



NATÁLIA FERREIRA OSHIYAMA

**MODELO MATEMÁTICO DE POTENCIAL DE AÇÃO E
TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE
RATOS NEONATOS**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Natália Ferreira Oshiyama

MODELO MATEMÁTICO DE POTENCIAL DE AÇÃO E TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM
MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS NEONATOS

**Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Engenharia Elétrica, na Área
de Engenharia Biomédica.**

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani

Co-orientadora: Rosana Almada Bassani

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA FER-
REIRA OSHIYAMA, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Os4m Oshiyama, Natália Ferreira, 1985-
Modelo matemático de potencial de ação e transporte de Ca²⁺ em miócitos
ventriculares de ratos neonatos / Natália Ferreira Oshiyama. – Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani.
Coorientador: Rosana Almada Bassani.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Coração-ventrículo esquerdo. 2. Desenvolvimento pós-natal. 3.
Fluorescência - Medição. 4. Sódio. 5. Eletrofisiologia - Modelos matemáticos. I.
Bassani, José Wilson Magalhães, 1953-. II. Bassani, Rosana Almada, 1955-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mathematical model of action potential and Ca²⁺ transport in
ventricular myocytes of neonatal rats

Palavras-chave em inglês:

Heart-left ventricle

Postnatal development

Fluorescence

Sodium

Electrophysiology - Mathematical models

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Doutora em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

José Wilson Magalhães Bassani [Orientador]

Emiliano Horacio Medei

Wamberto Antonio Varanda

Wilson Nadruz Junior

Eduardo Tavares Costa

Data de defesa: 28-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

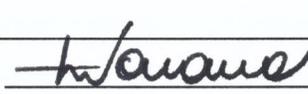
Natália Ferreira Oshiyama

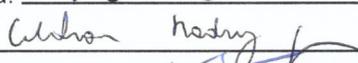
Data da Defesa: 28 de março de 2014

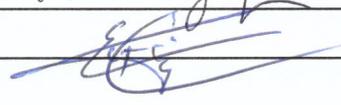
Título da Tese: "Modelo Matemático de Potencial de Ação e Transporte de Ca^{2+} em Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos."

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

Prof. Dr. Emiliano Horacio Medei: _____

Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda:  _____

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior:  _____

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa:  _____

RESUMO

O potencial de ação (PA), variação do potencial elétrico através da membrana (E_m), é gerado por fluxos iônicos através de canais e transportadores, cuja função e expressão pode ser alterada por hormônios, neurotransmissores, drogas e toxinas. Trata-se de um sistema complexo, para o qual os modelos computacionais constituem ferramenta importante de estudo. No presente trabalho, foi desenvolvido um modelo de PA e transporte de Ca^{2+} em células ventriculares de ratos neonatos, para o que foi necessário medir a concentração intracelular de Na^+ ($[Na^+]_i$) e a corrente de Na^+ (I_{Na}) em cardiomiócitos isolados, sobre as quais há pouca informação na literatura, e as correntes de Ca^{2+} (I_{Ca}), transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_K) de K^+ , além do próprio PA para melhorar a precisão do modelo. Medições em miócitos de ratos adultos foram realizadas para comparação. Foi observada menor excitabilidade das células de ratos neonatos, o que poderia ser explicado por um deslocamento da curva de ativação de I_{Na} de ~ 10 mV para a direita, i.e., a ativação dos canais de Na^+ ocorreu em E_m menos negativos e numa faixa mais ampla de E_m em miócitos de neonatos do que em células de adultos. Outra diferença encontrada foi com relação à densidade de I_{Na} , ~ 2 vezes maior em células de neonatos. O maior influxo de Na^+ poderia causar um aumento da $[Na^+]_i$ durante a atividade em células de recém-nascidos, que foi confirmado pela medição de $[Na^+]_i$. No entanto, não houve aumento significativo quando I_{Ca} e o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) foram inibidos, o que indica que o aumento da $[Na^+]_i$ se deve mais ao efluxo de Ca^{2+} via NCX do que ao influxo pelos canais de Na^+ do sarcolema. Além disso, observou-se maior duração do PA em miócitos de neonatos, que poderia ser explicada pela menor densidade observada de correntes repolarizantes (I_{to} e I_K). No entanto, não foi detectada diferença entre idades na densidade de I_{Ca} . Dados de simulações mostraram que o retículo sarcoplasmático (RS) é a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração e que a liberação fracional de Ca^{2+} do RS nos ratos neonatos é menor que nos adultos, confirmando dados experimentais deste laboratório. Portanto, o modelo poderá ser utilizado para prever possíveis alterações eletrofisiológicas dos cardiomiócitos de ratos neonatos em diferentes condições.

ABSTRACT

The action potential (AP), a change in electrical potential across the membrane (E_m), is generated by ionic fluxes through channels and transporters, of which function and expression may be affected by hormones, neurotransmitters, drugs and toxins. Computational models constitute an important tool for the study of this highly non-linear and complex system. In this work, a model of AP and Ca^{2+} transport in ventricular cells of neonatal rats was developed. It was necessary to measure the intracellular Na^+ concentration ($[Na^+]_i$) and the Na^+ current (I_{Na}), for which information in the literature is scarce, and the Ca^{2+} current (I_{Ca}), as well as the outward transient (I_{to}) and delayed rectifier (I_K) K^+ currents, in addition to the AP itself, to improve the accuracy of the model. Measurements from adult rat myocytes were also made in order to compare these developmental phases. It was observed that neonatal rat cells are less excitable, which could be explained by a ~ 10 mV shift to the right of the channel activation curve, i.e., Na^+ channels activation occurred at less negative E_m value and over a higher range of E_m compared to adult cells. On the other hand, I_{Na} density was twice as great as that in adults. This might promote increase in $[Na^+]_i$ during activity in cells from newborns, which was confirmed by measurement of $[Na^+]_i$. Nonetheless, significant Na^+ accumulation was suppressed when I_{Ca} and the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) were inhibited, which indicates that the increase in $[Na^+]_i$ probably depends more on Ca^{2+} efflux via NCX than on the influx through sarcolemmal Na^+ channels. The longer AP duration in neonatal myocytes could be explained by the lower density of the repolarizing currents (I_{to} and I_K). However, age-dependent difference in I_{Ca} density was not observed. Simulation data agreed with experimental data from this laboratory regarding the sarcoplasmic reticulum (SR) as the main source of Ca^{2+} during excitation-contraction coupling and the lower SR fractional release in neonatal than in adult myocytes. In conclusion, the present model may be used to predict possible electrophysiological alterations in developing cardiomyocytes under different conditions.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES	9
3.2 MEDIÇÃO DA $[Na^+]_i$	10
3.3 ELETROFISIOLOGIA	12
3.3.1 Potencial de ação (PA)	13
3.3.2 Corrente de Na^+ (I_{Na})	15
3.3.3 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})	17
3.3.4 Corrente transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia de K^+ (I_K)	19
3.4 MODELO MATEMÁTICO	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS	33
4.1 MEDIÇÃO DA $[Na^+]_i$	33
4.2 ELETROFISIOLOGIA	37
4.2.1 Potencial de ação (PA)	37
4.2.2 Corrente de Na^+ (I_{Na})	39
4.2.3 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})	41
4.2.4 Corrente transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_K) de K^+	43
4.3 MODELO MATEMÁTICO	46
4.3.1 Geometria da célula	46
4.3.2 Concentrações iônicas	47
4.3.3 Corrente de Na^+ (I_{Na})	48
4.3.4 Corrente retificadora tardia de K^+ (I_K)	51
4.3.5 Corrente transiente de saída (I_{to}) de K^+	52
4.3.6 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})	54
4.3.7 Potencial de ação (PA)	58
4.3.8 Dinâmicas de Na^+ e Ca^{2+}	58
5 DISCUSSÃO	63

6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	85
APÊNDICE A – MODELO MATEMÁTICO DE PA E TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS NEONATOS: VALORES DAS VARIÁVEIS E DOS PARÂMETROS	87
APÊNDICE B – MODELO MATEMÁTICO DE PA E TRANSPORTE DE Ca^{2+} EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS NEONATOS: EQUAÇÕES	93
ANEXOS	103
ANEXO A – CERTIFICADO Nº 2490-1 (D) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	105
ANEXO B – CERTIFICADO Nº 2491-1 (B) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	107
ANEXO C – CERTIFICADO Nº 2587-1 (C) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	109
ANEXO D – CERTIFICADO Nº 2588-1 (C) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	111
ANEXO E – CERTIFICADO Nº 2941-1 (A) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	113
ANEXO F – CERTIFICADO Nº 2942-1 (A) DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP	115

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Cristina, ao meu pai, Albino, a toda a minha família e aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani e Profa. Dra. Rosana Almada Bassani, pela paciência, confiança e por todo o apoio dado para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários e estagiários da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP. Aos técnicos da área de P&D pelo apoio nas áreas de eletrônica e mecânica. Agradeço especialmente à Elizângela Souto Oliveria pela amizade e pelo preparo de miócitos e soluções fisiológicas.

Aos alunos e ex-alunos do Departamento de Engenharia Biomédica pelo convívio, amizade, troca de experiências e ajuda.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. nº. 2011/19805-3) pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Potencial de ação registrado em miócito ventricular de rato adulto, no presente estudo. Os números indicam as diferentes fases do PA (ver texto). 1
Figura 3.2.1	Resumo do protocolo experimental para medir a concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$). A segunda linha representa o protocolo de calibração. Após as correções dos registros pela fluorescência de <i>background</i> , e pelo desbotamento e perda do indicador depois da permeabilização da célula, e, a partir da curva de calibração obtida para cada célula, foi possível determinar qual era a $[\text{Na}^+]_i$ correspondente para os sinais medidos no início do protocolo com as células em repouso e sob estimulação elétrica (primeira linha). 11
Figura 3.3.1	Protocolo utilizado para determinação do limiar de estimulação da membrana. 14
Figura 3.3.2	Alguns parâmetros analisados do PA, em que foram omitidos APD30, APD90 e $dV/dt_{\text{máx}}$ para facilitar a visualização. 14
Figura 3.3.3	(A) Protocolo utilizado para determinação da curva $I \times V$ da I_{Na} ; (B) protocolo experimental utilizado para determinação da curva de inativação em <i>steady-state</i> da I_{Na} 16
Figura 3.3.4	(A) Protocolo de <i>voltage-clamp</i> utilizado para determinação da curva $I \times V$ da I_{Ca} . O pré-pulso para -40 mV a partir de V_{hold} foi utilizado para inativar a I_{Na} . (B) Protocolo de <i>voltage-clamp</i> utilizado para determinação da curva de inativação em <i>steady-state</i> da I_{Ca} 19
Figura 3.3.5	(A) Protocolo utilizado para determinação das curvas $I \times V$ de I_{to} e I_{K} . O pré-pulso para -40 mV a partir de V_{hold} foi utilizado para inativar a I_{Na} . Foram feitos registros em solução controle e após adição de $0,5$ mM 4-AP à solução de banho. A I_{to} foi obtida como a corrente resultante da subtração do registro de controle daquele obtido após adição de 4-AP. Já a I_{K} foi obtida a partir da corrente <i>steady-state</i> medida em solução controle. (B) Protocolo utilizado para determinação das curvas de inativação de I_{to} e I_{K} 19
Figura 3.4.1	Diagrama esquemático do modelo de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de rato neonato. Os <i>buffers</i> de Ca^{2+} são troponina C (TnC), calmodulina (CAM) e calsequestrina (CSQ). O retículo sarcoplasmático (RS) foi dividido em dois compartimentos: (1) não-juncional, onde ocorrem apenas captação e vazamento de Ca^{2+} , i.e., o compartimento em que há os fluxos de captação de Ca^{2+} pelo RS (J_{up}) e de vazamento de Ca^{2+} do RS (J_{leak}); (2) juncional, onde ocorre apenas liberação de Ca^{2+} , i.e., o compartimento em que há o fluxo de liberação de Ca^{2+} do RS (J_{rel}). Há ainda os fluxos de difusão de Ca^{2+} entre os

compartimentos do RS (J_{tr}), de difusão de Ca^{2+} do espaço subsarcolemático (espaço delimitado pela linha tracejada) para o mioplasma (J_{x-fer}), e de associação-dissociação de Ca^{2+} dos sítios de ligação de cátions divalentes da troponina C (J_{TnC}). As correntes são: de sódio dependente de tensão (I_{Na}), de sódio de *background* (I_{Nab}), da ATPase de Na^+/K^+ (I_{NaK}), transiente de saída de K^+ (I_{to}), retificadora tardia de K^+ (I_K), retificadora de entrada de K^+ (I_{K1}), de Cl^- ativada por Ca^{2+} ($I_{Cl,Ca}$), de Ca^{2+} tipo T (I_{CaT}), de Ca^{2+} tipo-L (I_{CaL}), de Ca^{2+} de *background* (I_{Cab}), da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($I_{p(Ca)}$) e do trocador Na^+/Ca^{2+} (I_{NCX}). 22

Figura 3.4.2 Transição entre os estados permissivo (correspondente ao estado “1-x”) e não permissivo (correspondente ao estado “x”) dos canais. As transições são feitas a taxas α_x e β_x (Hille, 1992). 23

Figura 4.1.1 Queda da emissão do indicador CoroNa Green após a permeabilização com gramicidina (10 μ M), determinada em 12 miócitos de ratos adultos. $F_{inicial}$ é a amplitude do sinal de fluorescência 2 min depois da adição da gramicidina e F é a emissão medida em diferentes tempos. O ajuste aos pontos foi feito com uma função exponencial simples ($r^2=0,853$). 33

Figura 4.1.2 (A) Exemplo de registro realizado durante experimento com uma célula ventricular de rato adulto, com os valores de emissão do indicador (expressos como amplitude do sinal registrado pelo fotodetector) corrigidos pelo desbotamento e perda de indicador pós-permeabilização com gramicidina. Na figura, somente foi mostrado 1 s de cada registro para melhor visualização: 1: fluorescência de fundo; 2: célula em repouso; 3: após 5 min de estimulação elétrica a 0,5 Hz; 4: a célula foi exposta a 100 μ M de ouabaína em $[Na^+]_o=0$ mM ; 5: mesma solução contendo 10 μ M de gramicidina; 6 e 7: a solução de banho continha $[Na^+]_o=9,06$ mM e 36,25 mM, respectivamente, assim como ouabaína e gramicidina; (B) Curva de calibração, feita a partir das amplitudes do sinal de fluorescência quando a $[Na^+]_i$ era zero, 9,06 e 36,25 mM (intervalos 5, 6 e 7 da Figura 3.1.2.A, respectivamente). Foi feito um ajuste linear da curva (coeficiente linear: $1,882 \pm 0,065$ V; coeficiente angular: $0,026 \pm 0,003$ V/mM; $r^2=0,987$). 34

Figura 4.1.3 Valores médios e respectivos erros-padrões de $[Na^+]_i$ em miócitos ventriculares isolados de ratos neonatos e adultos durante repouso e estimulação elétrica a 0,5 Hz por 5 min (* $p < 0,001$, repouso vs. estimulação elétrica, teste *post-hoc* de Bonferroni, N = 4 e 8 em neonatos e adultos, respectivamente). 35

Figura 4.1.4 Comparação entre os valores médios de $[Na^+]_i$ em miócitos ventriculares de ratos neonatos durante repouso e estimulação elétrica a 0,5 Hz em três situações: (1) controle, ou seja, quando a célula era perfundida por solução de *Tyrode*; (2) com os canais de Ca^{2+} tipo-L bloqueados (na figura indicado por Cd^{2+}) por meio da adição de 100 μ M $CdCl_2$ à solução de *Tyrode* modificada (i.e., com 0,5 mM $CaCl_2$ e

