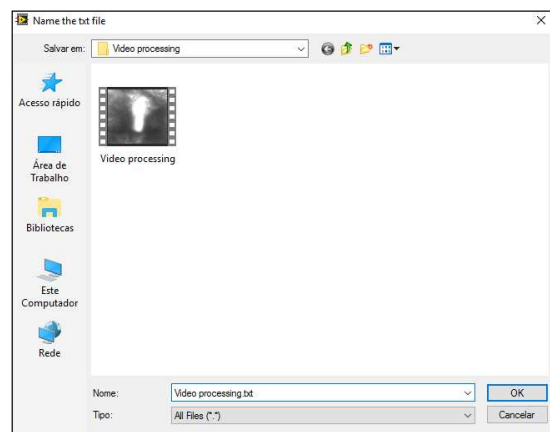


Figura 4.4 - Versão *offline* do programa de computador para medição do diâmetro luminal e dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do coração do *T. molitor*. **A**: está ilustrada a interface do programa, que possui em sua maioria os ícones da interface apresentadas nas **Figuras 4.1** e **4.2**. **B**: caixa de diálogo que aparece na interface do programa para que o usuário acesse o arquivo de vídeo a ser reanalisado. **C**: caixa de diálogo que também aparece na interface para que o usuário nomeie o novo arquivo de texto gerado pela versão *offline* do programa de computador contendo os valores do diâmetro luminal ao longo do tempo.

4.2 – Atividade cronotrópica e inotrópica alteradas pela inibição simultânea do influxo de Ca^{2+} pelos canais de membrana e pela liberação de Ca^{2+} do RS

O efeito da inibição simultânea do influxo de Ca^{2+} pelos canais de membrana e da liberação de Ca^{2+} do RS na atividade cronotrópica e na inotrópica foi estudada com auxílio do programa de computador em um conjunto de preparações. Os efeitos do *thapsigargin* se assemelharam aqueles já demonstrados usando o composto cafeína (Fim Neto, 2012), i.e., efeito inotrópico negativo e prolongamento do curso temporal das contrações (**Figura 4.5**).

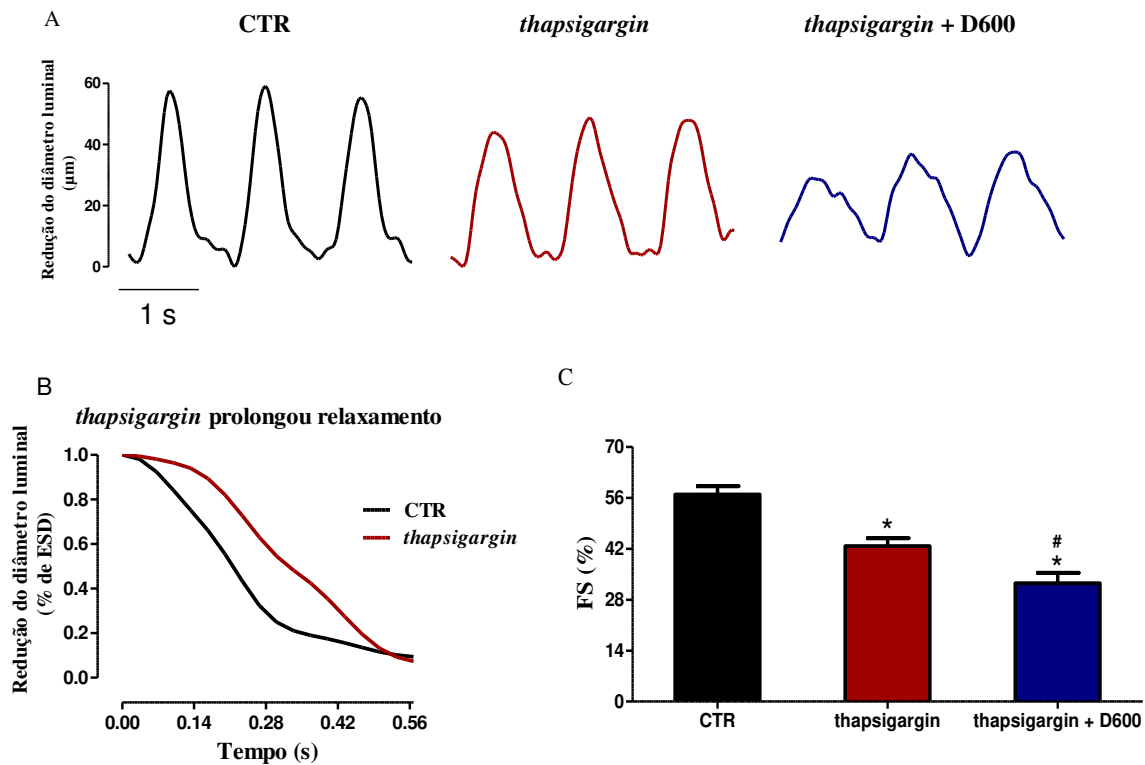


Figura 4.5 - Efeitos da inibição simultânea da ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a) e dos canais de Ca^{2+} tipo-L no coração do *T. molitor*. **A:** Contrações (apresentadas como redução do diâmetro luminal (μm)) durante estimulação elétrica em 0,8 Hz (registro das contrações à esquerda, CTR), após incubação com 10 μM de *thapsigargin* e perfusão em STM (registro das contrações ao centro, *thapsigargin*) e durante perfusão com 10 μM de D600 (registro das contrações à direita, *thapsigargin* + D600). **B:** Amplitude de contrações do coração durante relaxamento, cujos valores, medidos em cada tempo e normalizados pelo diâmetro luminal sistólico (ESD), são exibidos antes (traçado contínuo preto, CTR) e depois da inibição da SERCA2a (traçado contínuo vermelho, *thapsigargin*). **C:** FS foi reduzida durante estabilização do efeito do *thapsigargin* e a média da FS diminuiu um pouco mais durante perfusão com D600. Valores são apresentados como média ± erro padrão (N = 11). *: Diferença significativa para o CTR (P < 0,05; teste de Bonferroni); #: Diferença significativa para o *thapsigargin* (P < 0,05; Teste de Bonferroni). N = 11.

Em uma série de 11 corações estimulados a 0,8 Hz, *thapsigargin* diminuiu FS (de $56,91 \pm 2,27$ para $42,73 \pm 2,17$ %; P < 0,05; teste de Bonferroni), enquanto aumentou t_{contr} (de 303 ± 20 para 564 ± 53 ms; P < 0,05; teste de Bonferroni) e $t_{0,5\text{-relax}}$ (de 158 ± 12 para 294 ± 24 ms; P < 0,0001; **Figura 4.5-B**). A exposição das preparações tratadas com *thapsigargin* a 10 μM de D600 reduziu a FS em 25 % ($42,73 \pm 2,17$ para $32,55 \pm 2,84$ %; P < 0,05; **Figura 4.5-A, C**), mas não afetou t_{contr} (555 ± 21 vs. 564 ± 53) nem o $t_{0,5\text{-relax}}$ (293 ± 21 vs. 294 ± 24 ms).

Além disso, a ação simultânea desses fármacos exerceu também efeito cronotrópico negativo (P < 0,0001; **Figura 4.6**). A FC para os diferentes tratamentos

farmacológicos foi medida antes da estimulação e após estabilização da FC espontânea do coração na concentração estudada do fármaco. *Thapsigargin* diminuiu FC (de 44 ± 3 para 29 ± 2 %; $P < 0,05$; teste de Bonferroni), e esse efeito cronotrópico negativo foi amplificado por D600 (de 29 ± 2 para 15 ± 2 %; $P < 0,05$; teste de Bonferroni).

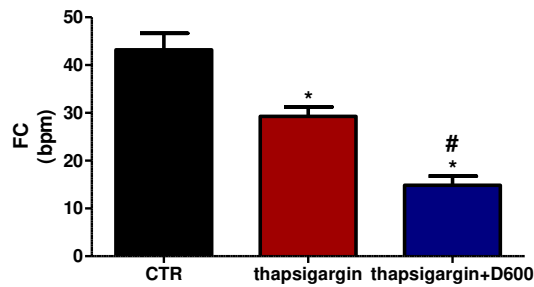


Figura 4.6 - Efeitos da inibição simultânea da ATPase de Ca^{2+} do RS e dos canais de Ca^{2+} tipo-L na atividade cronotrópica espontânea (antes da estimulação em 0,8 Hz) do coração do *T. molitor*. *Diferença significativa para o grupo CTR ($P < 0,05$; teste de Bonferroni); #: Diferença significativa para o grupo *thapsigargin* ($P < 0,05$; Teste de bonferroni). N = 15.

Dessas 11 preparações, 4 foram subsequentemente expostas à perfusão em STM com 10 μM de KB-R7943, que não alterou significativamente FC, FS e nem os cursos temporais da contração (**Tabela 4.1**) em relação à ação combinada de *thapsigargin* e D600.

Tabela 4.1 - Efeitos da inibição simultânea dos canais de Ca^{2+} da membrana e da liberação de Ca^{2+} pelo RS na frequência cardíaca (FC, bpm), na porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico (FS, %), no tempo de contração (t_{contr} , ms) e no tempo de 50 % do relaxamento ($t_{0,5\text{-relax}}$, ms) do coração do *T. molitor*. Os parâmetros cardíacos estão mostrados na ausência dos fármacos na perfusão (CTR), e durante exposição: (1) somente ao *thapsigargin*; (2) ao *thapsigargin* e ao D600; (3) ao *thapsigargin* e ao D600, e também ao KB-R7943. N é o número de preparações utilizadas. *: $P < 0,05$ vs. CTR (teste de Bonferroni); #: $P < 0,05$ vs. 1 (teste de Bonferroni)

	FC (Bpm)	FS (%)	T_{contr} (ms)	$T_{0,5\text{-relax}}$ (ms)	N
CTR	$38,00 \pm 6,61$	$60,50 \pm 3,20$	302 ± 51	171 ± 20	4
1	$30,80 \pm 3,66$	$50,75 \pm 2,17$	$641 \pm 78^*$	295 ± 52	4
2	$12,80 \pm 3,02^*,\#$	$38,25 \pm 6,95^*$	$600 \pm 55^*$	301 ± 55	4
3	$9,40 \pm 3,02^*,\#$	$32,75 \pm 7,47^*,\#$	$639 \pm 68^*$	$317 \pm 42^*$	4

4.3 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista 5-HT

A **Figura 4.7** mostra dois registros (diâmetro luminal vs. tempo) quando o vaso dorsal do *T. molitor* foi submetido à duas concentrações da 5-HT. Após estabilização da FC em 56 bpm em STM (4 mM de $[\text{Ca}^{2+}]_o$), nota-se que uma concentração elevada de 5-HT (100 nM) exerce um aumento considerável na atividade cronotrópica do vaso dorsal, afetando também a amplitude das contrações.

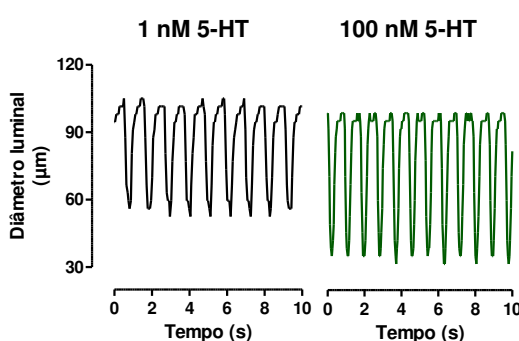


Figura 4.7 - Monitoramento do diâmetro luminal (μm) por 10 s em STM contendo 1 nM (parte esquerda) e 100 nM (parte direita) de 5-HT. FC basal do vaso dorsal foi de 56 bpm, valor medido que se manteve durante perfusão contendo 1 nM de 5-HT na STM. A FC do vaso dorsal aumentou para 72 bpm durante perfusão em STM contendo 100 nM de 5-HT.

Foram determinadas CCEs à 5-HT em um conjunto de preparações (i.e. resposta cronotrópica à diferentes concentrações de 5-HT na STM) das quais foram extraídos os parâmetros farmacológicos como pD2 e Rmax. Esses parâmetros podem ser encontrados na **Tabela 4.2**. O vaso dorsal do *T. molitor* demonstrou uma alta sensibilidade ao agonista, uma vez que o EC50 se encontrou na faixa de concentração nanomolar cujo valor médio foi de $17,7 \pm 3,4$ nM (N = 18). A Resposta cronotrópica do vaso dorsal do *T. molitor* às distintas concentrações de 5-HT está mostrada na **Figura 4.8**.

Tabela 4.2 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.

	Rmax (bpm)	pD2	N
5-HT	$28,11 \pm 2,32$	$7,950 \pm 0,115$	18

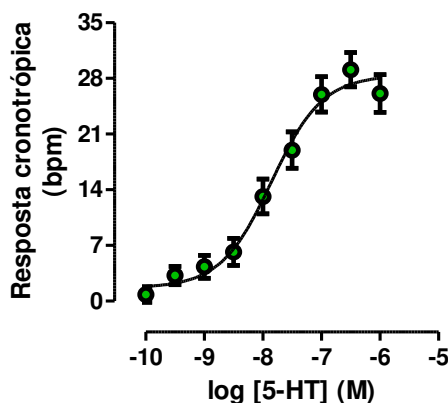


Figura 4.8 - Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal à 5-HT expressa em bpm para cada concentração de 5-HT. A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência antes da adição do agonista. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros pD2 e Rmax podem ser encontrados na **Tabela 4.2**.

Foi também determinado um teste de reprodutibilidade da CCE à 5-HT em um conjunto de preparações. A finalidade desses experimentos foi estudar se seria possível reproduzir CCEs à 5-HT com parâmetros iguais na mesma preparação. Foram repetidas 4 CCEs em uma mesma preparação e determinados os parâmetros pD2 e Rmax em cada CCE. Todos os parâmetros das CCEs determinados em cada uma das preparações (N = 4) estão demonstrados na **Tabela 4.3**. Foi observado que os parâmetros pD2 e Rmax variam quando repetidas CCEs foram feitas na mesma preparação, logo, não foi possível utilizar amostras

pareadas para comparação desses parâmetros entre os grupos sem (Controle) e com tratamento com fármacos e antagonistas.

Tabela 4.3 - Teste de reprodutibilidade da CCE à 5-HT na mesma preparação. Em cada preparação, a CCE à 5-HT foi repetida 4 vezes (ordem crescente de 1 a 4). O tempo de espera entre cada CCE foi de 40 min. Para cada CCE foram calculados, pelo ajuste da função sigmoidal, os valores de **pD2** e a **Rmax** (unidades e abreviaturas mesmos da Tabela 4.1). * não foi possível obter ajuste não linear satisfatório.