	0,5 mM MgCl ₂), e com o NCX inibido pela adição de 5 mM NiCl ₂ além da adição de 100 μM CdCl ₂ à solução de <i>Tyrode</i> modificada (na figura indicado por Ni ²⁺ +Cd ²⁺) (*p< 0,01, repouso vs. estimulação elétrica, teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni, N= 4 para todos os casos).	36
Figura 4.2.1	Potenciais de ação registrados em miócitos ventriculares de rato adulto (preto) e de rato neonato (cinza).	37
Figura 4.2.2	Parâmetros de duração de potencial de ação (PA) de miócitos ventriculares de ratos neonatos (N=9) e adultos (N=12): t _{0mV} foi calculado a partir do pico do PA até o potencial de membrana (E _m) alcançar o valor de 0 mV; APD30, APD50 e APD90 foram os tempos calculados a partir do disparo do PA até o E _m alcançar o valor de 30, 50 e 90% do potencial de repouso (*p< 0,05, teste <i>t</i> de Student).	38
Figura 4.2.3	Varição mínima do potencial de membrana para que o limiar fosse atingido (ΔE _{limiar}); B. densidade de corrente de estimulação necessária para que o PA fosse disparado (I _{limiar}); C: taxa de despolarização máxima da membrana durante a fase 0 do potencial de ação (dV/dt _{máx}). *p< 0,05, teste <i>t</i> de Student.	39
Figura 4.2.4	Curvas corrente-tensão da corrente de sódio (I _{Na}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 14) e adultos (preto, N= 9).* p< 0,05 vs. adulto (teste de Bonferroni).	40
Figura 4.2.5	Curvas médias de inativação e ativação em <i>steady-state</i> calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente de sódio e tensão determinada em 12 (inativação) e em 14 (ativação) miócitos ventriculares de ratos neonatos (r ² = 0,90 e 0,88, respectivamente) e de 9 miócitos de ratos adultos (r ² = 0,91 e 0,94, respectivamente).	40
Figura 4.2.6	Curvas corrente-tensão da corrente de cálcio (I _{Ca}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 11) e adultos (preto, N= 6).* p< 0,001 vs. adulto (teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni).	42
Figura 4.2.7	Curvas médias de ativação (d _∞) e de inativação (f _∞ , linha tracejada) em <i>steady-state</i> calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente de cálcio e tensão determinada em 11 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, r ² = 0,839) e em 8 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, r ² = 0,922) nos casos das curvas de ativação, e em 6 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, r ² = 0,893) em 6 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, r ² = 0,927) no caso da curva de inativação.	42
Figura 4.2.8	Curvas corrente-tensão da corrente transiente de saída de K ⁺ (I _{to}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de	

	ratos neonatos (cinza, N= 4) e adultos (preto, N= 5).* p< 0,05 vs. adulto (teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni)	44
Figura 4.2.9	Curvas corrente-tensão da corrente retificadora tardia de K ⁺ (I _K), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 5) e adultos (preto, N= 6).* p< 0,05 vs. adulto (teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni).	44
Figura 4.2.10	(A) Curvas médias de ativação (M _∞) e de inativação (H, linha tracejada) em <i>steady-state</i> calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente transiente de saída de K ⁺ e tensão determinada em 4 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, r ² = 0,839) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, r ² = 0,842) nos casos das curvas de ativação, e em 5 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, r ² = 0,832) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, r ² = 0,773) no caso da curva de inativação. (B) Curvas médias de ativação (X _∞) e de inativação (X _i , linha tracejada) em <i>steady-state</i> calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente retificadora tardia de K ⁺ e tensão determinada em 5 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, r ² = 0,774) e em 6 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, r ² = 0,741) nos casos das curvas de ativação, e em 6 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, r ² = 0,861) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, r ² = 0,793) no caso da curva de inativação.	45
Figura 4.3.1	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> (m _∞), a partir das Equações 44 e 45, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	49
Figura 4.3.2	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> (h _∞), a partir das equações 47 e 48, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	49
Figura 4.3.3	Curvas corrente-tensão da corrente de Na ⁺ (I _{Na}) em unidade de densidade de corrente. A diferença entre a curva obtida experimentalmente (em cinza) e por simulação (em preto) não foi significativa (p> 0,05). O potencial de reversão diferiu bastante do encontrado experimentalmente devido à diferente [Na ⁺] _o utilizada na simulação (140 x 70 mM). Quando a [Na ⁺] _o = 70 mM foi utilizada, o potencial de reversão ficou menos positivo e mais próximo do experimental.	50
Figura 4.3.4	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> (X _i) a partir da equação 50 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	51
Figura 4.3.5	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> (X _∞) a partir das equações 52 e 53 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	52

Figura 4.3.6	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> (H) a partir da equação 55 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	53
Figura 4.3.7	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> (X_{∞}) a partir das equações 57 e 58 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	54
Figura 4.3.8	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da I_{CaT} (b_{∞} , para $E_m \leq -20$ mV) e da I_{CaL} (d_{∞} , para $E_m > -20$ mV) e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	55
Figura 4.3.9	Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> da I_{CaT} (g_{∞} , para $E_m \leq -20$ mV) e da I_{CaL} (f_{∞} , para $E_m > -20$ mV) a partir das equações 68-69 e 71-72, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).	57
Figura 4.3.10	Curvas corrente-tensão da corrente de Ca^{2+} (I_{Ca}) em unidade de densidade de corrente. A diferença entre a curva obtida experimentalmente (em cinza) e por simulação (em preto) não foi significativa ($p > 0,05$).	57
Figura 4.3.11	Potencial de ação (PA) medido em uma célula ventricular de rato neonato (em cinza) e PA simulado com o modelo desenvolvido (em preto).	58
Figura 4.3.12	$[Na^+]_i$ durante estimulação a 0,5 Hz por aproximadamente 33 min, quando já foi alcançado um estado de regime permanente. Ocorre um acúmulo de Na^+ ao longo do tempo no meio intracelular, de 16,3 a 29,6 mM.	59
Figura 4.3.13	Variação do potencial de membrana (eixo da esquerda, em preto) e da $[Ca^{2+}]_i$ (eixo da direita, em cinza) ao longo de 2 s de simulação.	59
Figura 4.3.14	Integral do fluxo de Ca^{2+} mediado por cada transportador durante a queda da $[Ca^{2+}]_i$: ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), e transportadores lentos (Slow, grupo formado pelo uniporter mitocondrial e pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema).	60
Figura 4.3.15	Contribuição relativa de cada um dos transportadores para o declínio da $[Ca^{2+}]_i$ durante o processo de relaxamento celular. Do fluxo total, a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA) é responsável por 63,6% da remoção do Ca^{2+} do meio intracelular, enquanto que o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) tem 26,8% de participação e os transportadores lentos (Slow, grupo formado pelo uniporter mitocondrial e pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema, eixo da direita) contribuem com 9,6%.	60
Figura 4.3.16	Variação de $[Ca^{2+}]$ no retículo sarcoplasmático juncional ($[Ca^{2+}]_{RSJ}$, eixo da esquerda) e no não-juncional ($[Ca^{2+}]_{RSNJ}$, eixo da direita) ao longo de 4 s de simulação.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.4.1	Parâmetros de chaveamento dos receptores de rianodina (RyRs).	28
Tabela 4.2.1	Parâmetros das curvas de ativação e inativação em <i>steady-state</i> obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K). A comparação das médias foi realizada com o teste t de Student, para o qual os valores de p estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).	41
Tabela 4.2.2	Parâmetros das curvas de ativação e inativação em <i>steady-state</i> obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K) e constante de tempo de inativação obtida por uma função exponencial (constante de tempo τ). A comparação das médias foi realizada com o teste t de Student, para o qual os valores de p estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).	43
Tabela 4.2.3	Parâmetros das curvas de ativação e inativação em <i>steady-state</i> das correntes transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_K) de K^+ , obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K). A comparação das médias foi realizada com o teste t de Student, para o qual os valores de p estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).	46
Tabela 4.3.1	Áreas e volumes calculados.	47
Tabela 4.3.2	Concentrações iônicas.	47
Tabela A.1	Áreas e volumes calculados.	87
Tabela A.2	Concentrações iônicas.	87
Tabela A.3	Parâmetros relacionados ao RS.	88
Tabela A.4	Parâmetros relacionados aos canais de Ca^{2+}	89
Tabela A.5	Parâmetros relacionados ao canal de Na^+	89
Tabela A.6	Parâmetros relacionados às correntes de K^+ (transiente de saída (I_{to}), retificadora tardia (I_K) e retificadora de entrada (I_{K1})).	89
Tabela A.7	Parâmetros relacionados aos fluxos intracelulares de Ca^{2+}	90
Tabela A.8	Parâmetros relacionados à corrente do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX).	90
Tabela A.9	Parâmetros relacionados à corrente da ATPase Na^+/K^+	91
Tabela A.10	Parâmetros relacionados à corrente de Ca^{2+} do sarcolema.	91
Tabela A.11	Parâmetros relacionados à corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}	91
Tabela A.12	Parâmetros gerais.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amplitude do sinal de fluorescência
A_s	Área de superfície da célula
α_x	Taxa de transição do estado permissivo para o não-permissivo
APD30	Duração do potencial de ação até 30% de repolarização
APD50	Duração do potencial de ação até 50% de repolarização
APD90	Duração do potencial de ação até 90% de repolarização
b	Parâmetro de ativação dos canais de Ca^{2+} tipo-T
b_∞	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> dos canais de Ca^{2+} tipo-T
β_x	Taxa de transição do estado permissivo para o não-permissivo
CEB	Centro de Engenharia Biomédica
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
C_m	Capacitância de membrana
CAM	Calmodulina
CSQ	Calsequestrina
d	Parâmetro de ativação dos canais de Ca^{2+} tipo-L
d_∞	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da corrente de Ca^{2+}
$dV/dt_{\text{máx}}$	Taxa de despolarização máxima da membrana
ΔE	Amplitude do pulso retangular de tensão
E_{CaL}	Potencial de reversão da corrente de Ca^{2+} tipo-L
E_{CaT}	Potencial de reversão da corrente de Ca^{2+} tipo-T
E_K	Potencial de equilíbrio de Nernst do íon K^+
E_l	Potencial de reversão da corrente de vazamento
E_{limiar}	Valor limiar de potencial de membrana
E_m	Potencial de membrana
E_{Na}	Potencial de equilíbrio de Nernst do íon Na^+
E_{pico}	Potencial de pico
f	Parâmetro de inativação dos canais de Ca^{2+} tipo-L
F	Constante de Faraday

f_{∞}	Parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> da corrente de Ca^{2+}
G	Parâmetro de inativação dos canais de Ca^{2+} tipo-T
g_{∞}	Parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> da corrente de Ca^{2+} tipo-T
G_{Ca}	Condutância dos canais de Ca^{2+}
\overline{G}_{Ca}	Condutância máxima do canal de Ca^{2+}
G_{Cab}	Potencial de reversão da corrente de Ca^{2+} de <i>background</i>
\overline{G}_{CaL}	Condutância máxima do canal de Ca^{2+} tipo-L
\overline{G}_{CaT}	Condutância máxima do canal de Ca^{2+} tipo-T
\overline{G}_K	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I_K
\overline{G}_{K1}	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I_{K1}
G_{Na}	Condutância dos canais de Na^+
\overline{G}_{Na}	Condutância máxima dos canais de Na^+
G_{Nab}	Potencial de reversão da corrente de Na^+ de <i>background</i>
\overline{G}_{I_o}	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I_o
H	Parâmetro de inativação da corrente de Na^+
H	Parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> da corrente retificadora tardia de K^+
h_{∞}	Parâmetro de inativação em <i>steady-state</i> da corrente de Na^+
I_{Ca}	Corrente de Ca^{2+}
I_{Cab}	Corrente Ca^{2+} de <i>background</i>
I_{CaL}	Corrente de Ca^{2+} tipo-L
I_{CaT}	Corrente de Ca^{2+} tipo-T
$I_{Cl,Ca}$	Corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}
I_K	Corrente retificadora tardia de K^+
I_{K1}	Corrente retificadora de entrada de K^+
I_l	Corrente de vazamento
I_{limiar}	Corrente limiar de estimulação
I_{Na}	Corrente de Na^+
I_{Nab}	Corrente sódio de <i>background</i>

I_{NCX}	Corrente do trocador Na^+/Ca^{2+}
I_{NaK}	Corrente da ATPase de Na^+/K^+
$I_{NaK}^{m\acute{a}x}$	Corrente máxima da ATPase Na^+/K^+
$I_{p(Ca)}$	Corrente ATPase de Ca^{2+} do sarcolema
$I_{p(Ca)}^{m\acute{a}x}$	Corrente máxima da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema
I_{pico}	Corrente de pico
I_{regime}	Corrente de regime permanente
I_{to}	Corrente transiente de saída de K^+
J_{leak}	Fluxo vazamento de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
J_{rel}	Fluxo de liberaao de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
J_{tr}	Fluxo de Ca^{2+} entre os compartimentos do retículo sarcoplasmático
J_{up}	Fluxo de captaao de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático
J_{trpn}	Fluxo associado à associaao-dissociaao de Ca^{2+} dos sítios de ligaao de catıons divalentes da troponina
J_{xfer}	Fluxo difusão de Ca^{2+} do espaço subsarcolemático para o mioplasma
k_a^+	Taxa de transiao $P_{C1}-P_{O1}$ do RyR
k_a^-	Taxa de transiao $P_{O1}-P_{C1}$ do RyR
k_b^+	Taxa de transiao $P_{O1}-P_{O2}$ do RyR
k_b^-	Taxa de transiao $P_{O2}-P_{O1}$ do RyR
k_c^+	Taxa de transiao $P_{O1}-P_{C2}$ do RyR
k_c^-	Taxa de transiao $P_{C2}-P_{O1}$ do RyR
k_{hTnC}^+	Constante de associaao aparente de Ca^{2+} aos sítios de alta afinidade da troponina C
k_{hTnC}^-	Constante de dissociaao aparente de Ca^{2+} aos sítios de alta afinidade da troponina C
k_{lTnC}^+	Constante de associaao aparente de Ca^{2+} aos sítios de baixa afinidade da troponina C
k_{lTnC}^-	Constante de dissociaao aparente de Ca^{2+} aos sítios de baixa afinidade da troponina C

K_m^{CAM}	Concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da calmodulina é metade da máxima
K_m^{CSQ}	Concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da calsequestrina é metade da máxima
$K_{m,Ca}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente do trocador Na^+/Ca^{2+} é a metade da saturante
$K_{m,CaL}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente de Ca^{2+} tipo-L é a metade da saturante
$K_{m,Cl}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+} é metade da saturante
$K_{m,p(Ca)}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema é a metade da saturante
$K_{m,Na}$	Concentração de Na^+ na qual a corrente do trocador Na^+/Ca^{2+} é a metade da saturante
$K_{m,up}$	Concentração na qual a velocidade de recaptção de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático é metade da máxima
k_{NaCa}	Fator de escalonamento da corrente do trocador Na^+/Ca^{2+}
k_{sat}	Fator de saturação do trocador Na^+/Ca^{2+} em potenciais muito negativos
M	Parâmetro de ativação da corrente de Na^+
M	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do receptor de rianodina P_{O1} - P_{O2}
m_∞	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da corrente de Na^+
M_∞	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da corrente transiente de saída de K^+
N	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do receptor de rianodina P_{C1} - P_{O1}
H	Parâmetro de controle da dependência de tensão do trocador Na^+/Ca^{2+}
$n_{Cl,Ca}$	Expoente de Hill da corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}
NCX	Trocador Na^+/Ca^{2+}
PA	Potencial de ação
P_{C1}	Fração de receptores de rianodina no estado P_{C1}
P_{C2}	Fração de receptores de rianodina no estado P_{C2}
$P_{Cl,Ca}$	Permeabilidade do canal que medeia a corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}
P_{O1}	Fração de receptores de rianodina no estado P_{O1}
P_{O2}	Fração de receptores de rianodina no estado P_{O2}

P_{RyR}	Fator de modulação do receptor de rianodina
R	Constante universal dos gases
R_K	Resistência à corrente de K^+
R_l	Resistência à corrente de vazamento
R_{Na}	Resistência à corrente de Na^+
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptores de rianodina
R_{acesso}	Resistência de acesso
R_{leak}	Resistência de vazamento
R_m	Resistência de membrana
R_{pip}	Resistência de pipeta
R_s	Resistência em série
T	Temperatura absoluta
τ	Constante de tempo da corrente capacitiva
TEA-Cl	Cloreto de tetraetilamônio
TnC	Troponina C
τ_{lr}	Constante de tempo de difusão do Ca^{2+} do RSC para o RSJ
τ_{xfer}	Constante de tempo de difusão do Ca^{2+} do espaço subsarcolema para o mioplasma
t_{0mV}	Período desde o pico do potencial de ação até o potencial de membrana atingir o valor de 0 mV
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v_1	Taxa de liberação de Ca^{2+} pelos receptores de rianodina
v_2	Taxa de vazamento de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
v_3	Velocidade máxima de captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
$V_{1/2}$	Potencial em que a amplitude do parâmetro correspondente é igual à metade da máxima
V_{hold}	Potencial de <i>holding</i>
V_{mio}	Volume do mioplasma
V_{RSNJ}	Volume do retículo sarcoplasmático não-juncional

V_{RSJ}	Volume do retículo sarcoplasmático juncional
V_{ss}	Volume do espaço subsarcolemático
x_{∞}	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> genérico
X_{∞}	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da corrente retificadora tardia de K^+
X_i	Parâmetro de ativação em <i>steady-state</i> da corrente transiente de saída de K^+
Y_0	Coefficiente linear da reta referente à curva de calibração do indicador CoroNa Green
4-AP	4-aminopiridina
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração intracelular de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_o$	Concentração extracelular de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_{RSNJ}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático não-juncional
$[Ca^{2+}]_{RSJ}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático juncional
$[Ca^{2+}]_{ss}$	Concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemático
$[Cl^-]_i$	Concentração intracelular de Cl^-
$[Cl^-]_o$	Concentração extracelular de Cl^-
$[CAM]_{tot}$	Concentração total de calmodulina no mioplasma
$[CSQ]_{tot}$	Concentração total de calsequestrina no RSJ
$[HTnC]_{tot}$	Concentração total de troponina no mioplasma
$[HTnCCa]$	Concentração de sítios de ligação de alta afinidade ao Ca^{2+} da troponina
$[K^+]_i$	Concentração intracelular de K^+
$[K^+]_o$	Concentração extracelular de K^+
$[LTnC]_{tot}$	Concentração total de troponina no mioplasma
$[LTnCCa]$	Concentração de sítios de ligação de baixa afinidade ao Ca^{2+} da troponina
$[Na^+]_i$	Concentração intracelular de Na^+
$[Na^+]$	Concentração de Na^+
$[Na^+]_o$	Concentração extracelular de Na^+

1 INTRODUÇÃO

O potencial de ação (PA) é um sinal elétrico (variação do potencial através da membrana, E_m) que se propaga pela membrana e que dá início ao processo de excitação-contracção em miócitos cardíacos. O potencial de ação típico de células ventriculares de mamíferos adultos apresenta 5 fases (Figura 1.1) (Sperelakis, 1995):

a) na fase 0, ocorre o influxo de íons pelos canais de Na^+ dependentes de tensão do sarcolema, que medeiam a corrente de Na^+ (I_{Na}), o que causa despolarização da membrana;

b) a fase 1 é uma fase de rápida repolarização da membrana, causada principalmente pela corrente transiente de saída de K^+ (I_{to});

c) a fase 2, fase de platô, é devida principalmente ao equilíbrio entre correntes de entrada que tendem a despolarizar a membrana, como a corrente de Ca^{2+} tipo-L (I_{CaL}), e correntes de saída que tendem a repolarizar a membrana, como a I_{to} e as componentes da corrente retificadora tardia de K^+ (I_{K}), que são ativadas lentamente;

d) na fase 3, o equilíbrio que havia na fase de platô não se mantém devido à inativação da I_{CaL} e devido ao aumento das componentes de I_{K} , já totalmente ativadas nessa fase, e da corrente retificadora de entrada de K^+ (I_{K1}), que começa a ser ativada durante esta fase;

e) finalmente, a fase 4 corresponde ao potencial de repouso da célula, mantido por I_{K1} .

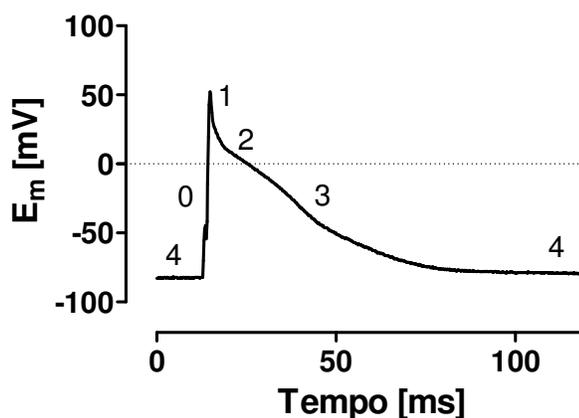


Figura 1.1. Potencial de ação registrado em miócito ventricular de rato adulto, no presente estudo. Os números indicam as diferentes fases do PA (ver texto).

A I_K possui três componentes: ultra-rápida, que age principalmente na fase 2 do PA, em que também ocorre a ativação da componente lenta, cuja atuação persiste ainda durante a fase 3 em conjunto com uma outra componente, a rápida (Grant, 2009). Além dessas correntes, durante a fase 1 ainda há a participação das correntes de Ca^{2+} ativada por Cl^- e do trocador Na^+/Ca^{2+} , sendo que esta última ainda atua durante as fases 2 e 4 do PA (Klitzner, 1996).

Durante o PA, canais de Ca^{2+} tipo-L, ativados por despolarização, se abrem e permitem o influxo de Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} leva à abertura dos canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), denominados receptores de rianodina (RyR, do termo *ryanodine receptor*), o que causa a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do RS para o citoplasma, a qual inicia o processo de contração celular (Bers, 2002). Alguns hormônios, neurotransmissores, drogas e toxinas podem alterar a expressão e função de canais e transportadores iônicos (Sperelakis, 1995). No entanto, como cada canal influencia indiretamente a atividade de outros canais por meio da alteração do E_m , o sistema é altamente não-linear, e modelos computacionais de PA são uma importante ferramenta para seu estudo (Silva e Rudy, 2009). Modelos matemáticos de PA tornaram-se uma ferramenta importante para entender a eletrofisiologia da membrana e prever o que determinadas alterações (e.g., na cinética de abertura de canais iônicos) poderiam causar à atividade elétrica do coração. Se for integrado a um modelo de acoplamento excitação-contração, o modelo de PA também pode ser uma ferramenta poderosa para prever alterações na dinâmica de íons Ca^{2+} , elemento responsável pelo acoplamento entre a atividade elétrica (excitação) e mecânica (contração).

Os pioneiros no campo de modelamento de células excitáveis foram Alan Hodgkin e Andrew Huxley. No trabalho publicado em 1952 (Hodgkin e Huxley, 1952), há uma descrição quantitativa das correntes elétricas que fluem através da membrana de axônio gigante de lula. Neste trabalho, os autores sugeriram que o comportamento elétrico da membrana poderia ser representado por um circuito em que a corrente poderia ser gerada tanto pelo carregamento da capacitância de membrana (C_m) quanto pelo fluxo de íons através da membrana pelas resistências em paralelo com C_m . A corrente iônica foi dividida em três componentes: corrente de Na^+ (I_{Na}), de K^+ (I_K) e de vazamento (I_l , do inglês *leakage current*, gerada pelo fluxo de íons Cl^- e outros). Cada uma das componentes era determinada por uma força eletromotriz (*driving force*) e por um coeficiente de permeabilidade que tem a dimensão de condutância ($G= 1/R$, onde R é a respectiva resistência). A *driving force* é a responsável pelo fluxo dos íons e pode ser medida como a diferença entre o E_m e o potencial de equilíbrio de Nernst de cada íon (E_{Na} , E_K ou E_l). Os potenciais de

equilíbrio de Nernst são constantes, mas as condutâncias são dependentes do potencial de membrana e do tempo. Portanto, o modelo de Hodgkin e Huxley levou a uma significativa evolução da área, predizendo corretamente a forma do PA, mudanças em impedância e velocidade de condução.

Em 1960, no entanto, foi publicado um trabalho sobre a existência de dois tipos de canais de K^+ em fibras de Purkinje do coração (Hutter e Noble, 1960), cujas correntes foram denominadas retificadora de entrada (I_{K1}) e retificadora tardia (I_K) de K^+ . A corrente I_K , de ativação lenta, que está presente na fase 3 do PA (Figura 1.1), é a responsável pela repolarização da membrana após a fase de platô. Já I_{K1} , que é ativada quando o E_m retorna a valores próximos do de repouso, está presente no final da fase 3 e na fase 4 do PA (Figura 1.1). Com estas descobertas, outro modelo mais completo teve que ser desenvolvido para contemplar a existência dessas duas correntes. Em 1962, Noble adaptou as equações da corrente I_K do modelo de Hodgkin e Huxley (1952) e criou as equações de I_{K1} a partir de resultados experimentais (Noble, 1962). Apesar de mostrar como o marca-passo primário do coração de mamíferos (nódulo sino-atrial) poderia gerar atividade elétrica espontânea sem a existência de um oscilador externo, o modelo de Noble não conseguiu simular o longo platô do PA observado experimentalmente em miócitos cardíacos (fase 2 da Figura 1.1). A ausência do longo platô poderia ser explicada se a I_{Na} fosse diferente no coração (Attwell *et al.*, 1979), ou se houvesse outra corrente de entrada. Foi Reuter (1967) que sugeriu a existência de outra corrente de entrada, a de Ca^{2+} (I_{Ca}), que poderia compensar pela corrente de saída de K^+ e gerar o longo platô.

Ainda durante os anos 60, Noble e Tsien (1969) mostraram matematicamente que I_K era composta de dois processos cineticamente distintos, que correspondiam às componentes rápida (I_{Kr}) e lenta (I_{Ks}) (Sanguinetti e Jurkiewicz, 1991). A partir destas propostas, foi desenvolvido o modelo matemático de fibra de Purkinje por McAllister, Noble e Tsien (1975), que foi mais tarde aperfeiçoado por Beeler e Reuter (1977) em um modelo de células ventriculares que foi o precursor dos modelos de Luo e Rudy (Luo e Rudy, 1994a,b).

Anos mais tarde, DiFrancesco (1981) descobriu que a corrente I_{Ks} nas fibras de Purkinje não era uma corrente de K^+ pura, e que o canal que a mediava permitia a passagem tanto de íons K^+ quanto de íons Na^+ , de modo semelhante ao observado para a corrente *funny* (I_f), presente em células do nódulo sino-atrial. Outra descoberta importante para o desenvolvimento posterior de modelos matemáticos foi a de que nem toda corrente de entrada lenta era devida ao fluxo de íons

pelos canais de Ca^{2+} , mas que também poderia ser mediada pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, do termo *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*). O NCX só passou a fazer parte de modelos matemáticos quando sua estequiometria foi confirmada como 3:1, isto é, 3 íons Na^+ em troca de 1 íon Ca^{2+} (Reeves e Halle, 1984) ao invés de 2:1 (Reuter e Seitz, 1969), como originalmente pensado, revelando-se eletrogênico, i.e., gerava diferença de potencial elétrico através da membrana. Essas descobertas foram usadas para desenvolver o modelo de DiFrancesco-Noble (1985), o primeiro a levar em consideração mudanças nas concentrações iônicas durante a atividade elétrica e a incluir a variação da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Este modelo possibilitou o desenvolvimento do modelo de Hilgemann-Noble (1987), cuja maior deficiência foi não levar em consideração a liberação fracional de Ca^{2+} do RS, ou seja, a fração da carga total de Ca^{2+} do RS que é liberada a cada contração. Este parâmetro foi quantificado pela primeira vez por Bassani *et al.* (1993) em miócito ventricular isolado de coelho, e depende da entrada de Ca^{2+} pelos canais de cálcio tipo-L e da própria carga de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1995). O desenvolvimento da versão do modelo de Hilgemann-Noble para uma única célula (Earm e Noble, 1990) possibilitou a simulação matemática da dinâmica de Ca^{2+} em células cardíacas e a derivação de modelos modernos de acoplamento excitação-contração. Com a incorporação de maiores detalhes em nível local (e.g., comunicação entre os canais de Ca^{2+} tipo-L e RyRs), os modelos permitiram finalmente descrever a liberação fracional de Ca^{2+} do RS (Stern, 1992; Jafri *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1999; Greenstein e Winslow, 2002) (Noble, 2007).

Apesar do campo de modelamento matemático de células cardíacas ser atualmente muito ativo, ainda há poucos modelos desenvolvidos para células de neonatos (Wang e Sobie, 2008; Rapila *et al.*, 2008; Korhonen *et al.*, 2009). Como o isolamento de cardiomiócitos de roedores recém-nascidos tem menor custo que de adultos, e o fenótipo das células imaturas em cultura é bastante estável (Chlopčíková *et al.*, 2001), a utilização destas células tornou-se comum para estudar características morfológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas do coração, além de ser um modelo bem estabelecido para avaliação de transporte e toxicidade de drogas (Wenzel *et al.*, 1970; Acosta e Ramos, 1984; Limaye e Shaikh, 1999; Estevez *et al.*, 2000). Outra motivação para desenvolver modelos específicos para células de neonatos é o recente uso de células tronco para tratamento de doenças cardíacas, já que essas células passam por estágios em que se comportam progressivamente como células de embriões, fetos e neonatos, ao se diferenciarem em miócitos cardíacos (Colluci, 1997).

Sabe-se que os cardiomiócitos de mamíferos passam por mudanças na geometria e nas dimensões, além de alterações na constituição intracelular e em canais e transportadores iônicos, durante os processos de crescimento e diferenciação pós-natal (Nassar *et al.*, 1987; Vornanen, 1996; Wetzel e Klitzner, 1996; Sedarat *et al.*, 2000; Dan *et al.*, 2007). Ocorre, por exemplo, variação na expressão de canais de Na^+ ao longo do desenvolvimento (Abd Allah *et al.*, 2012; Gershome *et al.*, 2011). Como alterações nos valores de condutância ao Na^+ (G_{Na}) provocam mudanças no limiar de estimulação das células (Hund e Rudy, 2000), expressões de isoformas distintas dos canais de Na^+ , e em diferentes concentrações, poderiam causar mudanças na G_{Na} total e, conseqüentemente, modificar a excitabilidade das células cardíacas ao longo do desenvolvimento pós-natal.

Ainda há poucos trabalhos que apresentem a I_{Na} medida em miócitos ventriculares de ratos recém-nascidos (Conforti *et al.*, 1992) ou ainda que apresentem comparações entre a I_{Na} medida em células de animais com diferentes idades (Xu *et al.*, 1991). No estudo de Xu *et al.* (1991), realizado com células em cultura, não foi observada diferença significativa na densidade da I_{Na} em cardiomiócitos de neonatos e adultos. Sabe-se, no entanto, que a densidade da I_{Na} em células ventriculares cultivadas de rato neonato é modulada pela concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Chiamvimonvat *et al.*, 1995). Em células cultivadas, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ apresenta maior valor basal e menor amplitude de variação, i.e., a amplitude do transiente de Ca^{2+} intracelular é menor (Snopko *et al.*, 2007). Portanto, células em cultura poderiam ter densidade de I_{Na} diferente da medida em miócitos recém-isolados. Um dos objetivos deste trabalho foi medir a I_{Na} em miócitos ventriculares recém-isolados de ratos neonatos e adultos, além do PA, para analisar possíveis diferenças causadas pela I_{Na} na excitabilidade dessas células.

Outra possível conseqüência de diferentes densidades de I_{Na} ao longo do desenvolvimento poderia ser alteração na concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), já que um dos fatores que pode levar a aumento da $[\text{Na}^+]_i$ durante estimulação elétrica em cardiomiócitos é o maior influxo de Na^+ pelos canais de Na^+ dependentes de tensão presentes no sarcolema (Bers *et al.*, 2003). O modelo matemático de PA ventricular de camundongo neonato desenvolvido por Wang e Sobie (2008) prediz acentuado aumento da $[\text{Na}^+]_i$ com a atividade em células imaturas quando comparado a de adultos (Wang e Sobie, 2008), que, no entanto, não pôde ser comprovada devido a falta de dados experimentais publicados na literatura. Portanto, neste trabalho, também foi medida a $[\text{Na}^+]_i$ em miócitos ventriculares recém-isolados de ratos recém-nascidos e adultos.

Há dados controversos na literatura sobre o que ocorre com a I_{CaL} , parâmetro importante para se compreender o mecanismo de acoplamento excitação-contração, ao longo do desenvolvimento dos cardiomiócitos. O trabalho de Cohen e Lederer (1988), realizado com cultura de miócitos ventriculares de ratos, mostrou aumento na densidade da I_{CaL} em miócitos de recém-nascidos com relação aos de adultos, enquanto que, no trabalho de Vornanen (1996), realizado com miócitos recém-isolados de ratos, não foi detectada diferença significativa. Neste trabalho, será realizada a medição de I_{Ca} em miócitos recém-isolados de ratos neonatos e adultos para investigar se há diferença ou não na sua densidade nessas fases do desenvolvimento.

Outra diferença significativa entre células ventriculares de roedores neonatos e adultos é a menor densidade de correntes de saída de K^+ (Xu *et al.*, 1996) nos primeiros, um dos fatores que explicam a ocorrência de PAs mais longos em recém-nascidos comparados aos adultos (Wang *et al.*, 1996). Como o objetivo final deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático de PA e transporte de Ca^{2+} , as correntes I_{to} e I_K também serão medidas para aumentar a precisão do modelo.