CCE	Preparação 1		Preparação 2		Preparação 3		Preparação 4	
	Rmax (bpm)	pD2	Rmax (bpm)	pD2	Rmax (bpm)	pD2	Rmax (bpm)	pD2
1	35	7,812	28	7,681	43	8,458	24	8,104
2	26	7,798	17	7,350	21	8,215	*	*
3	23	7,555	29	7,246	31	8,376	*	*
4	15	7,449	17	6,876	19	8,299	*	*

4.4 - Receptor serotoninérgico envolvido no efeito cronotrópico positivo do vaso dorsal

A CCE ao agonista 5-HT foi repetida na presença de 3 concentrações do antagonista KET. As concentrações utilizadas de 100, 300 e 600 nM estão distantes do pA_2 de 9,2 descrito em arteríola de rato (Marwood, 1994) para melhor realçar o antagonismo de KET exercido sobre efeito cronotrópico positivo da 5-HT. O **pD2** da 5-HT foi diminuído progressivamente ($P < 0,00001$) à medida em que foi aumentada a concentração de KET, mas não houve alteração de **Rmax** ($P = 0,4161$), o que demonstra um possível antagonismo competitivo de KET sobre o subtipo 5-HT_{2R}. Em nenhuma dessas concentrações de KET a FC basal foi modificada: para 100 nM de KET ($62,00 \pm 3,61$ bpm (Controle (CTR)) vs. $66,67 \pm 3,77$ bpm (Tratado com KET); $P = 0,2794$; $N = 12$; teste t de *Student* pareado), para 300 nM de KET ($59,00 \pm 3,38$ bpm (CTR) vs. $63,23 \pm 3,07$ bpm (Tratado com KET); $P = 0,1646$; $N = 13$; teste t de *Student* pareado) e por fim para 600 nM de KET ($52,88 \pm 4,70$ bpm (CTR) vs. $58,13 \pm 3,32$ bpm (Tratado com KET); $P = 0,1190$; $N = 8$; teste t de *Student* pareado). Os parâmetros **pD2** e **Rmax** podem ser encontrados na **Tabela 4.4**. A resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença das várias concentrações de KET pode ser vista na **Figura 4.9**.

Tabela 4.4 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 3 concentrações de KET (100, 300 e 600 nM). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT+KET; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da CCE pela função sigmoidal. Comparação das médias: *: $P < 0,05$ vs. grupo 5-HT (Teste de *Newman-Keuls*); #: $P < 0,05$ vs. grupo 5-HT+KET (100 nM) (Teste de *Newman-Keuls*).

	Rmax (bpm)	pD2	N
5-HT	28,11 \pm 2,32	7,950 \pm 0,115	18
5-HT+KET (100 nM)	29,92 \pm 2,37	7,489 \pm 0,068*	12
5-HT+KET (300 nM)	33,31 \pm 2,71	7,245 \pm 0,084*	13
5-HT+KET (600 nM)	28,00 \pm 2,28	6,944 \pm 0,051*.#	8

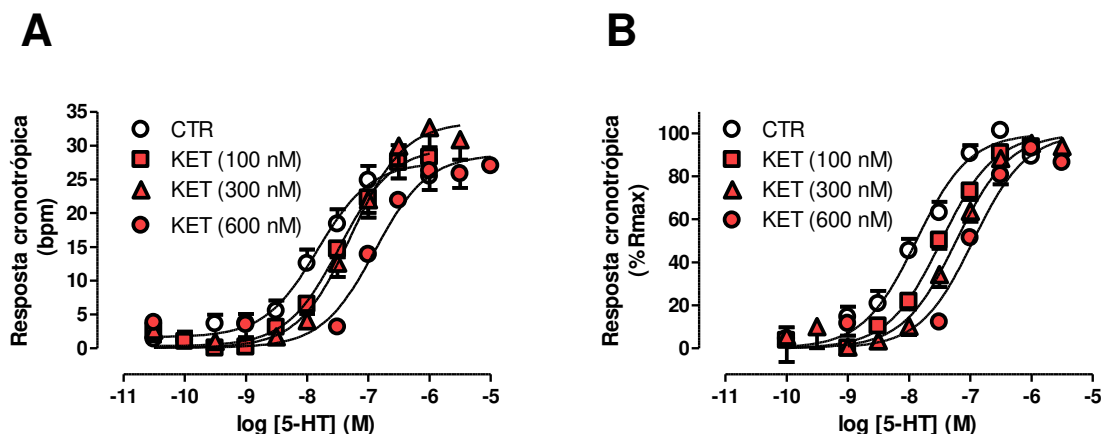


Figura 4.9 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 3 concentrações do antagonista KET. **A**: Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de 5-HT. A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência após estabilização da FC na presença do antagonista e imediatamente antes da adição do agonista. **B**: Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax para melhor realçar modificações na sensibilidade à 5-HT. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros **pD2** e **Rmax** da CCE podem ser encontrados na **Tabela 4.2** e também na **Tabela 4.4**.

Como visto na **Tabela 4.5** e na **Figura 4.10**, o coeficiente angular do gráfico de Schild, determinado para o antagonismo de KET exercido sobre a 5-HT, não foi estatisticamente diferente de 1. Isto sugere uma possível homogeneidade dos 5-HT_{2R}. No entanto, esse valor se inseriu em uma longa faixa do intervalo de confiança. Além disso, o pA_2 , uma estimativa da afinidade do antagonista com o receptor, foi de 7,134, o que significa que a concentração mínima do antagonista para dobrar o EC₅₀ da 5-HT está próxima de 100 nM.

Tabela 4.5 - Valores de pA_2 da ketanserina (KET) e coeficiente angular da reta de Schild, obtidas, utilizando 5-HT como agonista no vaso dorsal do *T. molitor*. Estão apresentados os valores médios acompanhados dos limites do intervalo de confiança para 95% (IC 95%). O número de preparações em cada grupo N está indicado.

	pA_2 (IC 95%)	Coeficiente Angular (IC 95%)	N
5-HT+KET	7,134 (6,919 - 7,650)	0,963 (0,559 – 1,519)	51

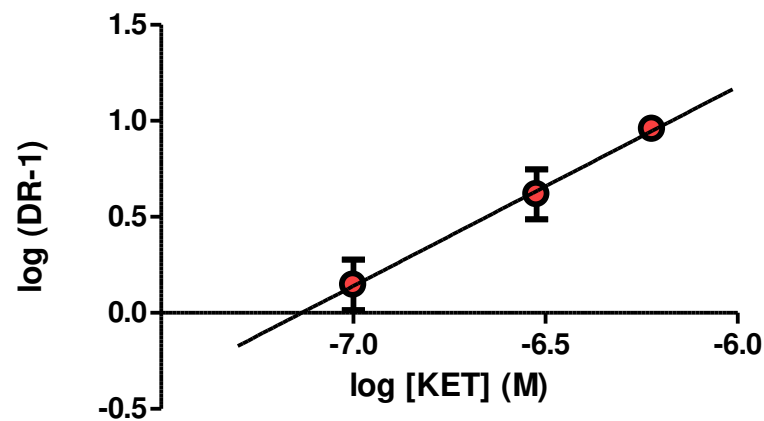


Figura 4.10 - Gráfico de Schild para o antagonismo exercido pela ketanserina (KET) sobre o efeito cronotrópico positivo da 5-HT no vaso dorsal do *T. molitor*. (DR: razão das concentrações equiefetivas).

4.5 – Segundos mensageiros ativados durante o efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal causado pela 5-HT

Como os 5-HT₂R são acoplados às proteínas $G_{\alpha q}$ (Hoyer et al., 1994, Hannon & Hoyer, 2008), foi examinada a resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença do inibidor não seletivo dos IP₃R (2-APB), uma vez que a ativação dos 5-HT₂R possa ter desencadeado o aumento da concentração citosólica de IP₃. O EC₅₀ da inibição de IP₃R pelo 2-APB é aproximadamente 40 μ M (Maruyama et al., 1997). Inicialmente, a CCE à 5-HT na presença de 2-APB seria determinada em uma concentração acima desse EC₅₀, mas foi demonstrado que a exposição prolongada do vaso dorsal a uma concentração acima do EC₅₀ (80 μ M de 2-APB) aboliu a atividade contrátil do coração, como pode ser visto na **Figura 4.11-A**. A exposição prolongada do coração a uma concentração menor de 2-APB (10 μ M) não cessou as contrações, mas implicou em um padrão irregular das contrações do vaso dorsal como observado na **Figura 4.11-B**.

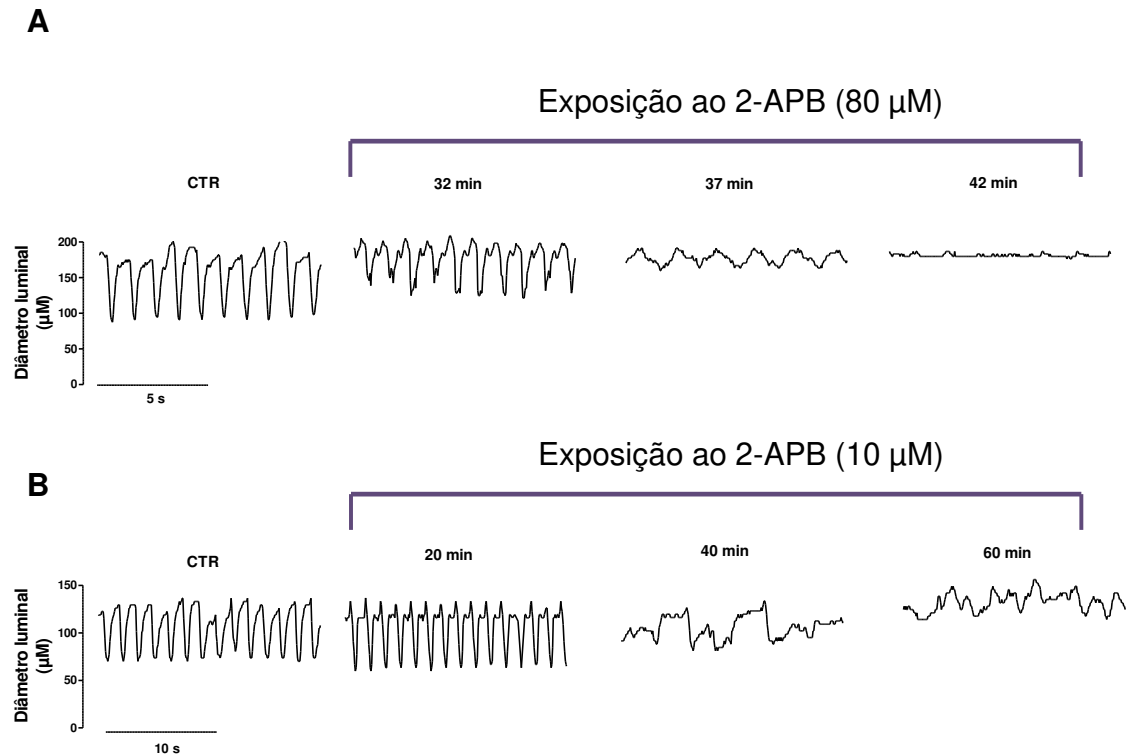


Figura 4.11 - Monitoramento do diâmetro luminal do vaso dorsal do *T. molitor* durante exposição prolongada ao 2-APB. **A:** Exposição a 80 μ M de 2-APB. CTR corresponde a um trecho do registro em que a FC basal do vaso dorsal estabilizou. É notável que após um período de tempo a contração do vaso dorsal cessa. **B:** Exposição a 10 μ M de 2-APB. As contrações não cessaram nessa concentração de 2-APB, mas pode ser observado um padrão irregular da atividade contrátil em um tempo de exposição prolongado (> 40 min) ao inibidor.

Em outra concentração menor de 2-APB (2 μ M), as contrações do vaso dorsal não cessaram e nem tampouco apresentaram um padrão irregular em um período suficiente (cerca de 50 min de exposição ao 2-APB) para se completar a CCE à 5-HT na presença do inibidor, como observado na **Figura 4.12-A**. O padrão regular das contrações do coração se manteve durante aplicação de diferentes concentrações de 5-HT na STM (**Figura 4.12-B**).

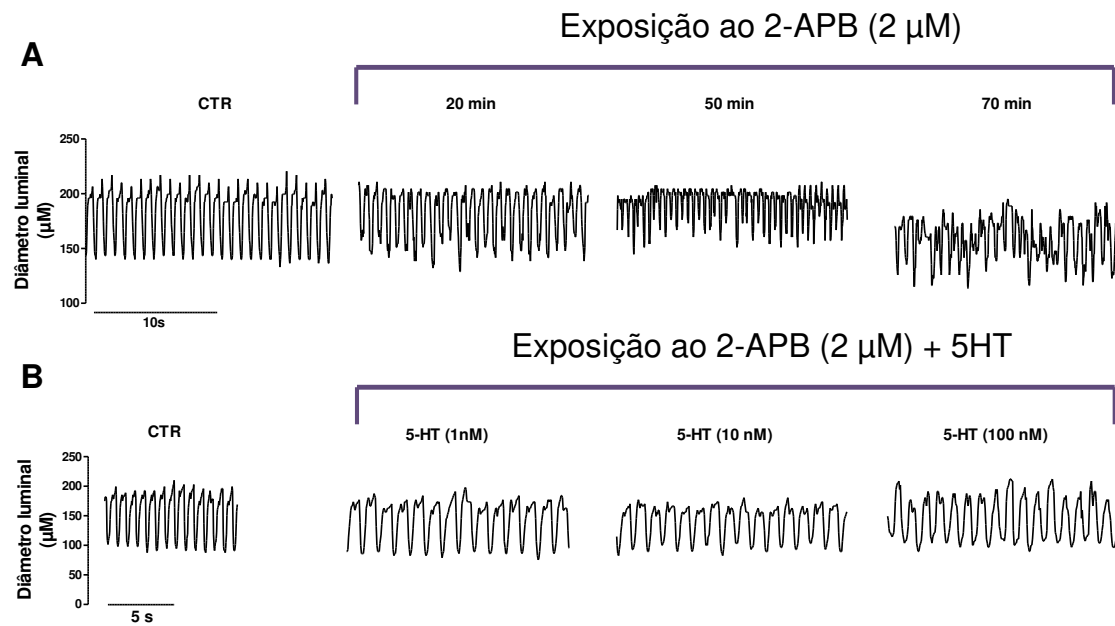


Figura 4.12 - Monitoramento do diâmetro luminal (μm) do vaso dorsal do *T. molitor* durante exposição prolongada à baixa concentração de 2-APB. **A:** Exposição à 2 μM de 2-APB. CTR corresponde a um trecho do registro em que a FC basal foi estabilizada. Pode ser observado um padrão regular das contrações nesta concentração de 2-APB. **B:** Exposição de outra preparação à 2 μM de 2-APB em diferentes concentrações de 5-HT. O padrão regular de contração do vaso dorsal se manteve.

Dessa maneira, foi possível obter CCEs à 5-HT durante exposição do vaso dorsal às concentrações de 2 e de 10 μM de 2-APB. As respostas cronotrópicas do coração à estas concentrações são mostradas na **Figura 4.13** e os parâmetros são encontrados na **Tabela 4.6**. Em ambas as concentrações de 2-APB houve redução significativa de **Rmax** ($P < 0,005$) e de **pD2** ($P < 0,05$). Além disso, vale ressaltar que a FC basal do vaso dorsal não foi alterada durante exposição por 20 min a 10 μM de 2-APB ($64,14 \pm 4,68$ (CTR) vs. $70,57 \pm 4,47$ bpm (Tratado com 2-APB); $P = 0,1580$; $N = 7$; teste t de *Student* pareado) e nem a 2 μM de 2-APB ($75,20 \pm 4,68$ bpm (CTR) vs. $78,80 \pm 5,04$ (Tratado com 2-APB); $P = 0,2326$; $N = 5$; teste t de *Student* pareado).