Sabe-se ainda que, em células de neonatos, o RS é pouco desenvolvido e por isso acreditava-se que o RS fosse incapaz de armazenar e liberar uma concentração de Ca^{2+} suficiente para efetuar uma contração. No entanto, Bassani e Bassani (2002) mostraram que o RS é a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração. Com o modelo matemático desenvolvido, foi possível avaliar a participação relativa do RS no processo de relaxamento celular e também foi avaliada a liberação fracional de Ca^{2+} do RS. Com isso, espera-se que o modelo possa auxiliar a se obter conhecimento importante para o entendimento de mecanismos fisiológicos dependentes da fase de desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

1. Medição da concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) em miócitos ventriculares isolados de ratos adultos e neonatos em repouso e durante atividade elétrica;
2. Medição das correntes de Na^+ (I_{Na}) e Ca^{2+} (I_{Ca}) e as correntes transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_{K}) de K^+ em miócitos ventriculares isolados de ratos recém-nascidos e adultos utilizando a técnica de *whole-cell patch clamp*;
3. Desenvolvimento do modelo matemático de potencial de ação e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de ratos neonatos;
4. Utilização do modelo desenvolvido para determinar a participação relativa dos transportadores na remoção de Ca^{2+} do citoplasma durante o relaxamento celular;
5. Calcular a liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) a partir dos resultados obtidos com o modelo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.1 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES

Foram utilizados miócitos ventriculares de ratos Wistar com idade de 3-5 dias (neonatos), bem como adultos (de 3 a 6 meses), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) e do biotério do CEB/UNICAMP. O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP (prot. Nº. 2490-1(D), 2491-1(B), 2587-1(C), 2588-1(C), 2941-1(A) e 2942-1(A), presentes nos Anexos A-F, respectivamente).

Os miócitos ventriculares de ratos neonatos e adultos foram isolados por digestão enzimática segundo Bassani e Bassani (2002) e Penna e Bassani (2010), respectivamente. Os ratos neonatos foram sacrificados por decapitação, e os adultos por exsanguinação após concussão cerebral ou anestesia com isoflurano, com imediata retirada do coração. No caso de neonatos, a aorta foi canulada para perfusão coronária com solução de *Tyrode* sem Ca^{2+} (composição em mM: NaCl 140, KCl 6, MgCl_2 1, glicose 10, HEPES 5) por aproximadamente 5 min. Em seguida, colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA; 0,5 mg/ml) foi adicionada à solução de *Tyrode* sem Ca^{2+} , e esta solução foi perfundida por 5 min, seguida por lavagem com solução sem enzima contendo albumina de soro fetal bovino (0,5 mg/ml). O tecido ventricular foi então separado e triturado delicadamente na mesma solução, e a suspensão foi filtrada. No caso dos adultos, o coração foi perfundido com solução de *Krebs* (em mM: NaCl 115; KCl 4,6; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,4; glicose 11,1; pH 7,4 sob borbulhamento com carbogênio) a 37°C, contendo 0,5 mM de CaCl_2 , por aproximadamente 4 minutos. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução, porém sem adição de CaCl_2 , por 5 minutos. Foram então adicionados a esta solução colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA; 0,8-1,2 mg/ml), e a perfusão com a enzima prosseguiu por 15-20 minutos. A seguir, procedeu-se à perfusão com solução sem a enzima e contendo albumina sérica bovina (BSA; 0,5

mg/ml) por 3-5 min. O tecido ventricular esquerdo foi então separado e triturado em solução cardioplégica (em mM: KCl 30; ácido glutâmico 70; MgCl₂ 1; HEPES 10; glicose 11; KH₂PO₄ 10; taurina 20; pH 7,4 a 23°C (ajustado com KOH)) contendo BSA, para dissociação das células. A suspensão de células foi lavada 2 vezes na mesma solução e armazenada a 4°C.

3.2 MEDIÇÃO DA [Na⁺]_i

A suspensão de miócitos ventriculares foi depositada em uma câmara de perfusão (Gomes, 1997), cujo fundo era formado por uma lamínula, onde foram perfundidos por solução de *Tyrode* normal (composição em mM: NaCl 140, KCl 6, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, glicose 10, HEPES 5) à temperatura ambiente (23-25 °C).

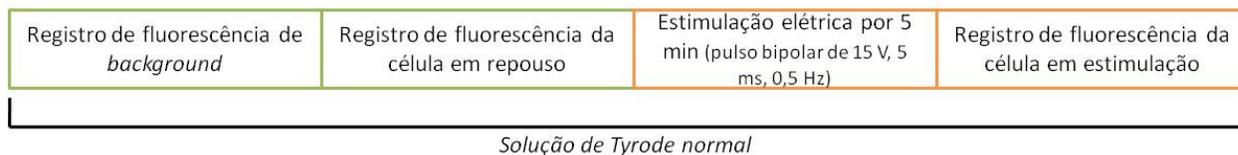
Para medir a [Na⁺]_i, foi utilizado o indicador CoroNa Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), cujos comprimentos de onda de excitação e emissão são 492 e 516 nm, respectivamente (Meier *et al.*, 2006). Portanto, foi necessário utilizar um sistema que permitisse a excitação do indicador no comprimento de onda do azul e que conseguisse detectar o sinal emitido no comprimento de onda do verde. O sistema utilizado foi aquele desenvolvido e descrito por Soriano *et al.* (2007).

Inicialmente, as células foram incubadas com o indicador CoroNa Green (5 µM, Molecular Probes) por 5 min, seguido de lavagem por 30 min para de-esterificação intracelular do indicador.

Após registro da fluorescência de fundo (*background*), a emissão do indicador foi medida em células quiescentes e após 5 min de estimulação (0,5 Hz), na presença de solução de *Tyrode* normal. A seguir, procedeu-se, para cada célula, ao protocolo para calibração do indicador, no qual foi determinada a emissão em valores conhecidos de [Na⁺]_i. Para isto, as células foram incubadas com soluções contendo diferentes [Na⁺], na presença do ionóforo gramicidina (Sigma-Aldrich, Germany), que permeabiliza o sarcolema de maneira seletiva, permitindo a passagem de Na⁺. As soluções com diferentes [Na⁺] foram obtidas por mistura das soluções 1 e 2, de iguais forças iônicas. A solução 1, sem K⁺, tinha a seguinte composição (em mM): NaCl 30, gluconato de sódio 115; e a solução 2, sem Na⁺, era composta de (mM): KCl 30, gluconato de potássio 115. As duas soluções continham também HEPES 10 mM, glicose 10 mM e EGTA 2 mM, com pH

7,2 (base Tris) a 23 °C. Para obter a curva de calibração, o primeiro passo foi bloquear a ATPase Na^+/K^+ com ouabaína (100 μM , Sigma-Aldrich, Germany) diluída em solução sem Na^+ (solução 2). O sinal de fluorescência foi registrado após 5-8 min, tempo necessário para a ação da droga. Em seguida, a solução de banho foi trocada pela solução 2 com 100 μM de ouabaína e 10 μM do ionóforo de cátions gramicidina (Sigma-Aldrich). Como a $[\text{K}^+]$ na solução de banho era alta, o E_m tendia a zero e, portanto, era possível obter o equilíbrio das concentrações intra e extracelular de Na^+ . Deste modo, foi possível registrar, após 5 min, o sinal de fluorescência correspondente à $[\text{Na}^+]_i = 0 \text{ mM}$. Em seguida, foi repetido o processo para soluções com concentrações extracelulares de Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$) de 9,06 mM e 36,25 mM, o que permitiu a determinação da curva de calibração, que relaciona a $[\text{Na}^+]_i$ (eixo x) e a amplitude do sinal de fluorescência (eixo y). A curva de calibração foi ajustada linearmente com a equação $A = K \cdot [\text{Na}^+]_i + Y_0$, onde A é a amplitude do sinal de fluorescência medido, K é o coeficiente angular da reta, e Y_0 é o coeficiente linear da reta. Assim, foi possível calcular a $[\text{Na}^+]_i$ da célula a partir de sinais de fluorescência que já haviam sido medidos antes do início do protocolo de calibração. A Figura 3.2.1 resume todo o protocolo experimental.

1. Medição da $[\text{Na}^+]_i$



2. Processo de calibração

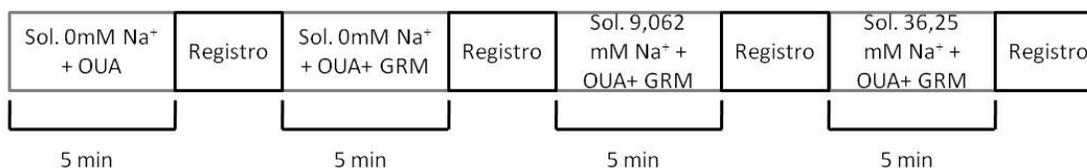


Figura 3.2.1. Resumo do protocolo experimental para medir a concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$). A segunda linha representa o protocolo de calibração. Após as correções dos registros pela fluorescência de *background*, e pelo desbotamento e perda do indicador depois da permeabilização da célula, e, a partir da curva de calibração obtida para cada célula, foi possível determinar qual era a $[\text{Na}^+]_i$ correspondente para os sinais medidos no início do protocolo com as células em repouso e sob estimulação elétrica (primeira linha).

A gramicidina cria canais na membrana que permitem a passagem de íons Na^+ , e foi descrito vazamento do indicador para o meio extracelular na presença deste ionóforo, possivelmente

devido à permeabilização da membrana (Meier *et al.*, 2006). Além disso, como o indicador não é ratiométrico (i.e., mede-se sua emissão em apenas uma faixa de comprimento de onda), seu desbotamento causado por repetidos períodos de iluminação pode levar a erros na estimativa de $[Na^+]_i$. Portanto, foi necessário determinar uma curva de queda da intensidade de emissão do indicador após a permeabilização, obtida a partir da medição do sinal de fluorescência em $[Na^+]_o$ constante (36,25 mM) em vários intervalos após a adição do ionóforo. Também foi feita a correção dos registros de acordo com o desbotamento do indicador antes da célula ser permeabilizada. Assim, com os registros corrigidos não só pela fluorescência de fundo, mas também pelo desbotamento e perda do indicador, foi possível estimar a $[Na^+]_i$ a partir da curva de calibração.

Em células de neonatos, a medição de $[Na^+]_i$ em repouso e após estimulação elétrica também foi realizada em solução de *Tyrode* modificada (composição em mM: NaCl 140, KCl 6, MgCl₂ 0,5, CaCl₂ 0,5, glicose 10, HEPES 5) contendo 5 mM NiCl₂ (inibidor do NCX, Varro *et al.*, 1993) e 100 μM CdCl₂ (bloqueador do canal de Ca²⁺ tipo-L), ou na presença apenas de 100 μM CdCl₂.

3.3 ELETROFISIOLOGIA

Foi utilizado um sistema para *patch clamp* composto de um pré-amplificador (*Headstage*, CV203BU, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, EUA), um amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments Inc.) e um conversor A/D–D/A (Digidata 1200B, Axon Instruments Inc.). Os protocolos de pulsos estimulatórios foram gerados pelo programa *pClamp* (versão 6.0, Axon Instruments Inc.) e aplicados ao miócito por meio do pré-amplificador. O mesmo equipamento foi usado para aquisição do sinal eletrofisiológico, que foi armazenado no formato digital, em computador, para futura análise. A taxa de aquisição do sinal foi de 10 kHz para todos os registros, e o sinal foi filtrado em 5 kHz (filtro passa-baixa, tipo Bessel, 4^a ordem) por meio de um comando presente no amplificador utilizado. Todo o sistema foi montado sobre uma mesa anti-vibração (modelo Micro-g 163-531, Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, EUA) e foi utilizado um micromanipulador (mod. Joystick Hydraulic Micromanipulator MO-188, Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japão) para a aproximação da micropipeta à célula.

Todos os registros foram feitos em modo *whole-cell*, em que é obtido acesso elétrico ao interior da célula. No momento em que era obtida a configuração *cell-attached*, a capacitância da pipeta era compensada por meio de comando no amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments Inc.). Após formação do giga-selo, por contato do eletrodo com a membrana, e aplicação de pressão negativa para rompimento do *patch*, ganhava-se acesso elétrico ao interior da célula em modo *voltage-clamp*. O E_m era previamente fixado em -80 mV (V_{hold}), e um pulso retangular de tensão de +5 mV e duração de 50 ms era aplicado, resultando em uma corrente, cuja amplitude e curso temporal eram devidos principalmente à C_m . Portanto, ao realizar o ajuste de uma função exponencial simples à corrente, era possível obter os parâmetros necessários para o cálculo de C_m . No momento em que o pulso retangular de tensão era aplicado, a corrente de pico (I_{pico}) se igualava à razão da amplitude do pulso retangular de tensão (ΔE) e da resistência em série (R_s), formada pela composição das resistências de pipeta, de acesso e de vazamento. Ao longo do tempo, o capacitor passava a armazenar energia. Durante o estado de regime permanente, o capacitor funcionava como um circuito aberto, o que fazia com que a corrente de regime permanente (I_{regime}) fosse igual à divisão de ΔE pela soma de R_s e R_m (resistência de membrana). Além disso, como a constante de tempo da corrente capacitiva (τ) equivalia ao produto de C_m e da resistência equivalente do circuito, que, no caso, era R_s em paralelo com R_m durante o processo de armazenamento de energia, foi possível obter a Equação 1 (Gentet *et al.*, 2000).

$$C_m = \frac{\tau}{\Delta E} \frac{(I_{pico})^2}{I_{pico} - I_{regime}} \quad (1)$$

As micropipetas foram feitas a partir de capilares de boro-silicato (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EUA; mod. TW150F-3) por estiramento sob aquecimento (mod. P-97, Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA), de modo a apresentar resistência de 7-11 M Ω para medição de PA e de 1-5 M Ω para medição de correntes iônicas.

3.3.1 Potencial de ação (PA)

Foram registrados os PAs em miócitos ventriculares de ratos adultos e neonatos em modo *current-clamp*, por estimulação com pulsos retangulares de corrente com duração de 4 ms e amplitude variável (degraus de 0,2 nA a partir de 0,2 nA, como pode ser observado na Figura 3.3.1),

para que o limiar de estimulação pudesse ser determinado. A solução de pipeta utilizada foi composta de (mM): glutamato de potássio 130; NaCl 7; HEPES 10; EGTA 0,5; pH ajustado para 7,2 a 23°C com KOH. Foi utilizada como solução de banho a de *Tyrode* normal, já descrita anteriormente. A partir desse protocolo de estimulação, foi possível determinar a densidade da corrente limiar de estimulação (I_{limiar} , i.e., mínima corrente necessária para evocar um PA, dividida pela capacitância da membrana). Também foi possível determinar o potencial diastólico, o valor limiar de E_m (E_{limiar}), o potencial de pico (E_{pico}) (Figura 3.3.2) e a taxa de despolarização máxima ($dV/dt_{\text{máx}}$) da fase zero do PA (Figura 1.1). A partir dos registros de PA ainda foi possível calcular os parâmetros de duração, como o período desde o pico do PA até o E_m atingir o valor de 0 mV (t_{0mV}), e as durações do PA até 30, 50 e 90% de repolarização (APD30, APD50 e APD90, respectivamente) (Figura 3.3.2).

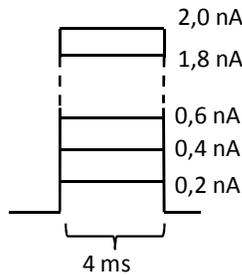


Figura 3.3.1. Protocolo utilizado para determinação do limiar de estimulação da membrana.

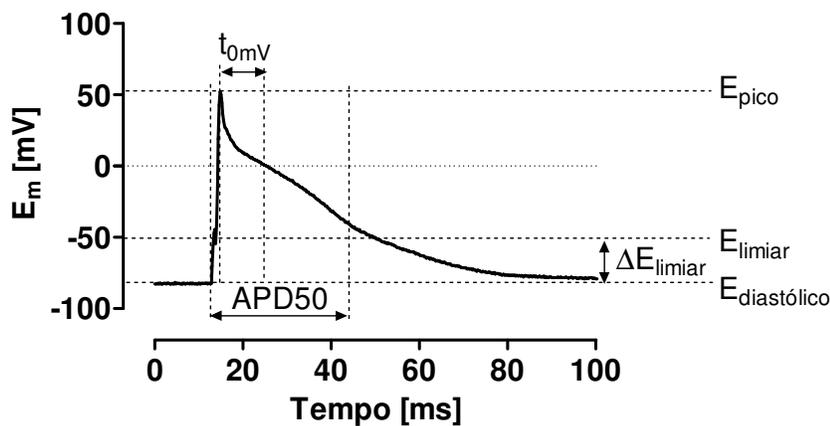


Figura 3.3.2. Alguns parâmetros analisados do potencial de ação, em que foram omitidos APD30, APD90 e $dV/dt_{\text{máx}}$ para facilitar a visualização.

Em todos os registros feitos, foi realizada a correção do potencial de junção líquida. No caso do PA, foi subtraído do valor registrado o valor aproximado de 15 mV, calculado pelo soft-

ware *Clampex*, presente no pacote *pClamp* (versão 6.0, Axon Instruments Inc.). Ainda foram realizadas as compensações de capacitância e resistência em série no modo *whole-cell* por meio de comandos presentes no amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.), obtendo-se uma compensação de aproximadamente 70%.

3.3.2 Corrente de Na⁺ (I_{Na})

Para registrar a I_{Na} em configuração *whole-cell voltage clamp*, a composição da solução da micropipeta foi (em mM): CsCl 145; MgCl₂ 0,8; HEPES 10; EGTA 10; pH ajustado para 7,2 a 23°C com CsOH. A solução de banho utilizada foi (em mM): NaCl 70; CsCl 75; KCl 4; CaCl₂ 0,5; MgCl₂ 1,5; cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl) 10; 4-aminopiridina (4-AP) 5; CoCl₂ 3; HEPES 10; glicose 10; pH ajustado para 7,4 a 23°C com HCl (Berman e Lipka, 1994). Nestes experimentos, a [Na⁺]_o foi reduzida para 70 mM (vs. a concentração fisiológica de 140 mM), para que fosse facilitado o controle do selo durante os registros, e foi utilizado CoCl₂ para bloquear a I_{Ca}, além de substituição de K⁺ por Cs⁺ e adição de TEA-Cl e 4-AP para bloquear as correntes de K⁺. Para determinação da relação corrente-tensão (curva I x V), foi aplicada uma série de degraus de pulsos de tensão para valores-testes de E_m de -70 a +70 mV, a 0,5 Hz. Os pulsos tinham duração de 200 ms, e eram aplicados em incrementos de 10 mV, a partir de V_{hold} = -80 mV (Figura 3.3.3.A).

Além da curva I x V, foram também determinadas:

- 1) **curva de ativação em regime permanente (*steady-state*) dos canais de Na⁺**: estimada a partir dos valores de I_{Na} da curva I x V. A partir do pico de I_{Na} a cada valor de E_m teste, e de valores conhecidos de E_m e estimados do potencial de reversão de I_{Na} (E_{Na}), pôde ser calculada a condutância ao Na⁺ (G_{Na}), já que $G_{Na} = I_{Na} / (E_m - E_{Na})$ (Hille, 1992). O E_{Na} foi tomado como o potencial na curva I x V no qual I_{Na} = 0 pA. Para cada valor de E_m teste, calculou-se a razão entre G_{Na} e a máxima ($\overline{G_{Na}}$). Esta razão correspondia ao parâmetro de ativação em *steady-state* (m_∞), e a curva de ativação era a relação entre este parâmetro e o valor de E_m ao qual a corrente era evocada. A relação foi descrita pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1 / (1 + \exp((V_{1/2} - X) / K))$, onde V_{1/2} corresponde ao potencial em

que a amplitude de m_{∞} corresponde à metade da máxima e, K ao coeficiente de inclinação da curva. Y corresponde à amplitude de m_{∞} e X ao valor de E_m correspondente;

- 2) **curva de inativação em *steady-state* dos canais de Na^+** : foram aplicados 20 pulsos inativantes de I_{Na} com duração de 100 ms, a partir de V_{hold} (-80 mV) para -120 mV a +70 mV, em incrementos de 10 mV. Cada pulso inativante foi seguido da aplicação de um pulso teste para -10 mV, de duração de 25 ms (Figura 3.3.3.B). Foi possível então calcular, para cada valor de tensão do pulso inativante, a razão entre a amplitude da corrente disparada pelo pulso teste e a máxima I_{Na} registrada em toda a família de curvas (i.e., em amplitude do pulso inativante que não causa inativação dos canais). Esta razão correspondeu ao parâmetro de inativação em *steady-state* (h_{∞}), e a curva de inativação descreveu a relação entre este parâmetro e o valor de E_m que precedia a corrente evocada. A relação foi descrita pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1 - 1/(1 + \exp((V_{1/2} - X)/K))$, onde $V_{1/2}$ corresponde ao potencial em que a amplitude de h_{∞} corresponde à metade da máxima e, K ao coeficiente de inclinação da curva. Y corresponde à amplitude de h_{∞} e X ao valor de E_m correspondente.

Em todos os registros feitos, foi realizada a correção do potencial de junção líquida. Na relação entre I_{Na} e E_m , foi feita a correção do E_m pelo valor aproximado de +10 mV, valor referente ao cálculo de potencial de junção líquida feito no software *Clampex*, presente no pacote *pClamp* (versão 6.0, Axon Instruments Inc.). Ainda foram realizadas as compensações de capacitância e resistência em série no modo *whole-cell* por meio de comandos presentes no amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.), obtendo-se uma compensação de aproximadamente 70%.

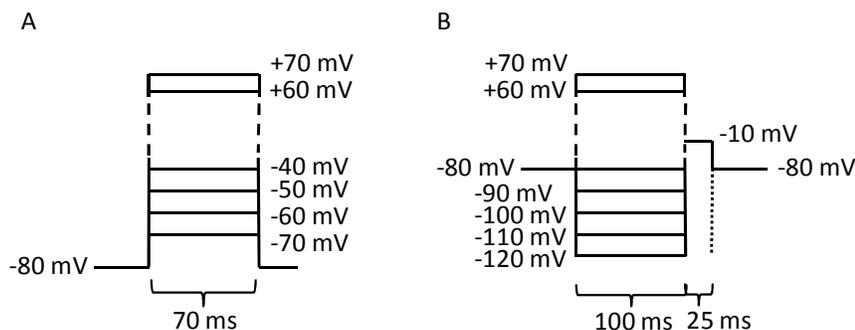


Figura 3.3.3. (A) Protocolo utilizado para determinação da curva $I \times V$ da I_{Na} ; (B) protocolo experimental utilizado para determinação da curva de inativação em *steady-state* da I_{Na} .

3.3.3 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})

Para registrar a I_{Ca} em configuração *whole-cell voltage clamp*, a composição da solução da micropipeta foi (em mM): CsCl 130; MgATP₂ 5; KCl 1; HEPES 10 (pH 7,2 ajustado com CsOH). A solução de banho era composta de (em mM): TEA-Cl 140, 4-AP 3, CsCl 4, MgCl₂ 1, HEPES 10, CaCl₂ 1 (pH 7,4 ajustado com CsOH). Nestes experimentos, a I_{Na} foi inativada por um pré-pulso na forma de rampa com duração de 70 ms a partir de V_{hold} para -40 mV, com manutenção de E_m neste potencial por 5 ms. Além disso, foi utilizada tetracaína a 150 μM para garantir bloqueio farmacológico da I_{Na} . As componentes da I_{K} foram bloqueadas por meio da adição de TEA-Cl e 4-AP à solução extracelular e substituição de K^+ por Cs^+ . Para determinar a relação corrente x tensão (curva $I \times V$), foi aplicada uma série de degraus de pulsos de tensão para valores-testes de E_m de -60 a +60 mV, a 0,5 Hz. Os pulsos tinham duração de 100 ms, e eram aplicados em incrementos de 10 mV, a partir de $V_{\text{hold}} = -80$ mV (Figura 3.3.4.A).

Além da curva $I \times V$, foram também determinadas:

- 1) curva de ativação em *steady-state* dos canais de Ca^{2+} :** A partir do pico de I_{Ca} a cada valor de E_m teste, e de valores conhecidos e estimados de E_m e do potencial de equilíbrio de Ca^{2+} (E_{Ca}), respectivamente, pôde ser calculada a condutância ao Ca^{2+} (G_{Ca}), já que $G_{\text{Ca}} = I_{\text{Ca}} / (E_m - E_{\text{Ca}})$ (Hille, 1992). O E_{Ca} foi tomado como o potencial de reversão na curva $I \times V$, no qual $I_{\text{Ca}} = 0$ pA. Para cada valor de E_m teste, calculou-se a razão entre G_{Ca} e a máxima condutância ($\overline{G_{\text{Ca}}}$). Esta razão correspondia ao parâmetro de ativação em *steady-state*, e a curva de ativação era a relação entre este parâmetro e o valor de E_m ao qual a corrente era evocada. A relação foi descrita pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1 / (1 + \exp((V_{1/2} - X) / K))$, onde $V_{1/2}$ corresponde ao potencial em que a amplitude do parâmetro de ativação em *steady-state* corresponde à metade da máxima e, K ao coeficiente de inclinação da curva. Y corresponde à amplitude do parâmetro de ativação em *steady-state* e X ao valor de E_m correspondente;
- 2) constante de tempo de inativação da I_{CaL} :** Nesse caso, foi feito um ajuste de uma função exponencial simples à fase de queda da corrente, desde o pico da I_{Ca} em $E_m = 0$ mV até o fim do período de aplicação do pulso retangular de tensão;

3) **curva de inativação em *steady-state* dos canais de Ca^{2+}** : foram aplicados 20 pulsos de tensão para inativação dos canais, com duração de 200 ms, a partir de V_{hold} (-80 mV) para potenciais testes de -120 mV a +70 mV, em incrementos de 10 mV. Cada pulso inativante foi seguido da aplicação de um pulso teste para 0 mV, de duração de 200 ms, para ativar a I_{Ca} (Figura 3.3.4.B). Foi possível então calcular, para cada valor de tensão do pulso inativante, a razão entre a amplitude da corrente disparada pelo pulso teste e a máxima I_{Ca} registrada em toda a família de curvas (i.e., correspondente à tensão do pulso inativante que não causa inativação dos canais). Esta razão corresponde ao parâmetro de inativação em *steady-state*, e a curva de inativação é a relação entre este parâmetro (o parâmetro de inativação em *steady-state* corresponde ao eixo Y) e o valor de E_m que precede a corrente evocada (correspondente ao eixo X). A relação foi descrita pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1 - 1/(1 + \exp((V_{1/2} - X)/K))$, onde $V_{1/2}$ corresponde ao potencial em que a amplitude do parâmetro de inativação em *steady-state* corresponde à metade da máxima, e K ao coeficiente de inclinação da curva.

Em todos os registros feitos, foi realizada a correção do potencial de junção líquida, aproximadamente +5 mV, valor referente ao cálculo de potencial de junção líquida feito no software *Clampex*, presente no pacote *pClamp* (versão 6.0, Axon Instruments Inc.). Ainda foram realizadas as compensações de capacitância e resistência em série (~70%) no modo *whole-cell* por meio de comandos presentes no amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.).

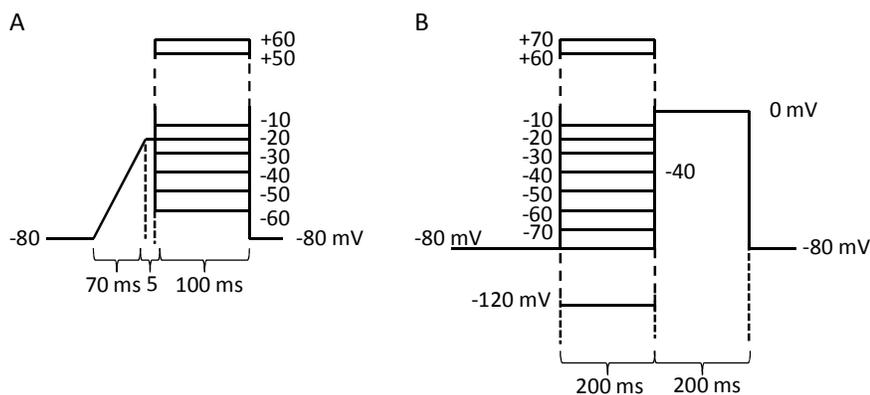


Figura 3.3.4. (A) Protocolo de *voltage-clamp* utilizado para determinação da curva I x V da I_{Ca} . O pré-pulso para -40 mV a partir de V_{hold} foi utilizado para inativar a I_{Na} . (B) Protocolo de *voltage-clamp* utilizado para determinação da curva de inativação em *steady-state* da I_{Ca} .

3.3.4 Corrente transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia de K^+ (I_K)

Para registrar I_{to} e I_K em configuração *whole-cell voltage clamp*, a composição da solução da micropipeta foi (em mM): glutamato de potássio 130; NaCl 7; HEPES 10; EGTA 0,5; pH ajustado para 7,2 a 23°C com KOH. A solução de banho foi composta de (em mM): NaCl 140, KCl 6, CaCl₂ 0,5, MgCl₂ 1,5, HEPES 5, CoCl₂ 3, glicose 11.1 (pH 7,4 ajustado com NaOH). Após a obtenção de registros controles, o protocolo experimental foi repetido após adição de 0,5 mM 4-AP à solução de banho, para bloqueio de I_{to} (Xu *et al.*, 1999). Portanto, realizando-se a subtração do registro com a I_{to} bloqueada daquele considerado controle, era possível obter I_{to} . A I_K foi considerada como a corrente em *steady-state* (i.e., após inativação do componente correspondente a I_{to}) registrada ao final do pulso teste na ausência de 4-AP. Nestes experimentos, a I_{Na} foi inativada por um pré-pulso na forma de rampa para -40 mV a partir de $V_{hold} = -80$ mV, com duração de 70 ms, seguido de um pulso retangular de 5 ms de duração para -40 mV. Além disso, foi utilizada tetracaína a 150 μ M para garantir bloqueio farmacológico da I_{Na} . Para determinar a curva $I \times V$, foi aplicada uma série de degraus de pulsos de tensão para valores-testes de E_m de -80 a +30 mV, a 0,5 Hz. Os pulsos tinham duração de 500 ms, e eram aplicados em incrementos de 10 mV, a partir de $V_{hold} = -80$ mV (Figura 3.3.5).

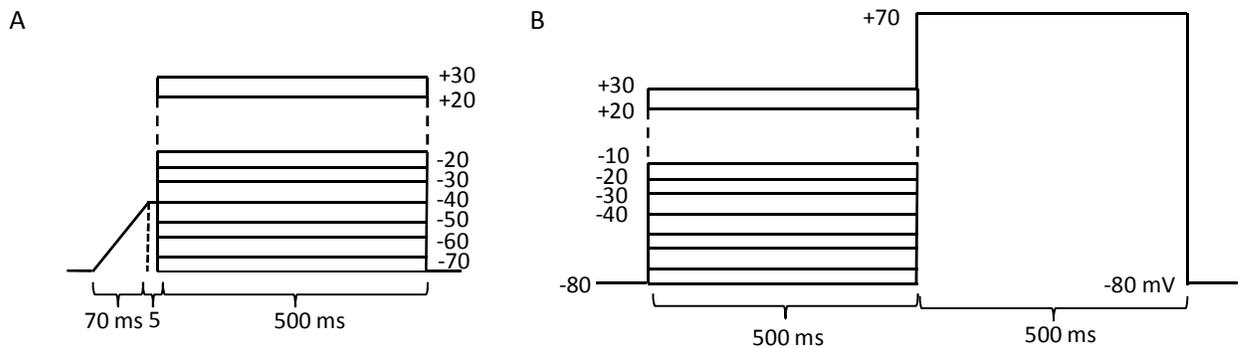


Figura 3.3.5. (A) Protocolo utilizado para determinação das curvas $I \times V$ de I_{to} e I_K . O pré-pulso para -40 mV a partir de V_{hold} foi utilizado para inativar a I_{Na} . Foram feitos registros em solução controle e após adição de 0,5 mM 4-AP à solução de banho. A I_{to} foi obtida como a corrente resultante da subtração do registro de controle daquele obtido após adição de 4-AP. Já a I_K foi obtida a partir da corrente *steady-state* medida em solução controle. (B) Protocolo utilizado para determinação das curvas de inativação de I_{to} e I_K .