Tabela 4.6 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 2 concentrações de 2-APB (2 e 10 μ M). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. **N** é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à 5-HT+2-APB; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima à 5-HT. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da CCE pela função sigmoidal. Teste de comparação das médias: *: $P < 0,05$ vs. grupo 5-HT (Teste de *Newman-Keuls*).

	Rmax (bpm)	pD2	N
5-HT	28,11 \pm 2,32	7,950 \pm 0,115	18
5-HT+2-APB (2 μM)	15,60 \pm 1,91*	8,127 \pm 0,280	5
5-HT+2-APB (10 μM)	16,00 \pm 1,95*	7,482 \pm 0,039	7

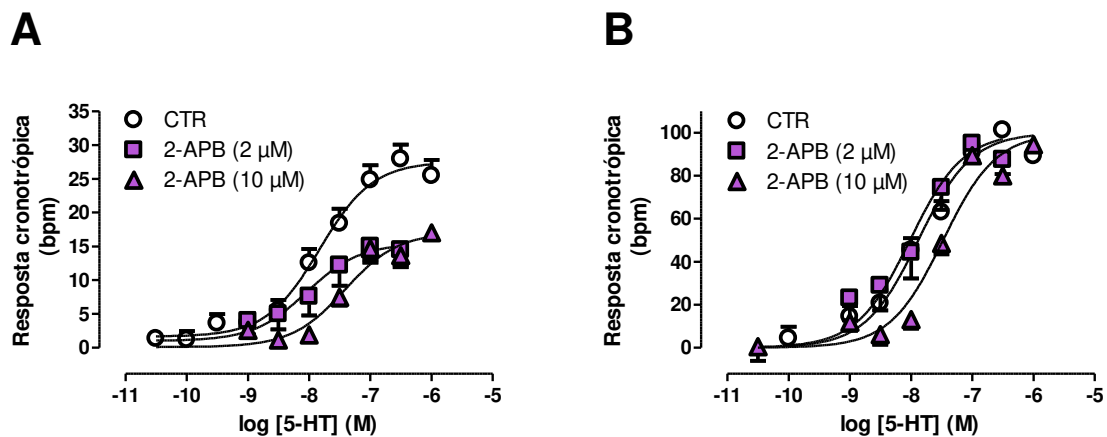


Figura 4.13 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à 5-HT na presença de 2 concentrações de 2-APB. Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de 5-HT na presença de 10 μ M e de 2 μ M de 2-APB (A). A frequência medida em cada concentração foi subtraída da frequência após estabilização com bloqueador do IP3R sem adição do agonista. Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax para 10 μ M de 2-APB e de 2 μ M (b). Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros **pD2** e **Rmax** podem ser encontrados na **Tabela 4.6**.

Além da via PLC-IP3-RS, outra via de sinalização que poderia ser ativada pela 5-HT é a AC-AMPC-PKA. Embora não existam relatos na literatura de que essa última via esteja associada à regulação da FC basal e ao efeito cronotrópico positivo à 5-HT na espécie *D. melanogaster* (Johnson et al., 2002, Majeed et al., 2013), há evidências de que o efeito cronotrópico positivo da 5-HT esteja associado ao aumento da concentração intracelular de AMPC na espécie *Manduca sexta* (Linnaeus, 1758; Lepidoptera, Sphingidae) (Prier et al., 1994). Assim, o vaso dorsal do *T. molitor* foi exposto ao IBMX, fármaco que aumenta a

concentração citosólica de AMPc por meio da degradação de PDE sem ativação de receptores (von der Leyen, 1989, Freitag et al., 1998). Foram testados dois procedimentos: após estabilização da FC espontânea, uma população de preparações (N = 7) foi submetida à incubação (inc) por 20 min com 50 μ M de IBMX seguida de lavagem por 20 min com STM sem a presença do fármaco (procedimento *incub IBMX + lavagem*), outras preparações (N = 8) foram submetidas ao mesmo procedimento, mas com a presença de 50 μ M de IBMX em perfusão (perf) com STM (procedimento *incub + perf IBMX*). A **Figura 4.14** ilustra a média das FC medidas em diferentes tempos durante a perfusão com STM nos dois procedimentos. No primeiro procedimento, a FC basal (sem adição de IBMX) foi de $65,00 \pm 5,63$ bpm e no segundo procedimento a FC basal foi de $66,75 \pm 3,02$ bpm. Como pode ser observado na **Figura 4.14** a FC espontânea aumenta nos primeiros minutos de perfusão (< 3 min) nos dois procedimentos, mas esse aumento de FC se manteve somente no procedimento de *incub + perf IBMX* ($P < 0,01$). Com isso, o efeito cronotrópico positivo exercido pelo IBMX no vaso dorsal é reversível.

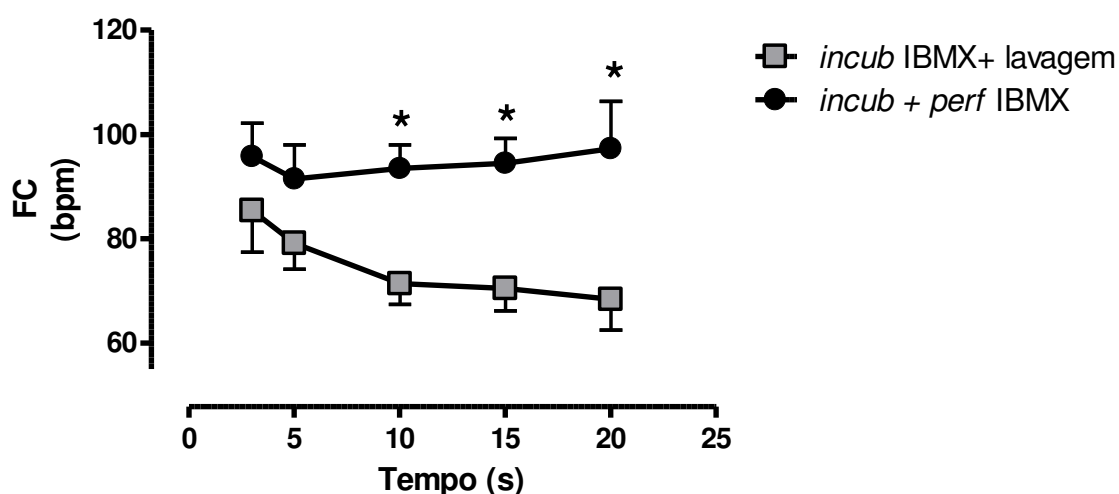


Figura 4.14 - Monitoramento da FC do vaso dorsal do *T. molitor* durante 20 min de perfusão (medição da FC em 3, 5, 10, 15 e 20 min) após ser previamente incubado por 20 min em STM contendo 50 μ M de IBMX. Estão demonstradas medições durante perfusão para dois procedimentos: incubação em STM com IBMX seguida de lavagem com STM sem IBMX (inc IBMX + lavagem) e incubação e perfusão com IBMX na STM (inc + perf IBMX). Os pontos indicam média \pm erro padrão. *: Diferença significativa ($P < 0,05$) da FC espontânea medida em tempos prolongados quando comparados os procedimentos (Análise de variância bifatorial).

Com base no procedimento *incub + perf IBMX*, foi observado que, além do aumento da FC espontânea durante perfusão com IBMX ($94,63 \pm 5,03$ vs. $66,75 \pm 3,02$ bpm),

a FC espontânea aumentou também durante a exposição combinada de 100 nM de 5-HT com IBMX ($106,30 \pm 4,46$ vs. $94,63 \pm 5,03$ bpm). Isto demonstra que a 5-HT amplificou o efeito cronotrópico positivo causado pelo IBMX. A **Figura 4.15** ilustra a média de FC em cada tratamento.

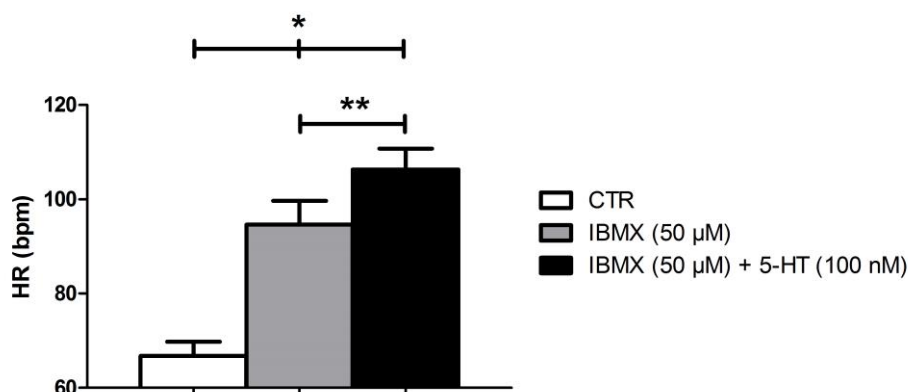


Figura 4.15 - FC medida durante perfusão do vaso dorsal (previamente incubado por 20 min com o fármaco) em STM contendo 50 μ M de IBMX. Está mostrada também o resultado da medição de FC durante exposição combinada do vaso dorsal a 100 nM de 5-HT com IBMX. Os pontos indicam média \pm erro padrão. Comparação de médias: *: $P < 0,05$ vs. CTR (Teste de Bonferroni); **: $P < 0,05$ vs. IBMX (Teste de Bonferroni).

Além disso, a **FC_{max}** e a **R_{max}** alcançadas por esse grupo de preparações submetidas ao concomitante tratamento de 100 nM de 5-HT com IBMX foi maior do que a **FC_{max}** e **R_{max}**, respectivamente, calculadas a partir da CCE à 5-HT ($P < 0,05$). Esses valores comparados podem ser encontrados na **Tabela 4.7**.

Tabela 4.7 - Comparação das FC_{max} e R_{max} obtidas das preparações tratadas com IBMX+5-HT (100 nM) e das CCE à 5-HT em outro conjunto de preparações. Valores expressos em bpm. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. Comparação de médias: *: $P < 0,05$ vs. CCE à 5-HT (Teste de Bonferroni).

	CCE à 5-HT	IBMX+5-HT (100 nM)
FC _{max} (bpm)	88,28 \pm 2,09	106,30 \pm 4,46*
R _{max} (bpm)	28,11 \pm 2,35	39,50 \pm 2,94*

4.6 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista ADO

Estudamos também o efeito do agonista ADO na atividade espontânea do vaso dorsal do *T. molitor*. Em contraste ao que acontece no coração de mamíferos (Belardinelli et al., 1988, Mubagwa et al., 1996), no presente trabalho, encontramos resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal à ADO (**Figura 4.16-A**). A inserção de duas concentrações de CGS, um antagonista não seletivo de ADOR (Ghai et al., 1987, Williams et al., 1987, Ongini et al., 1999), na STM não exerceu nenhum efeito sobre **Rmax** ($P = 0,8152$) e **pD2** ($P = 0,9693$) obtidas pela CCE a este agonista. A resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO na ausência e na presença do antagonista CGS está ilustrada na **Figura 4.16-B e C**. Os parâmetros da CCE à ADO, também na presença do antagonista, são encontrados na **Tabela 4.8**. Em nenhuma concentração de CGS, a FC basal foi alterada ($71,00 \pm 2,08$ bpm (CTR) *vs.* $82,00 \pm 6,24$ bpm (Tratado com $0,3 \mu\text{M}$ de CGS); $P = 0,3174$; $N = 3$; teste t de *Student* pareado) e ($74,25 \pm 2,42$ bpm (CTR) *vs.* $77,50 \pm 3,92$ bpm (Tratado com $1 \mu\text{M}$ de CGS); $P = 0,2890$; $N = 4$; teste t de *Student* pareado).

Tabela 4.8 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO e a ADO na presença de 2 concentrações de CGS (300 nM e $1 \mu\text{M}$). CGS é um antagonista não seletivo para todos os subtipos de ADOR. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. **N** é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+CGS; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.

	Rmax (bpm)	pD2	N
ADO	$21,38 \pm 2,88$	$4,972 \pm 0,124$	8
ADO + CGS ($0,3 \mu\text{M}$)	$25,67 \pm 4,63$	$5,019 \pm 0,031$	3
ADO + CGS ($1,0 \mu\text{M}$)	$23,75 \pm 7,57$	$5,003 \pm 0,141$	4

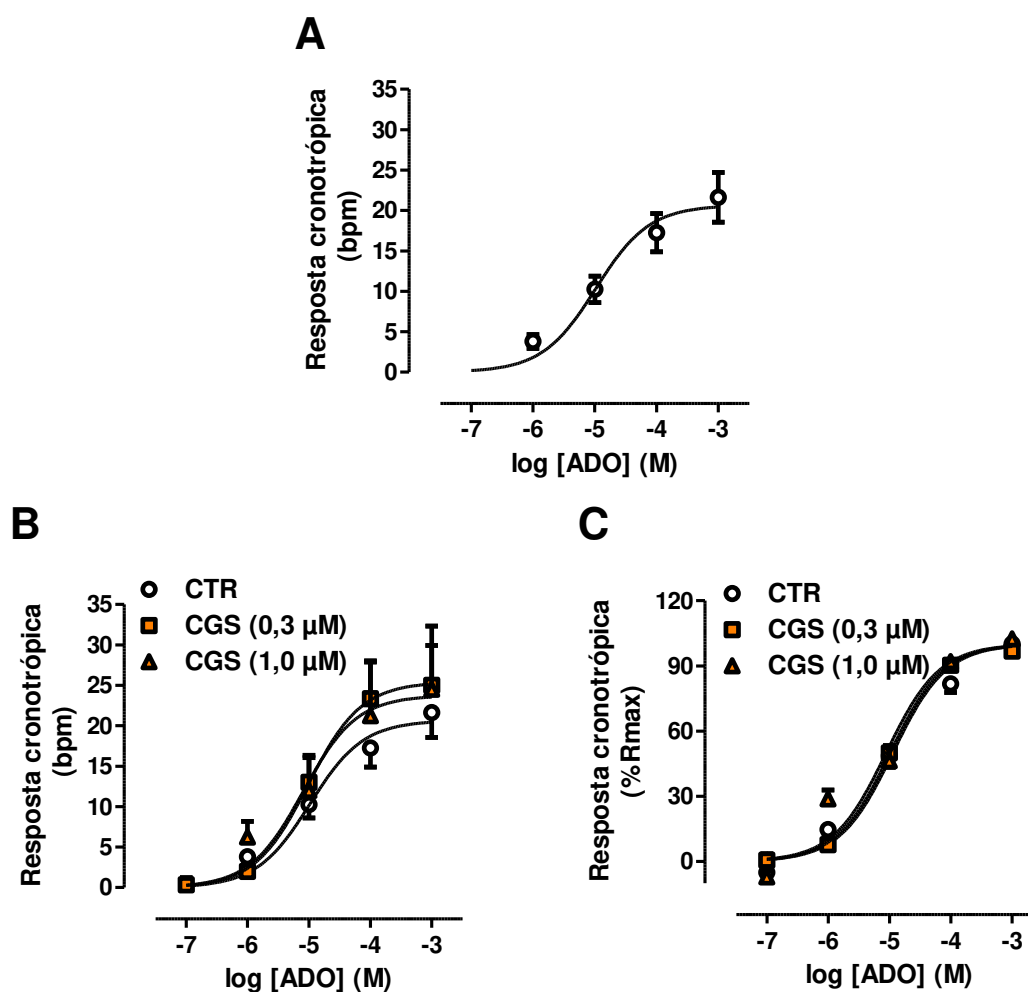


Figura 4.16 - A: Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO. Resposta cronotrópica, expressa em bpm para cada concentração de ADO. **B:** Resposta cronotrópica do vaso dorsal ao agonista ADO sem e com a presença em STM de duas concentrações do antagonista não seletivo para todos os subtipos de ADOR. Não há desvio para direita da curva CTR durante tratamento da preparação em duas concentrações do antagonista CGS (0,3 e 1 μM). **C:** Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax. Os pontos indicam média ± erro padrão e os parâmetros **pD2** e **Rmax** podem ser encontrados na **Tabela 4.8**.