- 1) curva de ativação em *steady-state* de I_{to} e I_K :** A partir dos valores de I_{to} e I_K a cada valor de E_m teste, e de valores conhecidos de E_m e dos estimados potenciais de reversão de I_{to} e

I_K , i.e., os valores de E_m para os quais I_K e I_{to} eram iguais a zero, respectivamente, pôde ser calculada a condutância de cada canal, já que $G = I/(E_m - E_{reversão})$ (Hille, 1992). Para cada valor de E_m teste, calculou-se a razão entre G e a máxima condutância (\bar{G}), calculada a partir do pico de corrente, tanto para I_{to} quanto para I_K . As razões calculadas para cada corrente correspondiam aos parâmetros de ativação em *steady-state* (M_∞ , no caso de I_{to} , e X_∞ , no caso de I_K) e as curvas de ativação de cada corrente relacionavam estes parâmetros aos valores de E_m aos quais as correntes eram evocadas. As relações foram descritas pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - X)/K))$, onde $V_{1/2}$ corresponde ao potencial em que a amplitude do parâmetro em *steady-state* corresponde à metade do valor máximo e, K ao coeficiente de inclinação da curva. Y corresponde à amplitude do parâmetro em *steady-state* e X ao valor de E_m correspondente;

- 2) curva de inativação em *steady-state* de I_{to} e I_K :** foram aplicados 12 pulsos de tensão para inativação dos canais, com duração de 500 ms, a partir de V_{hold} (-80 mV) para potenciais testes de -80 mV a +30 mV, em incrementos de 10 mV. Cada pulso inativante foi seguido da aplicação de um pulso teste para +70 mV, de duração de 200 ms, para ativar as correntes I_{to} e I_K (Figura 3.3.5.B). O procedimento foi repetido após adição de 0,5 mM 4-AP à solução de banho. Foi possível então calcular, para cada valor de tensão do pulso inativante, a razão entre a amplitude da corrente disparada pelo pulso teste (em *steady-state* no caso de I_K) e a máxima I_K registrada em toda a família de curvas (i.e., correspondente à tensão do pulso inativante que não causa inativação dos canais). No caso de I_{to} , o registro feito na condição controle foi subtraído daquele com 4-AP e então foi calculada a razão entre o pico da corrente disparada pelo pulso teste e a máxima I_{to} registrada em toda a família de curvas. Estas razões correspondem aos parâmetros de inativação em *steady-state* de I_K (X_i) e de I_{to} (H), e as curvas de inativação são a relação entre estes parâmetros (correspondente ao eixo Y) e os valores de E_m que precediam as correntes evocadas (correspondente ao eixo X). A relação foi descrita pela equação de Boltzmann, dada por $Y = 1 - 1/(1 + \exp((V_{1/2} - X)/K))$, onde $V_{1/2}$ corresponde ao potencial em que a amplitude do parâmetro de inativação em *steady-state* corresponde à metade do valor máximo, e K ao coeficiente de inclinação da curva.

Em todos os registros feitos, foi realizada a correção do potencial de junção líquida e compensação parcial de capacitância e resistência em série, como já descrito no item 3.3.3.

3.4 MODELO MATEMÁTICO

O modelo foi desenvolvido utilizando-se a linguagem de programação Fortran e o compilador Force 2.0.9. O computador utilizado para as simulações foi um iMac Apple™ MB950BZ/A, com Intel® Core 2 Duo de 3.06GHz, 4GB de memória RAM, HD de 500GB.

Todos os valores utilizados para os parâmetros e as respectivas definições, assim como todas as equações do modelo, podem ser vistos nos Apêndices A e B, respectivamente.

A obtenção das equações de I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} e I_K , além de dados relacionados à geometria da célula e concentrações iônicas, serão explicitados no item 4.3, referente aos resultados do modelo matemático.

Foi utilizado como base para o desenvolvimento do modelo matemático de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de rato neonato um modelo publicado em 2008. O modelo em questão é um modelo matemático de PA ventricular de camundongo neonato (Wang e Sobie, 2008), que engloba o equacionamento de 15 correntes iônicas e 6 fluxos intracelulares de Ca^{2+} , e que tem como base o modelo desenvolvido por Bondarenko *et al.* (2004) para miócitos ventriculares de camundongo adulto. No caso do modelo desenvolvido, neste trabalho, de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de ratos neonatos, houve o equacionamento de 12 correntes iônicas e 6 fluxos intracelulares, como mostra a Figura 3.4.1.

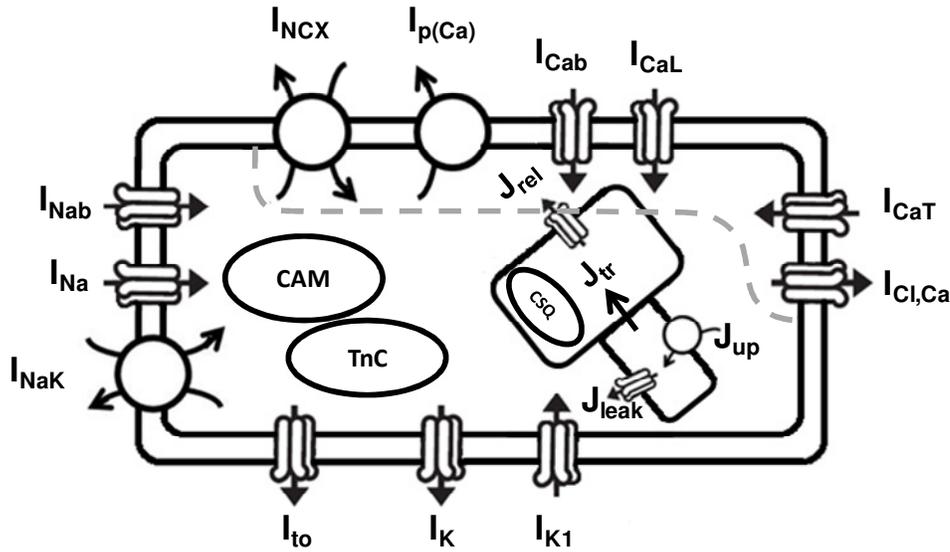


Figura 3.4.1. Diagrama esquemático do modelo de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de rato neonato. Os *buffers* de Ca^{2+} são troponina C (TnC), calmodulina (CAM) e calsequestrina (CSQ). O retículo sarcoplasmático (RS) foi dividido em dois compartimentos: (1) não-juncional, onde ocorrem apenas captação e vazamento de Ca^{2+} , i.e., o compartimento em que há os fluxos de captação de Ca^{2+} pelo RS (J_{up}) e de vazamento de Ca^{2+} do RS (J_{leak}); (2) juncional, onde ocorre apenas liberação de Ca^{2+} , i.e., o compartimento em que há o fluxo de liberação de Ca^{2+} do RS (J_{rel}). Há ainda os fluxos de difusão de Ca^{2+} entre os compartimentos do RS (J_{tr}), de difusão de Ca^{2+} do espaço subsarcolemático (espaço delimitado pela linha tracejada) para o mioplasma (J_{xfer}), e de associação-dissociação de Ca^{2+} dos sítios de ligação de cátions divalentes da troponina C (J_{TnC}). As correntes são: de sódio dependente de tensão (I_{Na}), de sódio de *background* (I_{Nab}), da ATPase de Na^+/K^+ (I_{NaK}), transitente de saída de K^+ (I_{to}), retificadora tardia de K^+ (I_K), retificadora de entrada de K^+ (I_{K1}), de Cl^- ativada por Ca^{2+} ($I_{Cl,Ca}$), de Ca^{2+} tipo T (I_{CaT}), de Ca^{2+} tipo-L (I_{CaL}), de Ca^{2+} de *background* (I_{Cab}), da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($I_{p(Ca)}$) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (I_{NCX}).

O potencial de membrana foi descrito como no modelo de Hodgkin e Huxley (1952), em que a capacitância de membrana é disposta em paralelo com as condutâncias iônicas. A taxa de variação do E_m é, portanto, diretamente proporcional à soma da corrente de estimulação (I_{stim}) com a soma de todas as correntes iônicas (I_{ion}), e inversamente proporcional à C_m (Equação 2).

$$\frac{dE_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} \cdot (I_{stim} + I_{ion}) \quad (2)$$

No caso, para que a estimulação fosse suficiente para evocar o PA, foi utilizado um pulso retangular de corrente com amplitude de 12 pA/pF e duração de 5 ms.

A formulação da I_{Na} também foi a utilizada por Hodgkin e Huxley (1952) (Equação 3), em que $\overline{G_{Na}}$ é a condutância máxima ao íon Na^+ , m e h são os parâmetros de ativação e inativação, respectivamente, e E_{Na} corresponde ao potencial de equilíbrio de Nernst do Na^+ .

$$I_{Na} = \overline{G_{Na}} \cdot m^3 \cdot h \cdot (E_m - E_{Na}), \text{ onde } E_{Na} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln\left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i}\right) \quad (3)$$

Considerando-se um parâmetro de ativação ou inativação genérico w , sabe-se que, durante o decorrer do tempo, o canal passa por transições entre o estado permissivo (aberto, representado por x na Figura 3.4.2) e o não-permissivo (simplificação dos estados fechado e inativado, representado por “1- x ” na Figura 3.4.2). Esta transição ao longo do tempo pode ser descrita pela Equação 4, em que as variáveis α_x e β_x são constantes de taxa de transição do estado não-permissivo para o estado permissivo e do estado permissivo para o não-permissivo, respectivamente (Figura 3.4.2).

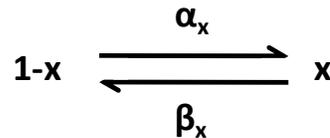


Figura 3.4.2. Transição entre os estados permissivo (correspondente ao estado “1- x ”) e não-permissivo (correspondente ao estado “ x ”) dos canais. As transições são feitas a taxas α_x e β_x (Hille, 1992).

$$\frac{dx}{dt} = \alpha_x \cdot (1-x) - \beta_x \cdot x \quad (4)$$

As taxas de transição, por sua vez, determinam a relação entre o grau de ativação ou inativação de cada canal a cada valor de E_m . Esta relação é descrita pelas curvas de ativação ou inativação em *steady-state*. Portanto, como descrito pela Equação 5, o parâmetro de ativação ou inativação em *steady-state* é uma função das taxas de transição.

$$x_\infty = \frac{\alpha_x}{\alpha_x + \beta_x} \quad (5)$$

É possível então, a partir da estimativa de valores para α_x e β_x , se obter valores de x_∞ em diferentes E_m que possam ser ajustados por uma curva que se aproxime da curva de ativação ou inativação em *steady-state* obtida experimentalmente. A partir dos valores estimados das taxas α_x e β_x , pode ser calculado o parâmetro m pela resolução da equação diferencial representada pela Equação 4 (Ebihara e Johnson, 1980).

Este mesmo procedimento foi utilizado para determinar os parâmetros de ativação e inativação das correntes I_{to} , I_K , I_{CaL} e I_{CaT} .

A corrente transiente de saída de K^+ (I_{to}) apresenta menor densidade e se inativa de maneira mais rápida e com cinética mais simples no caso de miócitos ventriculares de camundongos neonatos, comparado aos adultos (Wang e Duff, 1997). No caso, a I_{to} foi equacionada como no trabalho de Nygren *et al.* (1998) (Equação 6), onde $\overline{G_{to}}$ é a condutância máxima do canal que medeia I_{to} , M e H são os parâmetros de ativação e de inativação em *steady-state*, respectivamente, e E_K é o potencial de equilíbrio do K^+ .

$$I_{to} = \overline{G_{to}} \cdot M \cdot H \cdot (E_m - E_K), \text{ onde } E_K = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right) \quad (6)$$

As curvas de ativação e inativação em *steady-state* foram obtidas experimentalmente (item 3.3.4), e, como explicado acima, o ajuste dos valores das constantes de taxa de transição do estado permissivo para o estado não-permissivo, e vice-versa, permite obter um parâmetro em *steady-state* (Equação 5), cuja curva de ajuste seja similar à obtida experimentalmente. Conseqüentemente, é possível obter o parâmetro de ativação por meio da resolução da Equação 4. Para o caso do parâmetro de inativação em *steady-state* (H), o ajuste é feito de modo que a curva obtida do parâmetro em diversos E_m seja semelhante à curva de inativação em *steady-state* obtida experimentalmente.

De acordo com o trabalho de Luo e Rudy (1994a), I_K pode ser equacionada como abaixo, em que $\overline{G_K}$ é a condutância máxima do canal que medeia I_K , X_i e X são os parâmetros de inativação em *steady-state* e ativação, respectivamente, e E_K é o potencial de equilíbrio do K^+ .

$$I_K = \overline{G_K} \cdot X_i \cdot X^2 \cdot (E_m - E_K) \quad (7)$$

As equações dos parâmetros de ativação e de inativação em *steady-state* são obtidas da mesma maneira que para o caso de I_{to} .

A corrente retificadora de entrada de K^+ (I_{K1} , Equação 8) é função da condutância máxima ($\overline{G_{K1}}$), da concentração extracelular de K^+ ($[K^+]_o$), do E_m e do potencial de equilíbrio do K^+ (E_K) (Di Francesco e Noble, 1985).

$$I_{K1} = \overline{G_{K1}} \cdot \frac{[K^+]_o}{210 + [K^+]_o} \cdot \left(\frac{E_m - E_K}{1 + e^{0,0896 \cdot (E_m - E_K)}} \right) \quad (8)$$

Há evidência de que a densidade de I_{K1} e a G_{K1} sejam menores em células de neonatos que de adultos (Masuda e Sperelakis, 1993; Wahler, 1992). No trabalho de Bondarenko *et al.* (2004),

foi utilizada $\overline{G_{K1}} = 0,2938 \text{ mS}/\mu\text{F}$ para o caso do camundongo adulto, enquanto que, neste trabalho, para que houvesse completa repolarização do E_m durante a fase 4 do PA, foi utilizada uma $\overline{G_{K1}} = 0,18 \text{ mS}/\mu\text{F}$, de acordo com o trabalho de Wahler (1992).

As componentes da I_{Ca} , I_{CaL} (Equação 9) e I_{CaT} (Equação 10), foram equacionadas como nos trabalhos de Luo e Rudy (1994b) e de Puglisi e Bers (2001), respectivamente. Na Equação 9, d é a constante de ativação, f é a de inativação, f_{Ca} é a de inativação Ca^{2+} dependente (Equação 11, em que $K_{m,CaL}$ é a concentração de Ca^{2+} em que a I_{CaL} é a metade da I_{CaL} saturante e E_{CaL} é o potencial de reversão da I_{CaL} . Na Equação 10, b é a constante de ativação, g é a de inativação e E_{CaT} é o potencial de reversão da I_{CaT} .

$$I_{CaL} = \overline{G_{CaL}} \cdot d \cdot f \cdot f_{Ca} \cdot (E_m - E_{CaL}) \quad (9)$$

$$I_{CaT} = \overline{G_{CaT}} \cdot b \cdot g \cdot (E_m - E_{CaT}) \quad (10)$$

$$f_{Ca} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_{m,CaL}} \right)^2} \quad (11)$$

Os parâmetros de ativação e inativação foram obtidos como já descrito anteriormente (Equações 4 e 5).

Estudos mostram que a expressão e a atividade do NCX são maiores em miócitos de neonatos que de adultos (Boerth *et al.*, 1994; Bassani e Bassani, 2002). Além disso, de acordo com o trabalho de Mahony (1996), a densidade de I_{NCX} é no mínimo cerca de 4 vezes maior em células de coelho neonato que de adulto. A equação da I_{NCX} utilizada por Wang e Sobie (2008) foi a Equação 12, em que k_{NCX} é o fator de escalonamento da I_{NCX} , $K_{m,Na}$ é a concentração de Na^+ na qual I_{NCX} é a metade da I_{NCX} máxima, $K_{m,Ca}$ é a concentração de Ca^{2+} na qual a corrente I_{NCX} é a metade da I_{NCX} máxima, k_{sat} é o fator de saturação da I_{NCX} em E_m muito negativos e η é o parâmetro que controla a dependência de tensão da I_{NCX} .

$$I_{NCX} = k_{NCX} \cdot \frac{1}{K_{m,Na}^3 + [Na^+]_o^3} \cdot \frac{1}{K_{m,Ca} + [Ca^{2+}]_o} \cdot \frac{1}{1 + k_{sat} \cdot e^{(\eta-1)E_m \cdot F/RT}} \cdot \left[e^{\eta E_m \cdot F/RT} \cdot [Na^+]_i^3 \cdot [Ca^{2+}]_o - e^{(\eta-1)E_m \cdot F/RT} \cdot [Na^+]_o^3 \cdot [Ca^{2+}]_i \right] \quad (12)$$

No caso, como a densidade de I_{NCX} deve ser maior em neonatos, o fator de escalonamento deve ser maior que o utilizado por Bondarenko e colaboradores (2004) no modelo de PA ventricular de camundongo adulto, que foi igual a 292,8 pA/pF. O utilizado por Wang e Sobie (2008)

para camundongos neonatos foi de 907,68 pA/pF, enquanto que em um modelo de acoplamento excitação-contração de células ventriculares de ratos neonatos foi utilizado o valor de 2268 pA/pF (Korhonen *et al.*, 1999). No presente trabalho, decidiu-se utilizar um valor de $k_{NCX} = 2000$ pA/pF, que resultou em uma densidade de corrente semelhante à obtida no trabalho de Wang e Sobie (2008). Os valores de $K_{m,Na}$ e $K_{m,Ca}$ foram mantidos como no modelo de Wang e Sobie (2008).