O passo seguinte foi repetir a CCE à ADO na presença de antagonistas seletivos para cada subtipo de ADOR. Primeiramente, foi demonstrado que ADOR-1 não está associado à resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal à ADO quando a CCE à ADO foi repetida na presença de 1 μM de DPCPX (Lohse et al., 1987, Hofman et al., 1997, Lou et al., 2014). Não houve mudanças nos parâmetros **pD2** ($P = 0,9244$) e **Rmax** ($P = 0,8880$) da CCE à ADO. Os parâmetros da CCE à ADO na presença de DPCPX são encontrados na **Tabela 4.9** e a resposta cronotrópica da ADO na presença do antagonista na **Figura 4.17**. Ocorreu um ligeiro aumento na FC basal durante exposição a 1 μM de DPCPX ($77,00 \pm 6,97$ bpm (CTR)

vs. $88,60 \pm 8,50$ bpm (Tratado com $1 \mu\text{M}$ de DPCPX); $P < 0,05$; $N = 5$; teste t de *Student* pareado).

Tabela 4.9 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO sem e com a presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-1 (DPCPX, $1 \mu\text{M}$). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. N é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+DPCPX; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.

	Rmax (bpm)	pD2	N
ADO	$21,38 \pm 2,88$	$4,972 \pm 0,124$	8
ADO+DPCPX ($1 \mu\text{M}$)	$20,80 \pm 1,90$	$4,989 \pm 0,090$	5

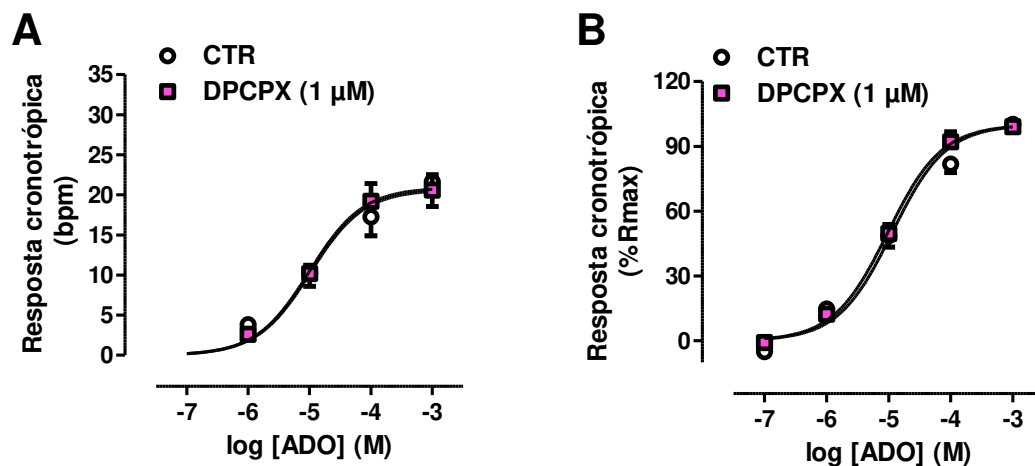


Figura 4.17 - A: Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO sem e com presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-1 (DPCPX, $1 \mu\text{M}$). Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de ADO. **B:** Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax. O antagonista não desviou a CCE à ADO para direita. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros **pD2** e **Rmax** podem ser encontrados na **Tabela 4.9**.

Foi determinada a CCE à ADO na presença de um antagonista seletivo para ADOR-2a, o Zm241385 (Poucher et al., 1995, Keddie et al., 1996, Kucerova et al., 2012, Hein et al., 2013). O parâmetro **pD2** da CCE à ADO diminuiu progressivamente com aumento da concentração de Zm241385 ($P < 0,001$) e a **Rmax** ao agonista não foi alterada ($P = 0,2213$). Isso caracterizou um antagonismo competitivo de Zm241385 (Zm) sobre os ADOR-2a. Os parâmetros da CCE à ADO são apresentados na **Tabela 4.10** e a resposta cronotrópica na **Figura 4.18**. Em nenhuma concentração de Zm, a FC basal foi alterada

($62,56 \pm 3,47$ bpm (CTR) vs. $63,78 \pm 3,90$ bpm (Tratado com $0,1 \mu\text{M}$ de Zm); $P = 0,5299$; $N = 9$; teste t de *Student* pareado) e ($54,20 \pm 6,67$ bpm (CTR) vs. $61,80 \pm 5,07$ bpm (Tratado com $1 \mu\text{M}$ de Zm); $P = 0,1145$; $N = 5$; teste t de *Student* pareado).

Tabela 4.10 - Resposta cronotrópica do vaso dorsal à ADO sem e com presença em STM do antagonista seletivo para ADOR-2a (Zm, $0,1$ e $1 \mu\text{M}$). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. **N** é o número de preparações utilizadas. **Rmax**: resposta cronotrópica máxima (expressa em batimentos por minuto, bpm) à ADO+Zm; **pD2**: logaritmo negativo da concentração molar que produz 50 % da resposta cronotrópica máxima ao agonista ADO. Comparação das médias: *: $P < 0,05$ vs. CCE à ADO (Teste de *Newman-Keuls*). Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste da função sigmoidal.

	Rmax (bpm)	pD2	N
ADO	$21,38 \pm 2,88$	$4,972 \pm 0,124$	8
ADO+Zm ($0,1 \mu\text{M}$)	$22,00 \pm 1,26$	$4,565 \pm 0,066^*$	9
ADO+Zm ($1,0 \mu\text{M}$)	$16,60 \pm 1,63$	$4,264 \pm 0,109^*$	5

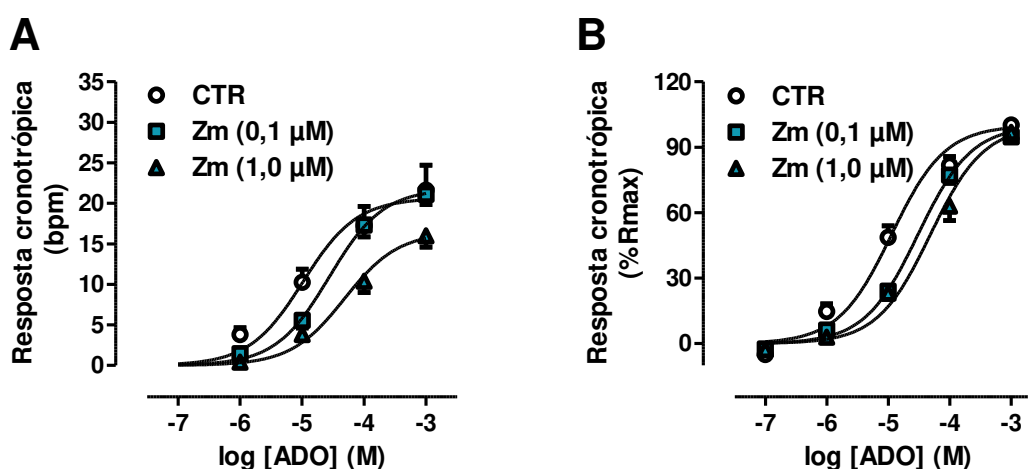


Figura 4.18 – Alteração da resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista ADO pelo antagonista seletivo para ADOR-2a (Zm, 100 nM e $1 \mu\text{M}$). **A**: Resposta cronotrópica, expressa em bpm, do vaso dorsal para cada concentração de ADO. **B**: Resposta cronotrópica expressa como % da Rmax. O antagonista desviou a CCE à ADO para a direita nas duas concentrações, mas sem alterar Rmax. Os pontos indicam média \pm erro padrão e os parâmetros **pD2** e **Rmax** podem ser encontrados na **Tabela 4.10**.

4.7 – Efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal exercido pelo agonista Oct

A baixa concentração de Oct, de 10 femtomolar (10^{-14} M ou 10 fM), não afetou a atividade cronotrópica ($75,25 \pm 5,93$ (CTR) vs. $84,00 \pm 5,24$ (Oct); $P > 0,05$; $N = 4$; teste t de *Student* pareado) do vaso dorsal (**Figura 4.19**).

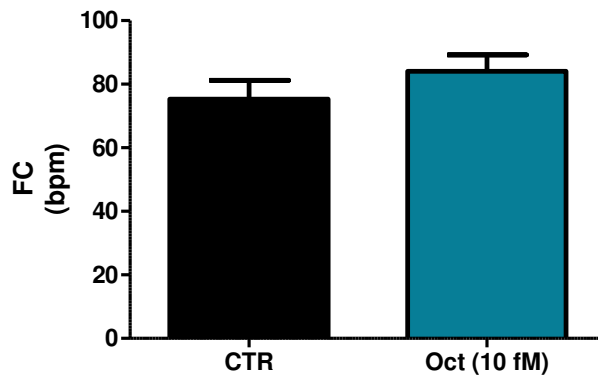


Figura 4.19 – Após estabilização da FC espontânea do vaso dorsal em STM (CTR), a baixa concentração de Oct (10 fM) diluída em STM não afetou a atividade cronotrópica da preparação. Dados são apresentados como média \pm erro padrão.

A **Figura 4.20** ilustra o efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal causado pelas concentrações micromolares de Oct.

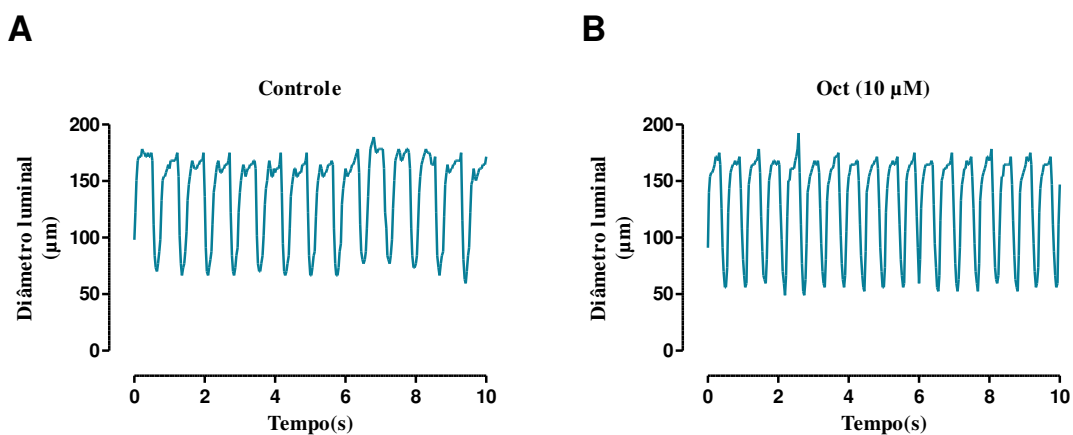


Figura 4.20 – Registros (de 10 s) do diâmetro luminal do vaso dorsal do *T. molitor* sem (**Controle**) e com a presença de 10 μ M de Oct (**Oct (10 μ M)**) em STM. A Oct exerceu um efeito cronotrópico positivo nesta preparação (105 vs. 80 bpm) além de exercer um ligeiro aumento na FS (66 vs. 60 %).

A Oct, um dos agentes cronotrópicos positivos mais típicos no coração de insetos (Zornik et al., 1999, Lin et al., 2011, Papaefthimiou & Theophilidis, 2011), exerceu efeito cronotrópico positivo ($P < 0,0001$; $N = 5$) no vaso dorsal do coleóptero. A **Figura 4.21-A** ilustra a FC espontânea do vaso dorsal para 3 diferentes concentrações de Oct após estabilização da perfusão com STM (CTR). A resposta cronotrópica máxima ao agonista alcançada pela preparação foi de $31,33 \pm 6,53$ (**Figura 4.21-B**).

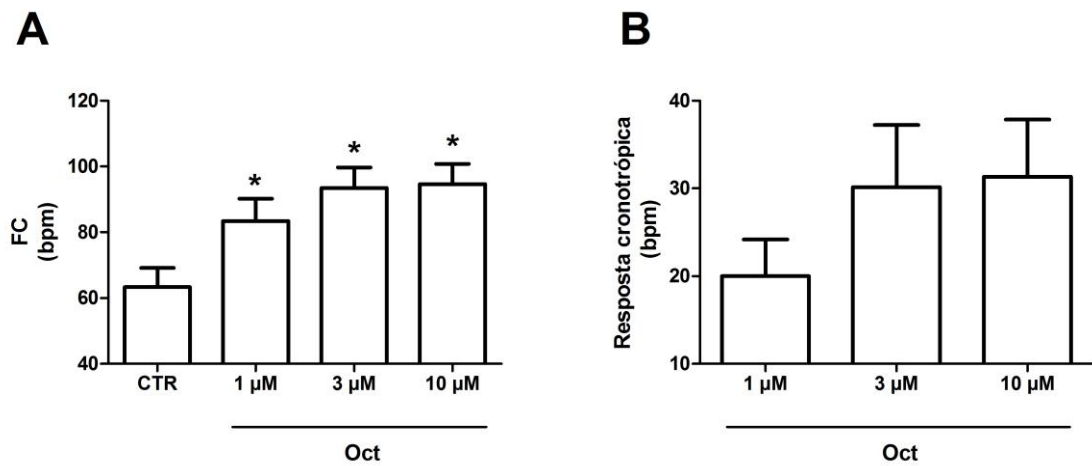


Figura 4.21 – Resposta cronotrópica positiva do vaso dorsal ao agonista Oct. **A:** Após estabilização na STM (CTR), o vaso dorsal foi exposto a três concentrações de Oct (1, 3 e 10 μ M). **B:** Resposta cronotrópica do vaso dorsal à Oct nas diferentes concentrações. Valores foram calculados pela subtração da FC em cada concentração de Oct da FC antes da adição do agonista. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. *: $P < 0,05$ vs. CTR (Teste de Bonferroni).

Capítulo 5 : Discussão

Para estudar múltiplos aspectos da atividade contrátil do vaso dorsal do *T. molitor* foi aprimorada a metodologia desenvolvida anteriormente (Fim Neto, 2012). Foi utilizada a preparação multicelular *in situ* do vaso dorsal para monitoração do diâmetro luminal e FC da região do coração do vaso dorsal. Um programa de computador em *Labview* versão 11.0 foi desenvolvido para esta finalidade. O método de medição do diâmetro luminal segue aquele já desenvolvido em trabalho anterior (Fim Neto, 2012), mas neste novo programa de computador é possível adquirir, processar e visualizar a imagem do vídeo da atividade contrátil do vaso dorsal simultaneamente ao sinal do diâmetro luminal. Além de economizar tempo, o pós-processamento dos vídeos para geração dos sinais é abolido, assim o sinal já é extraído do vídeo durante o experimento e logo armazenado. Em casos em que o sinal do diâmetro luminal não foi extraído do sinal de vídeo, foi possível descartar o sinal de vídeo e colocar uma outra preparação no sistema de microscopia para uma nova aquisição. Deste modo, não há o risco de que arquivos de vídeos, que não sejam úteis para extrair os parâmetros da atividade contrátil do coração, sejam armazenados. Outra vantagem do programa de computador é que o usuário pode registrar os parâmetros da atividade contrátil a partir do próprio sinal. Não está disponível na literatura este tipo de medição do diâmetro luminal e parâmetros da atividade contrátil (FS, FC e cursos temporais) do coração durante o experimento. Existem sistemas de medição e aquisição de registros do potencial extracelular do vaso dorsal (Feliciano et al., 2011, Papaefthimiou & Theophilidis, 2011), mas a partir desses registros o único parâmetro da atividade contrátil possível de ser extraído é a FC. Outros sistemas semelhantes ao que foi desenvolvido no presente trabalho, que incluem geração e aquisição de vídeos (O'Neal & Anderson, 2016), são úteis para extrair a FC e o diâmetro luminal somente durante pós-processamento dos vídeos (Fink et al., 2009, Feliciano et al., 2011).

Outra tecnologia disponível são os Tomógrafos de Coerência Óptica em que todos os parâmetros da atividade contrátil são extraídos de arquivos de vídeos, em tempo real, ou até mesmo durante pós-processamento dos vídeos (Ma et al., 2010, Choma et al., 2011, Lin et al., 2011, Abraham & Wolf, 2013, Ocorr et al., 2014), mas além de maior complexidade e alto custo do sistema de aquisição, o tomógrafo só é útil para medições *in vivo* dos parâmetros da atividade contrátil do coração o que tem a desvantagem quando se deseja manipular farmacologicamente a preparação.

Os valores encontrados no presente trabalho do diâmetro luminal (80 a 200 μm) foram semelhantes aos encontrados por Markou & Theophilidis (2000) (80 a 130 μm) e ligeiramente superiores aos estimados por Feliciano et al. (2011) (média de $64,4 \pm 5,8 \mu\text{m}$). Ainda não é possível concluir quais são os valores exatos do diâmetro luminal do vaso dorsal do coleóptero. Uma análise morfológica por métodos de imagens mais precisos seria necessária para esta finalidade.

Devido a uma maior simplicidade de uso, o sistema de medição do diâmetro luminal e dos parâmetros da atividade contrátil desenvolvido e apresentado no presente trabalho pode auxiliar a elucidar múltiplos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle e manutenção da atividade cronotrópica e inotrópica em diferentes preparações *in situ* com o coração de insetos.

Com a ferramenta computacional, foram estudados alguns aspectos da atividade cronotrópica e inotrópica do vaso dorsal do *T. molitor*. Em trabalho anterior, foi demonstrado que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ exerce efeito inotrópico (Fim Neto, 2012) e cronotrópico positivos no *T. molitor* (Feliciano et al., 2011). O tratamento do vaso dorsal com cafeína, que diminui a carga de Ca^{2+} do RS (Rasmussen et al., 1987, Ferraz et al., 2001), tem efeitos inotrópico e cronotrópico negativos na preparação (Feliciano et al., 2011, Fim Neto, 2012), o que sugeriu participação da organela no controle de ambas atividades. A participação do RS no controle da atividade espontânea já foi demonstrada na *D. melanogaster* (Sanyal et al., 2006, Abraham & Wolf, 2013). Entretanto, devido ao efeito cronotrópico e inotrópico positivo à $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Feliciano et al., 2011, Fim Neto, 2012), pode ocorrer uma possível associação entre os canais de influxo de Ca^{2+} (canais de Ca^{2+} tipo-L e NCX) e a liberação de Ca^{2+} pelo RS no controle de ambas atividades. Evidências eletrofisiológicas *T. molitor* (Markou & Theophilidis, 2000) sugeriram a possível participação de um canal de influxo do íon Ca^{2+} na despolarização da membrana do inseto. Durante medição do potencial extracelular com a presença, em solução fisiológica, de EGTA, quelante do Ca^{2+} livre do meio extracelular, os pesquisadores concluíram que houve prolongamento da duração do PA. Em outra preparação, pesquisadores desenvolveram um método de medição de transientes de Ca^{2+} a partir de indicadores geneticamente expressos na preparação *in situ* da *D. melanogaster* (Lin et al., 2011), e observaram diminuição da amplitude e da frequência dos transientes durante atividade espontânea com o tratamento da preparação com o *Diltiazem*, um bloqueador seletivo de canais de Ca^{2+} tipo-L. Testes preliminares do presente trabalho em um conjunto de preparações mostraram que a atividade inotrópica do coração não foi afetada pela concentração de 10 μM deste fármaco, e que somente o tratamento com 1 μM de D600

atenuou a amplitude de contrações e a FS do coração durante aumento da $[Ca^{2+}]_o$ (dados não mostrados), mesmo em uma concentração abaixo do EC50 (Affolter & Coronado, 1986, McDonald et al., 1989), sugerindo a participação de canais de Ca^{2+} tipo L no transporte do íon para a geração da atividade inotrópica.

O efeito da inibição simultânea dos canais de Ca^{2+} do sarcolema e da atividade do RS não pôde ser estudado em $[Ca^{2+}]_o$ mais altas (quando a atividade cronotrópica está elevada), pois, tanto *thapsigargin* quanto a cafeína prolongaram o curso temporal das contrações (Feliciano et al., 2011, Fim Neto, 2012), o que nas frequências maiores causa sobreposição das contrações (Markou & Theophilidis, 2000, Feliciano et al., 2011). Foi necessário diminuir a $[Ca^{2+}]_o$ da STM para 0,5 mM e assim estimular o coração em uma frequência baixa (0,8 Hz). *Thapsigargin* diminuiu a FS e a FC espontânea do vaso. Vale ressaltar que os insetos apresentam um mecanismo de recaptação de Ca^{2+} para o RS semelhante aos de vertebrados. A ATPase de Ca^{2+} do RS de insetos sensível à *thapsigargin* (CaP60A) representa seu ortólogo (i.e. genes iguais que divergiram após um evento de especiação (Fitch, 2000)) para SERCA2a em mamíferos, apresentando zonas conservadas de recaptação de Ca^{2+} (Sanyal et al., 2006). Recentemente foi revelada uma família de peptídios denominados sarcolamban que mimetizam, em insetos, as funções modulatórias de PLB e sarcolipina na ATPase de Ca^{2+} do RS nos vertebrados (Magny et al., 2013). Além disso, a CaP60A também possui sítios de ligação para o *thapsigargin* (Sanyal et al., 2006).

Neste mesmo conjunto de preparações tratadas com *thapsigargin*, o bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo-L resultou em uma maior redução de FS e da FC espontânea. Em outros artrópodes o RS está presente no músculo cardíaco (Wolf et al., 2006, Lehmacher et al., 2012) e no músculo esquelético, possui uma associação com os canais de Ca^{2+} tipo-L (Takekura & Franzini-Armstrong, 2002). Embora não esteja descrita uma análise morfológica detalhada no coleóptero, os resultados apresentados no presente trabalho, de que o influxo de Ca^{2+} ative a liberação de Ca^{2+} do RS, sugerem um possível sinergismo entre os canais de Ca^{2+} tipo-L e o a liberação de Ca^{2+} do RS na regulação das atividades crono e inotrópica. O efeito do bloqueio simultâneo dos canais de Ca^{2+} tipo-L e da recaptação de Ca^{2+} pelo RS não aboliu a atividade contrátil do vaso dorsal. A participação de outras fontes de influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema não foram descartadas, contudo, não obtivemos sucesso em diminuir FS ou FC no coração com o bloqueador não seletivo do NCX, KB-R7943, após o tratamento simultâneo do coração com D600 e *thapsigargin*. A ausência de bloqueadores seletivos do influxo de Ca^{2+} via NCX torna difícil trabalhar mais detalhadamente para elucidar a participação do NCX na atividade contrátil do vaso.

Além destes aspectos da atividade cronotrópica e inotrópica estudados, este conjunto de resultados também mostra a viabilidade de uso do programa de computador desenvolvido no presente trabalho, uma vez que foi possível estimar o diâmetro luminal, que se mostrou semelhante aos valores presentes na literatura (Markou & Theophilidis, 2000, Feliciano et al., 2011), medir a FC do coração durante estimulação e atividade espontânea, além de observar variações de FC, FS e de cursos temporais com diferentes tratamentos farmacológicos.

O aumento da concentração de 5-HT implicou no aumento da FC espontânea do vaso dorsal, como já observado por Feliciano et al. (2011). Os valores de pD2 e de Rmax obtidos das CCEs à 5-HT não foram diferentes daqueles obtidos por Feliciano et al. (2011).

Majeed et al. (2013, 2014) sugeriram que no vaso dorsal da *D. melanogaster*, os receptores serotoninérgicos acoplados à proteína $G_{\alpha s}$ não contribuem para o efeito cronotrópico positivo causado pela 5-HT. Embora os dados funcionais ainda não tenham sido revelados, este grupo de pesquisa propõe que a clivagem da PLC em DAG e em IP3 é o principal mecanismo ativado pelo agonista. O vaso dorsal do *T. molitor* foi tratado com inibidores da via PLC-IP3-RS. Existem poucas alternativas farmacológicas para modificar as concentrações citosólicas de PLC e de IP3. Pode-se inibir a clivagem de PLC em IP3 pelo fármaco U73122, mas optamos no presente trabalho não utilizar esse inibidor devido aos seus efeitos serem inconclusivos. Há relatos que ao invés de inibir a clivagem de PLC em IP3, este fármaco tenha efeitos inibitórios diretos na SERCA2a, e como consequência, pode ocorrer diminuição da carga e da liberação de Ca^{2+} pelo RS (Macmillan & McCarron, 2010).

O 2-APB, embora seja um bloqueador não seletivo de IP3R com efeitos sobre canais SOC e em canais não seletivos a cátions (Bootman et al., 2002, Peppiatt et al., 2003, Vriens et al., 2009), não possui efeitos diretos no RS além da inibição do IP3R. Houve uma precaução em escolher corretamente as concentrações de 2-APB para se repetir as CCEs à 5-HT na presença deste inibidor. Por exemplo, na concentração de 80 μM , acima do EC50 do 2-APB, as contrações do vaso dorsal cessaram. Acima de 50 μM , o 2-APB inibe a isoforma de conexina mais abundante (isoforma 43 de conexina) no sistema de condução elétrica do coração de vertebrados, tendo, como um dos efeitos, o de desacoplar a excitação elétrica com a contração (Bai et al., 2006, Tao & Harris, 2007, Ma et al., 2011). Não foi possível obter CCEs à 5-HT com pD2 e Rmax satisfatórios na presença nem de 50 e nem de 80 μM (dados não apresentados), pois nestas concentrações as contrações do vaso dorsal cessaram durante a CCE à 5-HT. Foi necessário então, diminuir a concentração do inibidor de modo que não ocorresse esse efeito colateral no vaso dorsal. Na concentração de 10 μM de 2-APB, este

efeito colateral foi bastante reduzido, mas ainda assim, em alguns experimentos não foi possível completar às CCEs à 5-HT, pois as contrações novamente cessaram. A concentração de 2 μ M de 2-APB tem sido estabelecida como a mais conclusiva da inibição de IP3R pelo fármaco (Kapur & Banach, 2007, Domeier et al., 2008, Kapoor et al., 2014, Kapoor et al., 2015). As contrações do coração do inseto foram regulares tanto durante atividade espontânea quanto durante tratamento com 5-HT. A R_{max} das CCEs à 5-HT repetidas na presença de 2-APB foi diminuída em relação à R_{max} do grupo não tratado com o inibidor, o que torna plausível concluir que a reposta cronotrópica ao agonista é mediada pelos níveis citosólicos de IP3. Uma vez que este segundo mensageiro seja ativado durante a ação da 5-HT, o subtipo 5-HT2R deve ser ativado pela 5-HT, pois é o único subtipo serotoninérgico associado à proteína $G_{\alpha q}$.

Dentre vários antagonistas do subtipo 5-HT2R, foi escolhida a KET pelo conhecimento de que este antagonista reduziu a resposta cronotrópica positiva à 5-HT na *D. melanogaster* (Majeed et al., 2014). Quando repetidas as CCEs à 5-HT na presença do antagonista, a sensibilidade das preparações diminuiu progressivamente à medida em que foi aumentada a concentração (distante do pA_2 do antagonista (Marwood, 1994)) de KET, mas não foi observada alteração em R_{max} das CCEs, o que caracteriza um antagonismo competitivo do receptor pelo agonista 5-HT. O valor do pA_2 da KET encontrado no presente estudo divergiu ao apresentado por Marwood (1994). Com isso, pode-se apresentar algumas sugestões para esta divergência. Uma seria que o subtipo de receptor serotoninérgico ativado pela 5-HT não é o 5-HT2R, o que seria difícil, pois a estimulação do cronotropismo pela 5-HT está associado à formação de IP3 que é tipicamente dependente da estimulação de um receptor acoplado à proteína $G_{\alpha q}$. Uma explicação mais provável seria que a resposta cronotrópica positiva à 5-HT seria mediada pelo 5-HT2R, mas que o receptor no inseto seja distinto em estrutura quando comparado com o receptor dos mamíferos. Isto explicaria a menor sensibilidade do vaso dorsal ao antagonista KET.

Outro ponto que merece ser atenção é que o antagonismo competitivo foi realçado pelo gráfico de Schild, no qual o intervalo de confiança do coeficiente angular da reta incluiu o valor unitário (Kenakin, 1982), logo a população de 5-HT2R é possivelmente homogênea (Tallarida et al., 1979, Kenakin, 1982). Entretanto, não se deve descartar heterogeneidade deste subtipo de receptor serotoninérgico na preparação, dada a extensão elevada do intervalo de confiança da reta de Schild. Assim, outro subtipo de receptor serotoninérgico pode estar envolvido na resposta cronotrópica positiva à 5-HT. Como o 5-HT2R é único receptor serotoninérgico envolvido na formação do IP3, outro receptor estaria envolvido na formação

de AMPc. Por isso, estudamos a participação da via AC-AMPc-PKA no aumento do cronotropismo exercido pela 5-HT.