A corrente da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($I_{p(Ca)}$) foi equacionada como no modelo de Wang e Sobie (2008), em que $I_{p(Ca)}^{\max}$ é o valor máximo de $I_{p(Ca)}$ e $K_{m,p(Ca)}$ é a concentração de Ca^{2+} na qual a corrente $I_{p(Ca)}$ é a metade da $I_{p(Ca)}$ máxima (Equação 13). Bassani e Bassani (2002) detectaram aumento da atividade da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema em miócitos de neonatos, no entanto, no modelo de Wang e Sobie (2008), foi diminuído significativamente o valor de $I_{p(Ca)}^{\max}$ quando comparado com o utilizado no modelo de Bondarenko *et al.* (2004) para células de adulto. Neste trabalho, o valor utilizado foi de 0,9 pA/pF, valor mais próximo ao utilizado no modelo de adulto de 1,0 pA/pF (Bondarenko *et al.*, 2004).

$$I_{p(Ca)} = I_{p(Ca)}^{\max} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,p(Ca)}^2 + [Ca^{2+}]_i^2} \quad (13)$$

As correntes de *background*, I_{Nab} e I_{Cab} , foram mantidas como no modelo de Wang e Sobie (2008) (Equações 14 e 15, respectivamente), em que G_{Nab} e G_{Cab} são as condutâncias e E_{Na} e E_{CaN} são os potenciais de equilíbrio de Na^+ e de Ca^{2+} , respectivamente.

$$I_{Nab} = G_{Nab} \cdot (E_m - E_{Na}) \quad (14)$$

$$I_{Cab} = G_{Cab} \cdot (E_m - E_{CaN}), \text{ onde } E_{CaN} = \frac{R \cdot T}{2 \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i}\right) \quad (15)$$

A formulação da corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+} ($I_{Cl,Ca}$) foi mantida a mesma do modelo de Wang e Sobie (2008) (Equação 16). Esta equação foi obtida a partir de modificação da que foi apresentada no trabalho de Verkerk *et al.* (2002), com um resultado de simulação semelhante aos resultados experimentais em miócitos ventriculares de coelho neonato apresentados por Wetzel e Klitzner (1996). Na Equação 16, $P_{Cl,Ca}$ corresponde à permeabilidade do canal que medeia $I_{Cl,Ca}$, $[Cl^-]_i$ e $[Cl^-]_o$ são as concentrações intra e extracelular de Cl^- , e $f_{Cl,Ca}$ é uma variável definida na Equação 17, em que $K_{m,Cl}$ é a concentração de Ca^{2+} na qual a $I_{Cl,Ca}$ é metade da $I_{Cl,Ca}$ máxima,

$n_{Cl,Ca}$ é o expoente de Hill da $I_{Cl,Ca}$ e $[Ca^{2+}]_{ss}$ é a concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemático.

$$I_{Cl,Ca} = P_{Cl,Ca} \cdot f_{Cl,Ca} \cdot \left(\frac{E_m \cdot F^2}{R \cdot T} \right) \cdot \left[\frac{[Cl^-]_o \cdot e^{E_m \cdot F/R \cdot T} - [Cl^-]_i}{e^{E_m \cdot F/R \cdot T} - 1} \right] \quad (16)$$

$$f_{Cl,Ca} = \left(\frac{[Ca^{2+}]_{ss}}{K_{m,Cl} + [Ca^{2+}]_{ss}} \right)^{n_{Cl,Ca}} \quad (17)$$

Além disso, a equação da I_{NaK} também foi mantida a mesma do modelo de PA ventricular de camundongo neonato (Wang e Sobie, 2008) (Equação 18), em que I_{NaK}^{\max} é a máxima corrente do ATPase Na^+/K^+ , K_{m,Na_i} é a concentração de Na^+ na qual a corrente I_{NaK} é a metade da I_{NaK} saturante, K_{m,K_o} é a concentração de K^+ na qual a corrente I_{NaK} é a metade da I_{NaK} saturante e f_{NaK} é uma variável definida pela Equação 19.

$$I_{NaK} = I_{NaK}^{\max} \cdot \frac{f_{NaK}}{1 + (K_{m,Na_i}/[Na^+]_i)^{1,5}} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{m,K_o}} \quad (18)$$

$$f_{NaK} = \frac{1}{1 + 0,1245 \cdot e^{-0,1 \cdot E_m \cdot F/R \cdot T} + 1 + 0,0365 \cdot \frac{1}{7} \cdot (e^{[Na^+]_o/67300} - 1) \cdot e^{-E_m \cdot F/R \cdot T}} \quad (19)$$

A regulação de Ca^{2+} intracelular dependeu de 5 fluxos intracelulares de Ca^{2+} . O RS foi dividido funcionalmente em 2 componentes: juncional (RSJ) e não-juncional (RSNJ). O Ca^{2+} seria recaptado para o RSNJ por um fluxo denominado J_{up} (índice *up* do inglês *uptake*), e difundido para o RSJ (J_{tr}), compartimento em que ficam localizados os canais responsáveis pela liberação de Ca^{2+} para o citosol, os RyRs, por meio do fluxo J_{rel} (índice *rel* do inglês *release*). Ainda no RSNJ há um fluxo de vazamento de Ca^{2+} para o citoplasma, denominado J_{leak} . Há ainda o fluxo de Ca^{2+} entre o espaço subsarcolemático, que se localiza próximo aos canais e transportadores de Ca^{2+} , e o mioplasma. As equações relacionadas aos fluxos intracelulares de Ca^{2+} foram mantidas iguais às apresentadas no modelo de PA ventricular de camundongo neonato (Wang e Sobie, 2008).

O fluxo de liberação de Ca^{2+} do RS, J_{rel} (Equação 20), depende de parâmetros de chaveamento dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS, os RyRs, da taxa de liberação de Ca^{2+} pelos RyRs (v_l), e das concentrações de Ca^{2+} no RSJ e no espaço subsarcolemático, $[Ca^{2+}]_{RSJ}$ e $[Ca^{2+}]_{ss}$, respectivamente. Os parâmetros de chaveamento foram descritos como nas Equações 21-25 e na Tabela 3.4.1 podem ser observadas as definições de cada variável.

$$J_{rel} = v_1 (P_{O1} + P_{O2}) P_{RyR} \left([Ca^{2+}]_{RSJ} - [Ca^{2+}]_{ss} \right) \quad (20)$$

$$\frac{dP_{O1}}{dt} = k_a^+ [Ca^{2+}]_{ss}^n P_{C1} - k_a^- P_{O1} - k_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{O1} + k_b^- P_{O2} - k_c^+ P_{O1} + k_c^- P_{C2} \quad (21)$$

$$\frac{dP_{O2}}{dt} = k_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{O1} - k_b^- P_{O2} \quad (22)$$

$$P_{C1} = 1 - (P_{C2} + P_{O1} + P_{O2}) \quad (23)$$

$$\frac{dP_{C2}}{dt} = k_c^+ P_{O1} - k_c^- P_{C2} \quad (24)$$

$$\frac{dP_{RyR}}{dt} = -0,04 P_{RyR} - 0,1 \frac{I_{CaL}}{I_{CaL,max}} e^{-(E_m - 5)^2 / 648} \quad (25)$$

Tabela 3.4.1. Parâmetros de chaveamento dos receptores de rianodina (RyRs).

Parâmetro	Definição
P_{O1}	Fração de RyRs no estado P_{O1}
P_{O2}	Fração de RyRs no estado P_{O2}
P_{C1}	Fração de RyRs no estado P_{C1}
P_{C2}	Fração de RyRs no estado P_{C2}
P_{RyR}	Fator de modulação do RyR
k_a^+	Taxa de transição P_{C1} - P_{O1} do RyR
k_a^-	Taxa de transição P_{O1} - P_{C1} do RyR
k_b^+	Taxa de transição P_{O1} - P_{O2} do RyR
k_b^-	Taxa de transição P_{O2} - P_{O1} do RyR
k_c^+	Taxa de transição P_{O1} - P_{C2} do RyR
k_c^-	Taxa de transição P_{C2} - P_{O1} do RyR
n	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do RyR P_{C1} - P_{O1}
m	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do RyR P_{O1} - P_{O2}

Os demais fluxos foram descritos como nas Equações 26-29, em que $[Ca^{2+}]_{RSNJ}$ é a concentração de Ca^{2+} no RSNJ, τ_{lr} é a constante de tempo para difusão do Ca^{2+} do RSNJ para o RSJ, τ_{xfer} é a constante de tempo para difusão do Ca^{2+} do espaço subsarcolemático para o mioplasma,

v_2 é a taxa de vazamento de Ca^{2+} do RSNJ, v_3 é a velocidade máxima de captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA) e $K_{m,up}$ é a concentração na qual a velocidade de recaptação de Ca^{2+} pela SERCA é metade da máxima.

$$J_{tr} = \frac{[Ca^{2+}]_{RSNJ} - [Ca^{2+}]_{RSJ}}{\tau_{tr}} \quad (26)$$

$$J_{xfer} = \frac{[Ca^{2+}]_{ss} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_{xfer}} \quad (27)$$

$$J_{leak} = v_2 ([Ca^{2+}]_{RSNJ} - [Ca^{2+}]_i) \quad (28)$$

$$J_{up} = v_3 \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,up}^2 + [Ca^{2+}]_i^2} \quad (29)$$

Para definir as concentrações de Ca^{2+} , além dos fluxos intracelulares de Ca^{2+} , também é necessário considerar os *buffers* de Ca^{2+} . Há 3 *buffers*: no RSJ há a presença da proteína calsequestrina (CSQ), e no citoplasma ainda há mais dois *buffers* de Ca^{2+} , denominados calmodulina (CAM) e troponina C (TnC) (Figura 3.4.1).

As frações de Ca^{2+} armazenadas em cada compartimento (meio intracelular, espaço subsarcolemático e RSJ) são dadas pelas Equações 30-32, em que $[CAM]_{tot}$ é a concentração total de CAM no citoplasma, $[CSQ]_{tot}$ é a concentração total de CSQ no RSJ, K_m^{CAM} é a concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da CAM é metade da máxima e K_m^{CSQ} é a concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da CSQ é metade da máxima.

$$B_i = \left\{ 1 + \frac{[CAM]_{tot} K_m^{CAM}}{(K_m^{CAM} + [Ca^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \quad (30)$$

$$B_{ss} = \left\{ 1 + \frac{[CAM]_{tot} K_m^{CAM}}{(K_m^{CAM} + [Ca^{2+}]_{ss})^2} \right\}^{-1} \quad (31)$$

$$B_{RSJ} = \left\{ 1 + \frac{[CSQ]_{tot} K_m^{CSQ}}{(K_m^{CSQ} + [Ca^{2+}]_{RSJ})^2} \right\}^{-1} \quad (32)$$

Além disso, há o fluxo referente à difusão de Ca^{2+} entre o mioplasma e a TnC, que é dada por uma variação de acordo com a quantidade de íons Ca^{2+} que se associam e se dissociam dos sítios de ligação, dado pela Equação 33. A $[LTnCCa]$ é a $[Ca^{2+}]$ associada aos sítios de ligação de

baixa afinidade presentes na TnC, enquanto que $[HTnCCa]$ é a $[Ca^{2+}]$ associada aos sítios de ligação de alta afinidade presentes na TnC. Estas concentrações são dadas pelas Equações 34 e 35, em que k_{hTnC}^+ é a constante de associação aparente de Ca^{2+} aos sítios de alta afinidade da TnC, k_{hTnC}^- é a constante de dissociação aparente de Ca^{2+} dos sítios de alta afinidade da TnC, k_{lTnC}^+ é a constante de associação aparente de Ca^{2+} aos sítios de baixa afinidade da TnC, k_{lTnC}^- é a constante de dissociação aparente de Ca^{2+} dos sítios de baixa afinidade da TnC, e $[HTnC]_{tot}$ e $[LTnC]_{tot}$ são as concentrações totais no mioplasma dos sítios de alta e baixa afinidade da TnC, respectivamente.

$$J_{trpn} = \frac{d[LTnCCa]}{dt} + \frac{d[HTnCCa]}{dt} \quad (33)$$

$$\frac{d[LTnCCa]}{dt} = k_{lTnC}^+ [Ca^{2+}]_i ([LTnC]_{tot} - [LTnCCa]) - k_{lTnC}^- [LTnCCa] \quad (34)$$

$$\frac{d[HTnCCa]}{dt} = k_{hTnC}^+ [Ca^{2+}]_i ([HTnC]_{tot} - [HTnCCa]) - k_{hTnC}^- [HTnCCa] \quad (35)$$

As concentrações de Ca^{2+} podem ser então definidas como nas Equações 36-39.

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = B_i (J_{leak} + J_{xfer} - J_{up} - J_{trpn}) \quad (36)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{ss}}{dt} = B_{ss} \left\{ J_{rel} \frac{V_{RSJ}}{V_{ss}} - J_{xfer} \frac{V_{myo}}{V_{ss}} - (I_{CaL} + I_{Cab} - 2I_{NaCa} + I_{p(Ca)} + I_{CaT}) \frac{A_s C_m}{2V_{ss} F} \right\} \quad (37)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{RSJ}}{dt} = B_{RSJ} (J_{xfer} - J_{rel}) \quad (38)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{RSNJ}}{dt} = (J_{up} - J_{leak}) \frac{V_{myo}}{V_{RSNJ}} - J_{tr} \frac{V_{RSJ}}{V_{RSNJ}} \quad (39)$$

As concentrações intracelulares de Na^+ e de K^+ , por sua vez, são dadas pelas Equações 40 e 41, respectivamente.

$$\frac{d[Na^+]_i}{dt} = -(I_{Na} + I_{Nab} + 3 \cdot I_{NCX} + 3 \cdot I_{NaK}) \cdot \frac{A_s C_m}{V_{mio} \cdot F} \quad (40)$$

$$\frac{d[K^+]_i}{dt} = -(I_{to} + I_K + I_{K1} - 2 \cdot I_{NaK}) \cdot \frac{A_s C_m}{V_{mio} \cdot F} \quad (41)$$

Em todas as equações, F é a constante de Faraday (96,5 C/mmol), T é a temperatura absoluta (298 K), R é a constante universal dos gases (8,314 Jmol⁻¹K⁻¹), C_m é a capacitância específica da membrana (1μF/cm²) e A_s é a área de superfície da célula.

No total, o modelo desenvolvido apresentou 23 variáveis de estado, ou seja, 23 equações diferenciais acopladas que precisavam ser integradas para obter a solução do E_m , e conseqüentemente, o PA. O método de integração utilizado foi o Runge-Kutta de 4ª ordem (Parker e Chua, 1989) devido à simplicidade de implementação e por ser um método largamente empregado, inclusive na função de integração do Matlab denominada *ode45*.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) ou como intervalo de confiança de 95%. Comparações foram feitas utilizando o teste t de Student para amostras pareadas ou não pareadas, ou análise de variância bifatorial seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo).

4 RESULTADOS

4.1 MEDIÇÃO DA $[Na^+]_i$

Como foi utilizado um ionóforo que permite a passagem de íons Na^+ pela membrana, poderia haver também queda progressiva da intensidade do sinal de fluorescência, tanto por desbotamento, quanto por efluxo do indicador (Meier *et al.*, 2006). O curso temporal desta queda foi determinado em 12 miócitos de ratos adultos por meio do registro do sinal após adição de gramicidina. A queda relativa da emissão do indicador em função do tempo pôde ser ajustada com uma função monoexponencial ($y = 0,7896 \cdot e^{-0,0077 \cdot x} + 0,1835$, $r^2 = 0,85$), com constante de tempo de ~130 min (Figura 4.1.1), a qual foi utilizada para posterior correção dos valores medidos do sinal de fluorescência em diferentes tempos. Em média, os experimentos duravam no total 40 min, sendo necessários 25 min para o processo de calibração após a adição da gramicidina.