Embora existam poucos relatos na literatura de que no vaso dorsal da *D. melanogaster* a via AC-AMPc-PKA não esteja associada ao controle e manutenção da FC espontânea e nem tampouco seja ativada durante o efeito cronotrópico positivo da 5-HT (Majeed et al., 2013), esses dados são insuficientes para se descartar totalmente qualquer participação dessa via no controle da FC espontânea e durante ação do agonista no coração da espécie *T. molitor*. Diferentemente das CCEs à 5-HT repetidas na presença de um antagonista dos 5-HT_{2R} e do bloqueador não seletivo de IP₃R, uma população de insetos foi submetida a um protocolo experimental que incluiu uma prévia incubação do vaso dorsal com 50 μ M de IBMX seguida de perfusão com STM até estabilização da FC. Em mamíferos, essa concentração do fármaco inibe pelo menos quase em sua plenitude 4 isoformas de PDE (von der Leyen, 1989, Bethke et al., 1992). A incubação e perfusão com IBMX exerceu efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal do coleóptero, devido a uma maior produção de AMPc no citosol. Outro resultado que merece ser realçado, é que a aplicação de 100 nM de 5-HT, que produz quase 90 % da resposta cronotrópica máxima nesta preparação, amplificou o efeito cronotrópico positivo do IBMX. Além disso, a R_{max} alcançada pelo conjunto de preparações foi maior do que a R_{max} das CCEs à 5-HT. Isto sugeriu que mais de uma via possa ter sido ativada, ou seja, ambas as vias da AC-AMPc-PKA e da PLC-IP₃-RS.

Alguns mecanismos ativados durante aumento da atividade cronotrópica no coração do *T. molitor* causado pela 5-HT já foram estudados. No entanto, ainda há poucos trabalhos que mostram redução da FC espontânea por algum tipo de neurotransmissor, o que poderia mimetizar uma possível estimulação parassimpática em insetos. A baixa concentração de Oct (Papaefthimiou & Theophilidis, 2011) não exerceu efeito cronotrópico no vaso dorsal do *T. molitor*, e somente as concentrações micromolares do agonista exerceram efeito cronotrópico positivo como demonstrado no presente trabalho.

Foram também determinadas CCEs à ADO. Nos mamíferos, ADO tem efeitos cronotrópicos negativos no coração (Belardinelli et al., 1988, Hofman et al., 1997) via ativação do ADOR-1 (tipicamente acoplados à proteína G_{ai}). Surpreendentemente, ADO também exerceu um efeito cronotrópico positivo no vaso dorsal do *T. molitor*. Esse resultado sugeriu que o efeito de IBMX foi possivelmente independente da ativação de ADOR, pois se IBMX inibisse os ADOR ocorreria resposta cronotrópica negativa na preparação. Além disso, o receptor envolvido não seria mais acoplado à proteína G_{ai} e sim, à proteína G_{as} como o ADOR-2a. Duas concentrações distantes do valor de pA_2 descrito na literatura (Ghai et al.,

1987, Williams et al., 1987) para o antagonista não seletivo de ADOR (CGS) não modificaram os valores de R_{max} e nem de pD_2 das CCEs à ADO. O mesmo ocorreu quando as CCEs à ADO foram repetidas em uma concentração de DPCPX tipicamente utilizada (Lohse et al., 1987, Hofman et al., 1997, Lou et al., 2014). Possivelmente, o ADOR-1 não foi ativado durante a resposta cronotrópica positiva da ADO. Os valores de pD_2 diminuíram progressivamente com aumento da concentração do antagonista seletivo de ADOR-2a (Zm), mas sem alterar R_{max} , caracterizando um antagonismo competitivo desses receptores. As concentrações deste antagonista, utilizadas no presente trabalho, se encontram em uma faixa confiável de seletividade para esse subtipo de receptor, pois este antagonista tem efeito sobre os subtipos acoplados às proteínas G_{ai} somente em valores acima de concentrações micromolares (Poucher et al., 1995, Hein et al., 2013). Com isso, é plausível concluir que o ADOR-2a seja ativado pela ADO. Além disso, esse resultado realça a importância da via AC-AMPC-PKA no controle da atividade cronotrópica do vaso dorsal do *T. molitor*, uma vez que este subtipo está tipicamente acoplado a formação de AMPc tanto em mamíferos quanto na *D. melanogaster* (Kuceroval et al., 2012). A ausência de qualquer efeito do antagonista não seletivo (CGS) sobre os parâmetros da CCE à ADO merece ser considerado, uma vez que o Zm exerceu efeito sobre a sensibilidade das preparações à ADO. Uma caracterização mais detalhada dos antagonistas de ADOR em 4 tipos de células da *D. melanogaster* demonstraram que CGS não exerce antagonismo sobre ADOR devido à ausência do sítio de ligação do receptor ao antagonista (Kuceroval et al., 2012). Isto nos possibilita acreditar que não há conservação do sítio de ligação do ADOR-2a ao antagonista CGS no vaso dorsal do *T. molitor*.

Embora seja imprescindível uma descrição detalhada a nível molecular e celular dos mecanismos apresentados, o presente trabalho sugere que a concentração citosólica de AMPc seja fundamental na regulação da atividade espontânea e durante efeito cronotrópico positivo exercidos por agonistas no vaso dorsal como já relatado nas células do NSA de mamíferos (Maltsev et al., 2006, Maltsev & Lakatta, 2008). A concentração citosólica do nucleotídeo nas células marca-passo é muito mais alta quando comparada, por exemplo, com células ventriculares (Maltsev et al., 2006). Uma maior atividade citosólica de AMPc pode contribuir para uma maior atividade de PKA (Vinogradova et al., 2006). Também não se pode descartar uma ativação dos IP3R diretamente por AMPc de maneira independente de PKA como já descrito em outros tecidos (Tovey et al., 2010, Tovey & Taylor, 2013). Esse tipo de mecanismo não foi revelado em nenhum outro tipo de célula cardíaca, por isso é provável a participação da PKA nessa via mediada pelo AMPc. Se a PKA for realmente ativada pelo

AMPC, uma provável consequência da ativação da via AC-AMPC-PKA é que os RyR possam ser fosforilados pela PKA. Uma ilustração com resumo dos mecanismos elucidados no presente trabalho está detalhada na **Figura 5.1**.

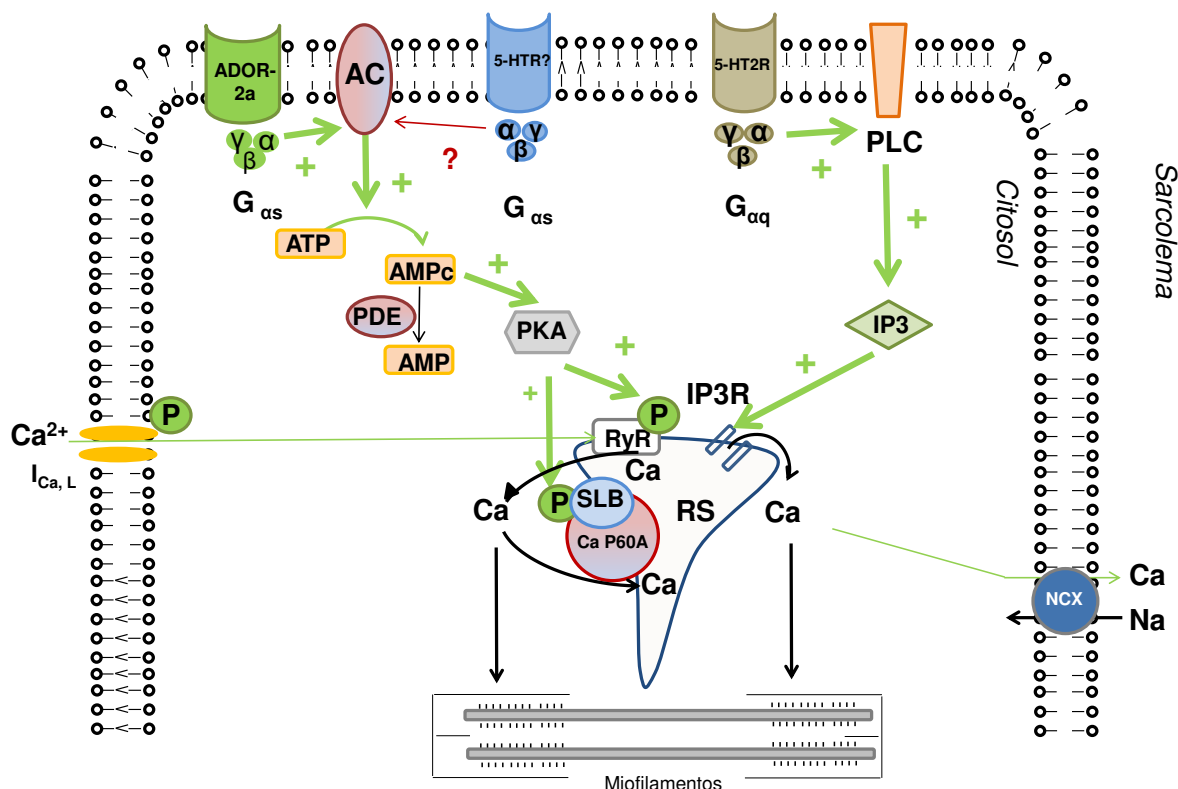


Figura 5.1 - Principais mecanismos ativados durante o efeito cronotrópico positivo da 5-HT no vaso dorsal do *T. molitor* que foram elucidados (Apontado como + na Figura) no presente trabalho. Alguns mecanismos sugestivos (Apontado como ?) no controle da atividade espontânea. A 5-HT regula a atividade cronotrópica do coração pela ativação do 5-HT2R que contribui para o aumento da concentração citosólica de IP3. Também, por ativação de receptores ainda não revelados (5-HT4R e 5-HT7R são dois receptores prováveis), a 5-HT contribui para formação de AMPC. Ver texto para mais detalhes. A estimulação do cronotropismo pela ADO é possivelmente mediada pela formação do AMPC por meio da ativação do ADOR-2a.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que ambas as vias do AMPC-PKA e da PLC-IP3 são ativadas durante o efeito cronotrópico positivo exercido pela 5-HT. Quando a 5-HT se liga aos 5-HT2R, ocorre mobilização do IP3 que se liga ao IP3R do RS, promovendo a liberação de Ca^{2+} da organela. No entanto, não foi possível revelar qual subtipo de receptor serotoninérgico está associado à mobilização de AMPC, pois existem vários subtipos de receptores acoplados à proteína G_{as} . Um extenso trabalho de caracterização molecular e também de nível farmacológico é necessário para elucidar qual subtipo de receptor está envolvido na mobilização da via do AMPC-PKA-RS.

Como o efeito cronotrópico positivo da 5-HT é abolido quando o RS é inibido funcionalmente, ambas as vias da AC-AMPC-PKA e do PLC-IP3-RS devem mobilizar o Ca^{2+} proveniente exclusivamente da organela. O aumento da frequência espontânea ao agonista seria atribuído ao íon Ca^{2+} liberado pelo RS e sua consequente extrusão *via* NCX com ativação de corrente despolarizante (I_{NCX}) durante a diástole. Não foi possível, neste trabalho, confirmar a participação direta do NCX. Existem limitações para se estudar uma contribuição do NCX durante o efeito cronotrópico positivo da 5-HT. Uma delas, como já mencionado, é que não existem inibidores seletivos do transporte do íon Ca^{2+} pelo NCX. Outra maneira de estudar NCX seria medir a I_{NCX} por métodos eletrofisiológicos, mas isto ainda não é possível, dado que não existem métodos eficientes para se obter células cardíacas isoladas do vaso dorsal que seriam essenciais para medição de correntes iônicas.

Os resultados apresentados, quais sejam, a mobilização de segundos mensageiros e a ativação de receptores serotoninérgicos, podem motivar novos trabalhos farmacológicos e moleculares e em nível celular para elucidar outros aspectos das vias de sinalização associadas ao efeito cronotrópico no vaso dorsal do inseto.

Capítulo 6 : Conclusões e Perspectivas

A ferramenta computacional permitiu extrair, durante o experimento, os parâmetros do vaso dorsal como diâmetro luminal e FC. Com esta ferramenta, foi possível elucidar que a liberação de Ca^{2+} pelo RS e o influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} tipo-L, mas não pelo NCX, são fontes primárias na geração das atividades crono e inotrópica do vaso dorsal do coleóptero.

O efeito cronotrópico exercido pela 5-HT no vaso dorsal parece ser mediado por 5-HTR acoplado à produção de IP3 (5-HT2R) como já observado em outras espécies. O segundo mensageiro AMPc também está envolvido na estimulação do cronotropismo pela adenosina (via ADO-A2aR) e possivelmente pela 5-HT (receptor não identificado).

Em trabalhos futuros, será necessária a caracterização molecular dos receptores e segundos mensageiros por técnicas, por exemplo, como imuno-histoquímica, PCR e *Western blot*. Além disso, um extenso trabalho de farmacologia deve ser feito para elucidar qual subtipo de receptor serotoninérgico, acoplado à via de formação do AMPc, está associado à estimulação do cronotropismo.

Capítulo 7 : Referências Bibliográficas

- Abraham, D.M. and Wolf, M.J. (2013) Disruption of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase function in *Drosophila* leads to cardiac dysfunction. *PLoS One*, **8**, e77785.
- Affolter, H. and Coronado, R. (1986) Sidedness of reconstituted calcium channels from muscle transverse tubules as determined by D600 and D890 blockade. *Biophys J*, **49**, 767-71.
- Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M.E. and Isbrandt, D. (2009) Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 12189-94.
- Arunlakshana, O. and Schild, H.O. (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother*, **14**, 48-58.
- Bai, D., Del Corso, C., Srinivas, M. and Spray, D.C. (2006) Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *J Pharmacol Exp Ther*, **319**, 1452-8.
- Bassani, J.W., Bassani, R.A. and Bers, D.M. (1993) Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*, **265**, C533-40.
- Bassani, J.W., Bassani, R.A. and Bers, D.M. (1994) Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*, **476**, 279-93.
- Bassani, R.A., Bassani, J.W. and Bers, D.M. (1992) Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*, **453**, 591-608.
- Becnel, J., Johnson, O., Luo, J., Nässel, D.R. and Nichols, C.D. (2011) The serotonin 5-HT₇ receptor is expressed in the brain of *Drosophila*, and is essential for normal courtship and mating. *PLoS One*, **6**, e20800.
- Belardinelli, L., Giles, W.R. and West, A. (1988) Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart. *J Physiol*, **405**, 615-33.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- Bethke, T., Meyer, W., Schmitz, W., Scholz, H., Stein, B., Thomas, K. and Wenzlaff, H. (1992) Phosphodiesterase inhibition in ventricular cardiomyocytes from guinea-pig hearts. *Br J Pharmacol*, **107**, 127-33.
- Birinyi, P., Acsai, K., Bányász, T., Tóth, A., Horváth, B., Virág, L., Szentandrassy, N., Magyar, J., Varró, A., Fülöp, F. and Nánási, P.P. (2005) Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na⁺/Ca²⁺ exchange current and L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **372**, 63-70.
- Bodmer, R. and Venkatesh, T.V. (1998) Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet*, **22**, 181-6.
- Bogdanov, K.Y., Vinogradova, T.M. and Lakatta, E.G. (2001) Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res*, **88**, 1254-8.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J. and Peppiatt, C.M. (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J*, **16**, 1145-50.
- Chang Chien, C.C., Hsin, L.W. and Su, M.J. (2015) Activation of serotonin 5-HT₇ receptor induces coronary flow increase in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol*, **748**, 68-75.

- Choma, M.A., Suter, M.J., Vakoc, B.J., Bouma, B.E. and Tearney, G.J. (2011) Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Dis Model Mech*, **4**, 411-20.
- Daly, J.W., Jacobson, K.A. and Ukena, D. (1987) Adenosine receptors: development of selective agonists and antagonists. *Prog Clin Biol Res*, **230**, 41-63.
- Difrancesco, D. (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*, **106**, 434-46.
- Domeier, T.L., Zima, A.V., Maxwell, J.T., Huke, S., Mignery, G.A. and Blatter, L.A. (2008) IP₃ receptor-dependent Ca²⁺ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**, H596-604.
- Fabiato, A. (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, **245**, C1-14.
- Feliciano, D.F., Bassani, R.A., Oliveira, P.X. and Bassani, J.W. (2011) Pacemaker activity in the insect (*T. molitor*) heart: role of the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **301**, R1838-45.
- Ferraz, S.A., Bassani, J.W. and Bassani, R.A. (2001) Rest-dependence of twitch amplitude and sarcoplasmic reticulum calcium content in the developing rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 711-22.
- Fim Neto, A. (2012) Estudo da atividade contrátil do coração do inseto *T.molitor*: instrumentação e experimentação. *DEB*. p. 46. UNICAMP, FEEC.
- Fink, M., Callol-Massot, C., Chu, A., Ruiz-Lozano, P., Izpisua Belmonte, J.C., Giles, W., Bodmer, R. and Ocorr, K. (2009) A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *Biotechniques*, **46**, 101-13.
- Fitch, W.M. (2000) Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet*, **16**, 227-31.
- Freitag, A., Wessler, I. and Racké, K. (1998) Phosphodiesterase inhibitors suppress alpha₂-adrenoceptor-mediated 5-hydroxytryptamine release from tracheae of newborn rabbits. *Eur J Pharmacol*, **354**, 67-71.
- Gasque, G., Conway, S., Huang, J., Rao, Y. and Voss hall, L.B. (2013) Small molecule drug screening in *Drosophila* identifies the 5HT_{2A} receptor as a feeding modulation target. *Sci Rep*, **3**, srep02120.
- Gergs, U., Böckler, A., Ebelt, H., Hauptmann, S., Keller, N., Otto, V., Pönicke, K., Schmitz, W. and Neumann, J. (2013) Human 5-HT₄ receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **386**, 357-67.
- Ghai, G., Francis, J.E., Williams, M., Dotson, R.A., Hopkins, M.F., Cote, D.T., Goodman, F.R. and Zimmerman, M.B. (1987) Pharmacological characterization of CGS 15943A: a novel nonxanthine adenosine antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **242**, 784-90.
- Glenn, J.D., King, J.G. and Hillyer, J.F. (2010) Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol*, **213**, 541-50.
- Hannon, J. and Hoyer, D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*, **195**, 198-213.
- Hein, T.W., Xu, W., Ren, Y. and Kuo, L. (2013) Cellular signalling pathways mediating dilation of porcine pial arterioles to adenosine A₂ A receptor activation. *Cardiovasc Res*, **99**, 156-63.
- Hertel, W. and Pass, G. (2002) An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **133**, 555-75.
- Hofman, P.L., Hiatt, K., Yoder, M.C. and Rivkees, S.A. (1997) A₁ adenosine receptors potently regulate heart rate in mammalian embryos. *Am J Physiol*, **273**, R1374-80.

- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. and Humphrey, P.P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, **46**, 157-203.
- Jennings, T., Ringo, J. and Dowse, H. (2009) The relationship of heart function to temperature in *Drosophila melanogaster* and its heritability. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, **311**, 689-96.
- Johnson, E., Sherry, T., Ringo, J. and Dowse, H. (2002) Modulation of the cardiac pacemaker of *Drosophila*: cellular mechanisms. *J Comp Physiol B*, **172**, 227-36.
- Johnson, O., Becnel, J. and Nichols, C.D. (2009) Serotonin 5-HT(2) and 5-HT(1A)-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, **158**, 1292-300.
- Ju, Y.K., Chu, Y., Chaulet, H., Lai, D., Gervasio, O.L., Graham, R.M., Cannell, M.B. and Allen, D.G. (2007) Store-operated Ca²⁺ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ Res*, **100**, 1605-14.
- Kamp, T.J. and Hell, J.W. (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*, **87**, 1095-102.
- Kapoor, N., Maxwell, J.T., Mignery, G.A., Will, D., Blatter, L.A. and Banach, K. (2014) Spatially defined InsP3-mediated signaling in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*, **9**, e83715.
- Kapoor, N., Tran, A., Kang, J., Zhang, R., Philipson, K.D. and Goldhaber, J.I. (2015) Regulation of calcium clock-mediated pacemaking by inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial nodal cells. *J Physiol*, **593**, 2649-63.
- Kapur, N. and Banach, K. (2007) Inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated spontaneous activity in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol*, **581**, 1113-27.
- Kaumann, A.J., Gaster, L.M., King, F.D. and Brown, A.M. (1994) Blockade of human atrial 5-HT₄ receptors by SB 207710, a selective and high affinity 5-HT₄ receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **349**, 546-8.
- Kaumann, A.J. and Levy, F.O. (2006) Fading of 5-HT₄ receptor-mediated inotropic responses to 5-hydroxytryptamine is caused by phosphodiesterase activity in porcine atrium. *Br J Pharmacol*, **147**, 128-30.
- Keddie, J.R., Poucher, S.M., Shaw, G.R., Brooks, R. and Collis, M.G. (1996) In vivo characterisation of ZM 241385, a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, **301**, 107-13.
- Kenakin, T.P. (1982) The Schild regression in the process of receptor classification. *Can J Physiol Pharmacol*, **60**, 249-65.
- Kirby, M.S., Sagara, Y., Gaa, S., Inesi, G., Lederer, W.J. and Rogers, T.B. (1992) Thapsigargin inhibits contraction and Ca²⁺ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *J Biol Chem*, **267**, 12545-51.
- Kucerova, L., Broz, V., Fleischmannova, J., Santruckova, E., Sidorov, R., Dolezal, V. and Zurovec, M. (2012) Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for in vivo experiments. *J Neurochem*, **121**, 383-95.
- Lakatta, E.G., Vinogradova, T., Lyashkov, A., Sirenko, S., Zhu, W., Ruknudin, A. and Maltsev, V.A. (2006) The integration of spontaneous intracellular Ca²⁺ cycling and surface membrane ion channel activation entrains normal automaticity in cells of the heart's pacemaker. *Ann N Y Acad Sci*, **1080**, 178-206.

- Lehmacher, C., Abeln, B. and Paululat, A. (2012) The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct Dev*, **41**, 459-74.
- Li, J., Qu, J. and Nathan, R.D. (1997) Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node. *Am J Physiol*, **273**, H2481-9.
- Lin, N., Badie, N., Yu, L., Abraham, D., Cheng, H., Bursac, N., Rockman, H.A. and Wolf, M.J. (2011) A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*. *Circ Res*, **108**, 1306-15.
- Lohse, M.J., Klotz, K.N., Lindenborn-Fotinos, J., Reddington, M., Schwabe, U. and Olsson, R.A. (1987) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **336**, 204-10.
- Lou, Q., Hansen, B.J., Fedorenko, O., Csepe, T.A., Kalyanasundaram, A., Li, N., Hage, L.T., Glukhov, A.V., Billman, G.E., Weiss, R., Mohler, P.J., Györke, S., Biesiadecki, B.J., Carnes, C.A. and Fedorov, V.V. (2014) Upregulation of adenosine A1 receptors facilitates sinoatrial node dysfunction in chronic canine heart failure by exacerbating nodal conduction abnormalities revealed by novel dual-sided intramural optical mapping. *Circulation*, **130**, 315-24.
- Läer, S., Remmers, F., Scholz, H., Stein, B., Müller, F.U. and Neumann, J. (1998) Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol*, **123**, 1182-8.
- Ma, K.T., Guan, B.C., Yang, Y.Q., Nuttall, A.L. and Jiang, Z.G. (2011) 2-Aminoethoxydiphenyl borate blocks electrical coupling and inhibits voltage-gated K⁺ channels in guinea pig arteriole cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **300**, H335-46.
- Ma, L., Bradu, A., Podoleanu, A.G. and Bloor, J.W. (2010) Arrhythmia caused by a *Drosophila* tropomyosin mutation is revealed using a novel optical coherence tomography instrument. *PLoS One*, **5**, e14348.
- Macmillan, D. and McCarron, J.G. (2010) The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca²⁺ release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store by inhibiting Ca²⁺ pumps in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, **160**, 1295-301.
- Magny, E.G., Pueyo, J.I., Pearl, F.M., Cespedes, M.A., Niven, J.E., Bishop, S.A. and Couso, J.P. (2013) Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. *Science*, **341**, 1116-20.
- Majeed, Z.R., Nichols, C.D. and Cooper, R.L. (2013) 5-HT stimulation of heart rate in *Drosophila* does not act through cAMP as revealed by pharmacogenetics. *J Appl Physiol (1985)*, **115**, 1656-65.
- Majeed, Z.R., Stacy, A. and Cooper, R.L. (2014) Pharmacological and genetic identification of serotonin receptor subtypes on *Drosophila* larval heart and aorta. *J Comp Physiol B*, **184**, 205-19.
- Maltsev, V.A. and Lakatta, E.G. (2008) Dynamic interactions of an intracellular Ca²⁺ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc Res*, **77**, 274-84.
- Maltsev, V.A., Vinogradova, T.M. and Lakatta, E.G. (2006) The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci*, **100**, 338-69.
- Markou, T. and Theophilidis, G. (2000) The pacemaker activity generating the intrinsic myogenic contraction of the dorsal vessel of *Tenebrio molitor* (Coleoptera). *J Exp Biol*, **203**, 3471-83.

- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. and Mikoshiba, K. (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem*, **122**, 498-505.
- Marwood, J.F. (1994) Influence of alpha 1-adrenoceptor antagonism of ketanserin on the nature of its 5-HT₂ receptor antagonism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **21**, 955-61.
- Mcdonald, T., Pelzer, D. and Trautwein, W. (1989) Dual action (stimulation, inhibition) of D600 on contractility and calcium channels in guinea-pig and cat heart cells. *J Physiol*, **414**, 569-86.
- Molina, M.R. and Cripps, R.M. (2001) Ostia, the inflow tracts of the Drosophila heart, develop from a genetically distinct subset of cardial cells. *Mech Dev*, **109**, 51-9.
- Mubagwa, K., Mullane, K. and Flameng, W. (1996) Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc Res*, **32**, 797-813.
- Nation, J.L. (2008) *Insect physiology and Biochemistry*.
- O'neal, S.T. and Anderson, T.D. (2016) Dissection and Observation of Honey Bee Dorsal Vessel for Studies of Cardiac Function. *J Vis Exp*.
- Ocorr, K., Vogler, G. and Bodmer, R. (2014) Methods to assess Drosophila heart development, function and aging. *Methods*, **68**, 265-72.
- Ongini, E., Dionisotti, S., Gessi, S., Irenius, E. and Fredholm, B.B. (1999) Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **359**, 7-10.
- Ouadid, H., Seguin, J., Dumuis, A., Bockaert, J. and Nargeot, J. (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol*, **41**, 346-51.
- Paluzzi, J.P., Bhatt, G., Wang, C.H., Zandawala, M., Lange, A.B. and Orchard, I. (2015) Identification, functional characterization, and pharmacological profile of a serotonin type-2b receptor in the medically important insect, *Rhodnius prolixus*. *Front Neurosci*, **9**, 175.
- Papaefthimiou, C. and Theophilidis, G. (2011) Octopamine--a single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. inhibition. *J Insect Physiol*, **57**, 316-25.
- Peppiatt, C.M., Collins, T.J., Mackenzie, L., Conway, S.J., Holmes, A.B., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Seo, J.T. and Roderick, H.L. (2003) 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*, **34**, 97-108.
- Piazza, N. and Wessells, R.J. (2011) Drosophila models of cardiac disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **100**, 155-210.
- Pino, R., Cerbai, E., Calamai, G., Alajmo, F., Borgioli, A., Braconi, L., Cassai, M., Montesi, G.F. and Mugelli, A. (1998) Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on the pacemaker current I_f in human isolated atrial myocytes. *Cardiovasc Res*, **40**, 516-22.
- Poucher, S.M., Keddle, J.R., Singh, P., Stoggall, S.M., Caulkett, P.W., Jones, G. and Coll, M.G. (1995) The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A_{2a} selective adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, **115**, 1096-102.

- Prier, K.R., Beckman, O.H. and Tublitz, N.J. (1994) Modulating a modulator: biogenic amines at subthreshold levels potentiate peptide-mediated cardioexcitation of the heart of the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *J Exp Biol*, **197**, 377-91.
- Rasmussen, C.A., Sutko, J.L. and Barry, W.H. (1987) Effects of ryanodine and caffeine on contractility, membrane voltage, and calcium exchange in cultured heart cells. *Circ Res*, **60**, 495-504.
- Rigg, L. and Terrar, D.A. (1996) Possible role of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in pacemaking in guinea-pig sino-atrial node. *Exp Physiol*, **81**, 877-80.
- Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., De Meis, L. and Inesi, G. (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca^{2+} transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem*, **267**, 12606-13.
- Santalla, M., Valverde, C.A., Harnichar, E., Lacunza, E., Aguilar-Fuentes, J., Mattiazzi, A. and Ferrero, P. (2014) Aging and CaMKII alter intracellular Ca^{2+} transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, **9**, e101871.
- Sanyal, S., Jennings, T., Dowse, H. and Ramaswami, M. (2006) Conditional mutations in SERCA, the Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J Comp Physiol B*, **176**, 253-63.
- Satoh, H. (1997) Electrophysiological actions of ryanodine on single rabbit sinoatrial nodal cells. *Gen Pharmacol*, **28**, 31-8.
- Saudou, F., Boschert, U., Amlaiky, N., Plassat, J.L. and Hen, R. (1992) A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *EMBO J*, **11**, 7-17.
- Szymanowska-Dziubasik, K., Marciniak, P., Rosiński, G. and Konopińska, D. (2008) Synthesis, cardiostimulatory, and cardioinhibitory effects of selected insect peptides on *Tenebrio molitor*. *J Pept Sci*, **14**, 708-13.
- Takekura, H. and Franzini-Armstrong, C. (2002) The structure of Ca^{2+} release units in arthropod body muscle indicates an indirect mechanism for excitation-contraction coupling. *Biophys J*, **83**, 2742-53.
- Tallarida, R.J., Cowan, A. and Adler, M.W. (1979) pA2 and receptor differentiation: a statistical analysis of competitive antagonism. *Life Sci*, **25**, 637-54.
- Tao, L. and Harris, A.L. (2007) 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32. *Mol Pharmacol*, **71**, 570-9.
- Thamm, M., Rolke, D., Jordan, N., Balfanz, S., Schiffer, C., Baumann, A. and Blenau, W. (2013) Function and distribution of 5-HT₂ receptors in the honeybee (*Apis mellifera*). *PLoS One*, **8**, e82407.
- Tovey, S.C., Dedos, S.G., Rahman, T., Taylor, E.J., Pantazaka, E. and Taylor, C.W. (2010) Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP independent of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **285**, 12979-89.
- Tovey, S.C. and Taylor, C.W. (2013) Cyclic AMP directs inositol (1,4,5)-trisphosphate-evoked Ca^{2+} signalling to different intracellular Ca^{2+} stores. *J Cell Sci*, **126**, 2305-13.
- Tramontana, M., Giuliani, S., Del Bianco, E., Lecci, A., Maggi, C.A., Evangelista, S. and Geppetti, P. (1993) Effects of capsaicin and 5-HT₃ antagonists on 5-hydroxytryptamine-evoked release of calcitonin gene-related peptide in the guinea-pig heart. *Br J Pharmacol*, **108**, 431-5.
- Vinogradova, T.M., Lyashkov, A.E., Zhu, W., Ruknudin, A.M., Sirenko, S., Yang, D., Deo, S., Barlow, M., Johnson, S., Caffrey, J.L., Zhou, Y.Y., Xiao, R.P., Cheng, H., Stern, M.D., Maltsev, V.A. and Lakatta,

- E.G. (2006) High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca^{2+} store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res*, **98**, 505-14.
- Vinogradova, T.M., Zhou, Y.Y., Maltsev, V., Lyashkov, A., Stern, M. and Lakatta, E.G. (2004) Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ Res*, **94**, 802-9.
- Vleugels, R., Lenaerts, C., Vanden Broeck, J. and Verlinden, H. (2014) Signalling properties and pharmacology of a 5-HT₇ -type serotonin receptor from *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol*, **23**, 230-43.
- Von Der Leyen, H. (1989) Phosphodiesterase inhibition by new cardiotonic agents: mechanism of action and possible clinical relevance in the therapy of congestive heart failure. *Klin Wochenschr*, **67**, 605-15.
- Vriens, J., Appendino, G. and Nilius, B. (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol*, **75**, 1262-79.
- Watano, T., Kimura, J., Morita, T. and Nakanishi, H. (1996) A novel antagonist, No. 7943, of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol*, **119**, 555-63.
- Williams, M., Francis, J., Ghai, G., Braunwalder, A., Psychoyos, S., Stone, G.A. and Cash, W.D. (1987) Biochemical characterization of the triazoloquinazoline, CGS 15943, a novel, non-xanthine adenosine antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **241**, 415-20.
- Witz, P., Amlaiky, N., Plassat, J.L., Maroteaux, L., Borrelli, E. and Hen, R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8940-4.
- Wolf, M.J., Amrein, H., Izatt, J.A., Choma, M.A., Reedy, M.C. and Rockman, H.A. (2006) *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1394-9.
- Zhou, Z. and Lipsius, S.L. (1993) Na^{+} - Ca^{2+} exchange current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Physiol*, **466**, 263-85.
- Zornik, E., Paisley, K. and Nichols, R. (1999) Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides*, **20**, 45-51.

Apêndice A - Informações técnicas complementares de uso do programa de computador de medição do diâmetro luminal do vaso dorsal do *T. molitor*

Apêndice A.1 – Configuração dos parâmetros de aquisição da câmera de vídeo

Primeiramente, antes do usuário executar o programa de computador, é necessário ajustar os parâmetros de aquisição no módulo *Automation and Measurement explorer* que é instalado juntamente com o *Labview* versão 11.0. A **Figura A.1** ilustra um exemplo da interface do módulo para que o usuário possa configurar os parâmetros.

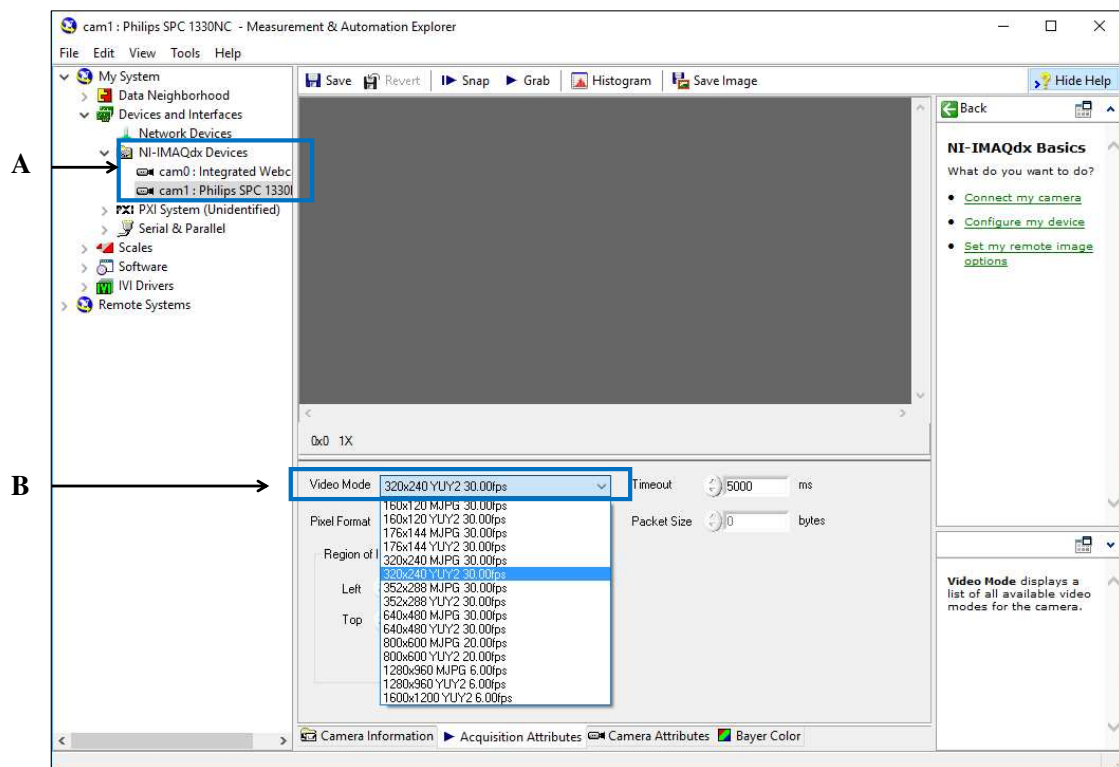
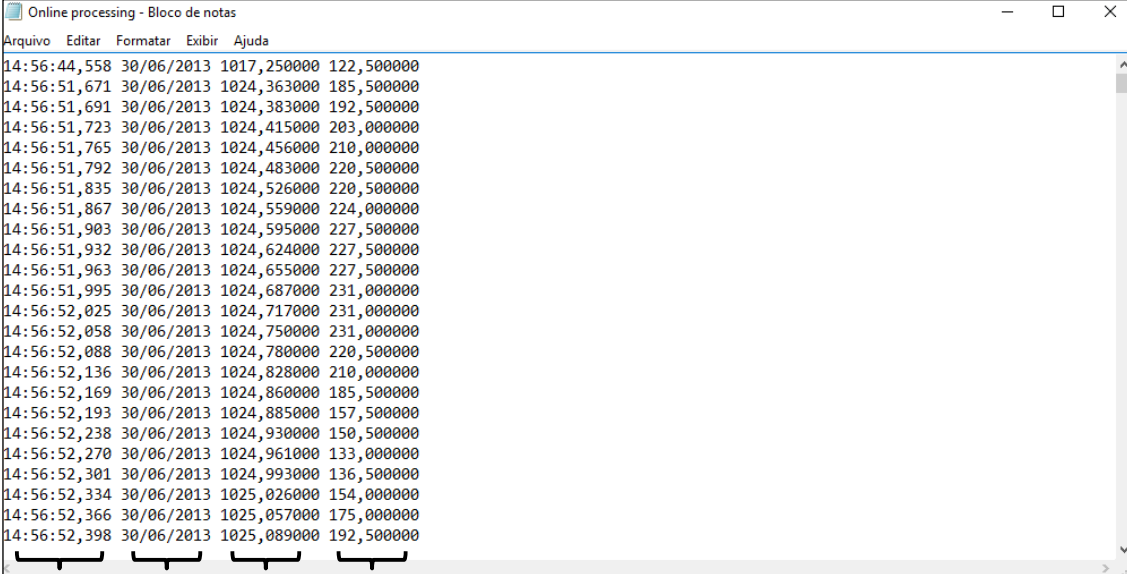


Figura A.1 - Interface do módulo *Measurement and Automation explorer* do *Labview* versão 11.0. Nesse modulo é possível selecionar as câmeras de vídeo conectadas via USB 2.0 ou superior na parte NI-IMAQdx Devices (**A**) e os parâmetros de aquisição de vídeo (*Video Mode*, **B**). É notável que o *Video Mode* está separado por espaços em resolução do vídeo (Largura (*Width*) vs. Altura (*Height*)), tipo de vídeo e taxa de aquisição de quadros (*frames per second*, fps). Nesse caso o *Video mode* selecionado foi de 320X240 YUY2 30.00fps.

Apêndice A.2 – Exemplo do arquivo de texto em que são inseridos os registros do diâmetro luminal ao longo do tempo

A **Figura A.2** ilustra um exemplo de um registro do arquivo de texto extraído do programa de computador. Nesse arquivo está contido todo o registro diâmetro luminal ao longo do tempo. É possível distinguir por colunas o horário da medida (**Figura A.2-A**), da data (**Figura A.2-A**), do tempo em segundos (**Figura A.2-C**) e do diâmetro luminal medido (**Figura A.2-D**). Cada uma das informações presentes nas colunas está separada das outras em cada linha por meio de um espaço.



Horário da medida (A)	Data do experimento (B)	Tempo de medição em segundos (C)	Diâmetro luminal medido (D)
14:56:44,558	30/06/2013	1017,250000	122,500000
14:56:51,671	30/06/2013	1024,363000	185,500000
14:56:51,691	30/06/2013	1024,383000	192,500000
14:56:51,723	30/06/2013	1024,415000	203,000000
14:56:51,765	30/06/2013	1024,456000	210,000000
14:56:51,792	30/06/2013	1024,483000	220,500000
14:56:51,835	30/06/2013	1024,526000	220,500000
14:56:51,867	30/06/2013	1024,559000	224,000000
14:56:51,903	30/06/2013	1024,595000	227,500000
14:56:51,932	30/06/2013	1024,624000	227,500000
14:56:51,963	30/06/2013	1024,655000	227,500000
14:56:51,995	30/06/2013	1024,687000	231,000000
14:56:52,025	30/06/2013	1024,717000	231,000000
14:56:52,058	30/06/2013	1024,750000	231,000000
14:56:52,088	30/06/2013	1024,780000	220,500000
14:56:52,136	30/06/2013	1024,828000	210,000000
14:56:52,169	30/06/2013	1024,860000	185,500000
14:56:52,193	30/06/2013	1024,885000	157,500000
14:56:52,238	30/06/2013	1024,930000	150,500000
14:56:52,270	30/06/2013	1024,961000	133,000000
14:56:52,301	30/06/2013	1024,993000	136,500000
14:56:52,334	30/06/2013	1025,026000	154,000000
14:56:52,366	30/06/2013	1025,057000	175,000000
14:56:52,398	30/06/2013	1025,089000	192,500000

↓
A

↓
B

↓
C

↓
D

Figura A.2 - Exemplo de um arquivo de texto (nomeado como *Online processing.txt*) extraído do programa de computador versão *online* em que está contido o sinal do diâmetro luminal ao longo do tempo. Cada coluna corresponde a uma informação. Estão detalhados o horário da medição (**A**), data do experimento (**B**), tempo de medição em segundos (**C**) e o diâmetro luminal (**D**). Cada informação na coluna está separada das outras, que estão na mesma na linha, por meio de espaços. Se, por exemplo, múltiplos arquivos de vídeos são gravados, seus registros correspondentes podem ser encontrados no arquivo de texto pelo horário de medição, se anotado corretamente pelo usuário o horário em que foi gravado o arquivo de vídeo.

Apêndice A.3 – Exemplo de como o usuário pode organizar em uma planilha os dados registrados a partir do programa de computador

A **Figura A.3** mostra um exemplo de como o usuário pode inserir e organizar em uma planilha os dados dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do vaso dorsal registrados em diferentes trechos de aquisição do sinal e durante gravação dos arquivos de vídeo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Nome do vídeo	Data	Início da medição	Tempo do vídeo (segundos)	Limiar de intensidade luminosa (u.a.)	ESD (µm)	DD (µm)	FS (%)	FC (bpm)	tcontr (milissegundos)
1	Controle	31/06/2013	15:00:00	60	240	56	105	46,67	56	370
2	5-HT (1 nM)	31/06/2013	15:07:00	60	240	55	106	48,11	56	370
3	5-HT (100 nM)	31/06/2013	15:35:00	60	240	31	100	69,00	72	340

Figura A.3 - Exemplo de como o usuário pode organizar em uma planilha do *Microsoft Excel* as informações da aquisição e gravação dos arquivos de vídeo e também dos parâmetros cardíacos da atividade contrátil do vaso dorsal a partir do sinal mostrado na interface. Estão demonstrados as informações e os parâmetros para um experimento em que após estabilização (Controle), foi adicionada a 5-HT nas concentrações de 1 e 100 nM (**Coluna A**) no líquido de perfusão. Estão mostrados a Data (**Coluna B**), horário de início do registro do vídeo (**Coluna C**), tempo em que a chave booleana do programa de computador ficou acionada para gravar o vídeo e o registro (**Coluna D**), além do limiar de intensidade luminosa para extrair o diâmetro luminal (**Coluna E**). Estão mostrados também os parâmetros como registrados pelo usuário como: ESD (**Coluna F**), o D (**Coluna G**), a FS (**Coluna H**), a FC (**Coluna I**) e o t_{contr} (**Coluna J**).

Anexo A - Certificado emitido pela comissão de ética institucional de não obrigatoriedade de um parecer para uso de invertebrados para experimental animal




CEUA/UNICAMP

To whom it may concern

Current Brazilian legislation concerning the ethical use of animals in experimentation is restricted to vertebrates (Phylum Chordata, sub-Phylum Vertebrata), excluding humans, for which there is a separate legislation. Consequently, experimental protocols involving the sole use of insects do not require approval by the institutional Committee for Ethics in Animal Use.

Campinas, July 13, 2016.


Prof. Dra. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD
President
Committee for Ethics in Animal Use
CEUA - UNICAMP