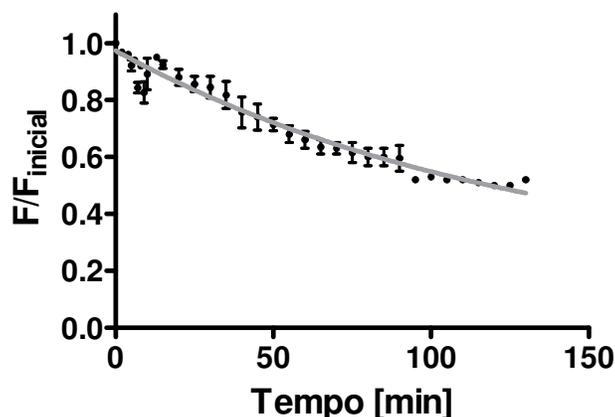


Figura 4.1.1. Queda da emissão do indicador CoroNa Green após a permeabilização com gramicidina (10 μM), determinada em 12 miócitos de ratos adultos. F_{inicial} é a amplitude do sinal de fluorescência 2 min depois da adição da gramicidina e F é a emissão medida em diferentes tempos. O ajuste aos pontos foi feito com uma função exponencial simples ($r^2 = 0,853$).

Após a obtenção dessa curva, foi possível realizar a calibração do indicador e estimativa da $[Na^+]_i$. Na Figura 4.1.2.A, é possível observar um exemplo dos registros já corrigidos pelas curvas de desbotamento e perda do indicador. Na Figura 4.1.2.B encontra-se a curva de calibração construída a partir dos valores obtidos nos intervalos 5, 6 e 7 da Figura 4.1.2.A, correspon-

dentados às $[Na^+]_i$ iguais a 0, ~9 e ~36 mM. Os pontos foram ajustados linearmente (Figura 4.1.2.B) e, a partir da equação da reta, foi calculada a $[Na^+]_i$ da célula em repouso e em estimulação, cujas amplitudes do sinal de fluorescência correspondiam aos valores dos intervalos 2 e 3 da Figura 4.1.2.A.

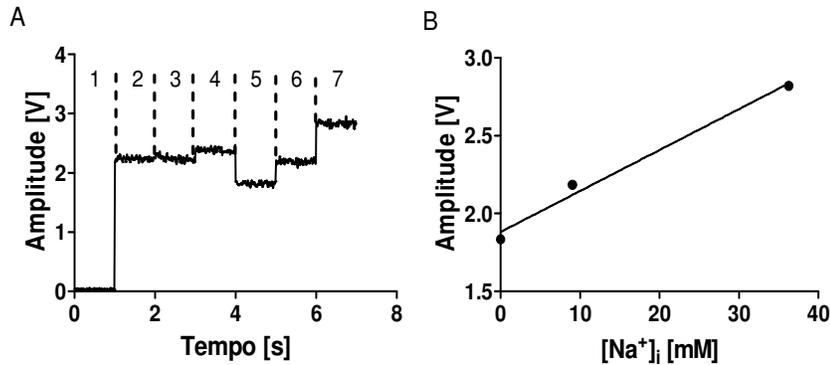


Figura 4.1.2. (A) Exemplo de registro realizado durante experimento com uma célula ventricular de rato adulto, com os valores de emissão do indicador (expressos como amplitude do sinal registrado pelo fotodetector) corrigidos pelo desbotamento e perda de indicador pós-permeabilização com gramicidina. Na figura, somente foi mostrado 1 s de cada registro para melhor visualização: 1: fluorescência de fundo; 2: célula em repouso; 3: após 5 min de estimulação elétrica a 0,5 Hz; 4: a célula foi exposta a 100 μ M de ouabaína em $[Na^+]_o = 0$ mM; 5: mesma solução contendo 10 μ M de gramicidina; 6 e 7: a solução de banho continha $[Na^+]_o = 9,06$ mM e 36,25 mM, respectivamente, assim como ouabaína e gramicidina; (B) Curva de calibração, feita a partir das amplitudes do sinal de fluorescência quando a $[Na^+]_i$ era zero, 9,06 e 36,25 mM (intervalos 5, 6 e 7 da Figura 3.1.2.A, respectivamente). Foi feito um ajuste linear da curva (coeficiente linear: $1,882 \pm 0,065$ V; coeficiente angular: $0,026 \pm 0,003$ V/mM; $r^2 = 0,987$).

Para analisar os dados de $[Na^+]_i$ em miócitos de ratos neonatos e adultos foi realizada análise de variância bifatorial, em que foram considerados como fatores idade (neonato x adulto) e atividade (repouso x estimulação elétrica). Foi observada diferença significativa com relação à idade ($p < 0,0001$), com maiores valores no conjunto do neonato, e à atividade ($p < 0,01$, i.e., maior $[Na^+]_i$ após estimulação). No entanto, foi observada interação significativa entre os fatores ($p < 0,02$), que indica que a resposta de $[Na^+]_i$ à estimulação dependeu da idade, tendo sido mais acentuada em células de neonatos. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que a estimulação elétrica causou aumento significativo da $[Na^+]_i$ apenas em células de neonatos ($p < 0,001$), enquanto os valores em repouso não foram estatisticamente diferentes entre as idades (adulto: $14,46 \pm 1,65$ mM versus $11,87 \pm 1,75$ mM em repouso, $N=8$; neonato: $33,40 \pm 4,62$ versus $18,03 \pm 1,80$ mM em repouso, $N=4$; $p < 0,001$) (Figura 4.1.3).

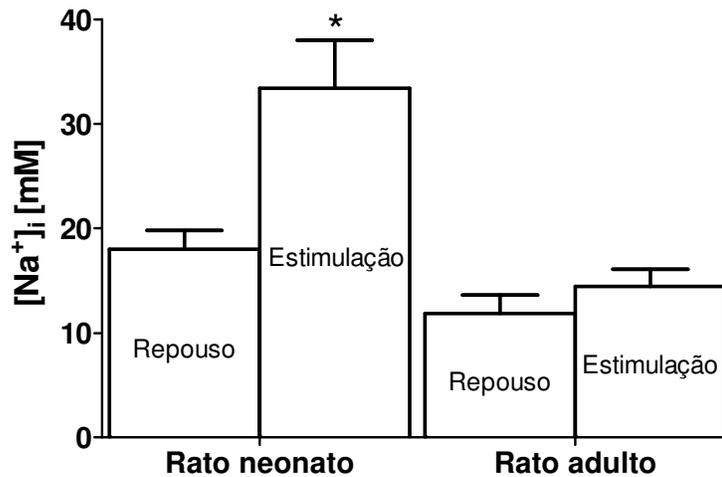


Figura 4.1.3. Valores médios e respectivos erros-padrões de $[Na^+]_i$ em miócitos ventriculares isolados de ratos neonatos e adultos durante repouso e estimulação elétrica a 0,5 Hz por 5 min (* $p < 0,001$, repouso vs. estimulação elétrica, teste *post-hoc* de Bonferroni, $N = 4$ e 8 em neonatos e adultos, respectivamente).

O aumento acentuado da $[Na^+]_i$ dependente da atividade em células de neonatos poderia ser devido a um maior influxo de Na^+ pelos canais de Na^+ presentes no sarcolema (maior densidade de I_{Na} em neonatos; vide item 4.2.2), pelo NCX (operando em modo de efluxo de Ca^{2+}) e/ou pelo trocador Na^+/H^+ , ou ainda devido a um menor efluxo de Na^+ pela ATPase Na^+/K^+ (Bers *et al.*, 2003). Inicialmente, buscou-se explorar a última possibilidade, investigando como os valores de $[Na^+]_i$ eram afetados pela inibição desta ATPase com 100 μM ouabaína. Porém, este experimento não se mostrou viável devido à alta sensibilidade das células de ratos neonatos à ouabaína (células desenvolviam contratura e morriam). Portanto, decidiu-se investigar se o NCX tinha influência no acúmulo intracelular de Na^+ . Foram então feitos experimentos apenas em células de neonatos com adição de apenas 100 μM $CdCl_2$, ou de 5 mM $NiCl_2$ + 100 μM $CdCl_2$ à solução de Tyrode modificada (0,5 mM $CaCl_2$ e 0,5 mM $MgCl_2$) para inibição do NCX e bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo-L por $NiCl_2$ e $CdCl_2$, respectivamente. Desse modo, como não haveria entrada de Ca^{2+} pelos canais, não haveria transiente de Ca^{2+} , sem o qual não haveria aumento do efluxo de Ca^{2+} pelo NCX e, conseqüentemente, influxo de Na^+ por esta via durante a estimulação elétrica. A adição suplementar de $NiCl_2$ foi feita como precaução, para inibir um possível influxo de Na^+ não associado a transientes de Ca^{2+} . Os dados foram comparados por análise de variância bifatorial para amostras pareadas, considerando como fatores o tratamento (controle, $CdCl_2$ ou $CdCl_2$ + $NiCl_2$) e a atividade (repouso ou estimulação). Foi observada influência significativa do

tratamento e da estimulação ($p < 0,001$). Além disso, houve interação significativa entre os fatores ($p < 0,02$), o que indica que a resposta de $[Na^+]_i$ à estimulação dependeu do tratamento. O teste *post-hoc* de Bonferroni indicou diferença significativa entre os valores de $[Na^+]_i$ após a estimulação elétrica, mas não em repouso (controle: $33,40 \pm 4,62$ versus $18,03 \pm 1,80$ mM em repouso, $N = 4$; $CdCl_2$: $18,25 \pm 0,78$ versus $15,79 \pm 1,99$ mM em repouso, $N = 4$; $NiCl_2 + CdCl_2$: $17,01 \pm 0,98$ versus $15,29 \pm 1,27$ mM em repouso, $N = 4$; $p < 0,001$). Além disso, houve diferença significativa entre as médias antes e depois da estimulação apenas no grupo controle ($p < 0,01$). Portanto, após o bloqueio da corrente de Ca^{2+} , (Cd^{2+} na Figura 4.1.4), com ou sem inibição simultânea do NCX ($Ni^{2+} + Cd^{2+}$ na Figura 4.1.4), houve supressão significativa do acúmulo intracelular de Na^+ induzido pela atividade cíclica. Além disso, os experimentos realizados utilizando-se somente o bloqueador dos canais de Ca^{2+} tipo-L (Cd^{2+}) foram importantes para concluir que o influxo de Na^+ pelo NCX independentemente da geração de transientes de Ca^{2+} não parece ser apreciável, já que o aumento de $[Na^+]_i$ após atividade cíclica foi fortemente atenuado no caso em que somente a I_{CaL} foi bloqueada. Portanto, os resultados indicam que o influxo de Na^+ acoplado à remoção de Ca^{2+} do citosol pelo NCX durante o transiente de Ca^{2+} é o principal mecanismo que causa a acumulação de Na^+ dependente de atividade em cardiomiócitos de neonatos.

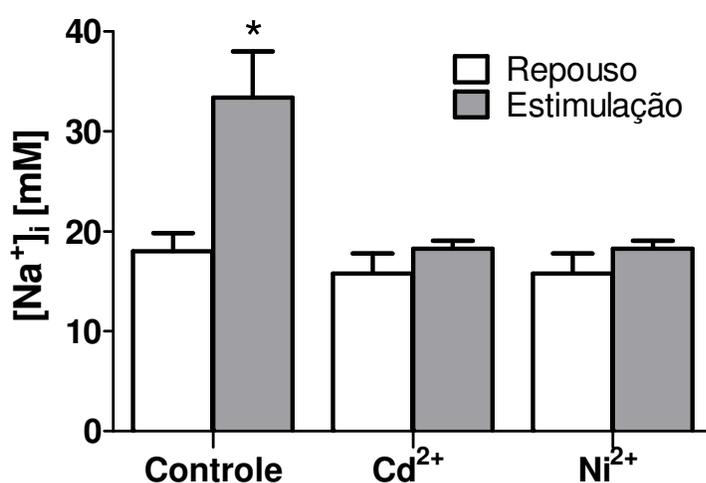


Figura 4.1.4. Comparação entre os valores médios de $[Na^+]_i$ em miócitos ventriculares de ratos neonatos durante repouso e estimulação elétrica a 0,5 Hz em três situações: (1) controle, ou seja, quando a célula era perfundida por solução de *Tyrode*; (2) com os canais de Ca^{2+} tipo-L bloqueados (na figura indicado por Cd^{2+}) por meio da adição de 100 μM $CdCl_2$ à solução de *Tyrode* modificada (i.e., com 0,5 mM $CaCl_2$ e 0,5 mM $MgCl_2$), e com o NCX inibido pela adição de 5 mM $NiCl_2$ além da adição de 100 μM $CdCl_2$ à solução de *Tyrode* modificada (na figura indicado por $Ni^{2+} + Cd^{2+}$) (* $p < 0,01$, repouso vs. estimulação elétrica, teste *post-hoc* de Bonferroni, $N = 4$ para todos os casos).

4.2 ELETROFISIOLOGIA

4.2.1 Potencial de ação (PA)

Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os valores de C_m , que foram menores em miócitos de ratos neonatos ($16,43 \pm 1,18$ pF, $N = 33$) do que em adultos ($158,90 \pm 9,64$ pF, $N = 30$).

A Figura 4.2.1 mostra registros típicos de PA em miócitos de ratos neonatos e adultos. Não foi detectada diferença significativa entre idades no valor de E_m diastólico (neonato: $-76,24 \pm 3,87$ mV, $N = 9$; adulto: $-79,80 \pm 1,32$ mV, $N = 12$; $p = 0,41$), nem no valor de pico (neonato: $26,90 \pm 5,31$ mV, $N = 9$; adulto: $30,98 \pm 3,17$ mV, $N = 12$; $p = 0,50$). No entanto, é possível observar pela Figura 4.2.1 que a duração do PA de miócitos de ratos neonatos é maior que de células de adultos. Os dados médios mostrados na Figura 4.2.2 mostram que houve diferença significativa para todos os parâmetros de duração calculados: t_{0mV} (neonato: $35,81 \pm 7,87$ ms, $N = 9$; adulto: $16,78 \pm 3,93$ ms, $N = 12$; $p = 0,031$), APD30 (neonato: $74,62 \pm 13,34$ ms, $N = 9$; adulto: $27,73 \pm 5,21$ ms, $N = 12$; $p = 0,008$), APD50 (neonato: $108,41 \pm 21,07$ ms, $N = 9$; adulto: $37,13 \pm 6,11$ ms, $N = 12$; $p = 0,01$) e APD90 (neonato: $220,50 \pm 36,17$ ms, $N = 9$; adulto: $71,18 \pm 8,98$ ms, $N = 12$; $p = 0,004$).

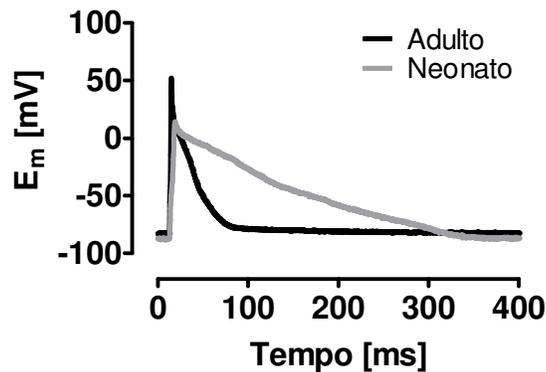


Figura 4.2.1. Potenciais de ação registrados em miócitos ventriculares de rato adulto (preto) e de rato neonato (cinza).

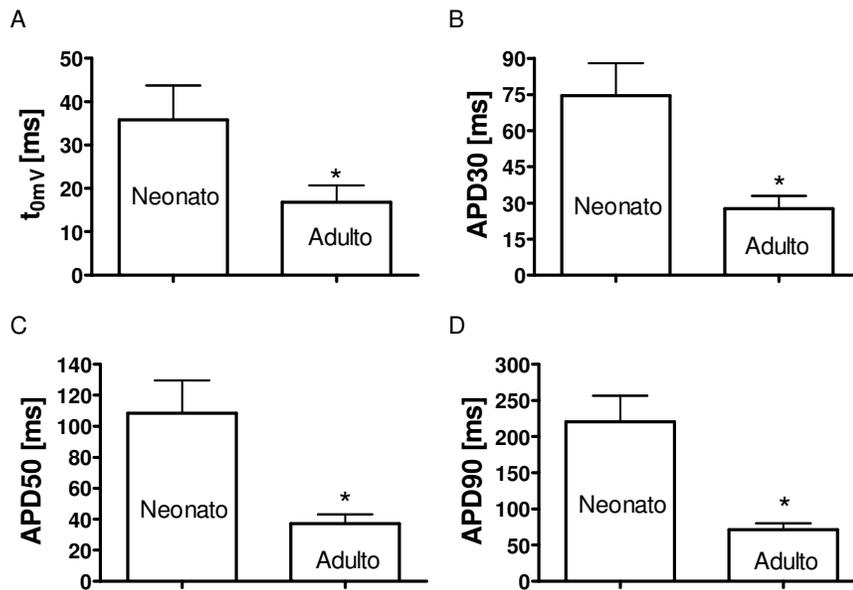


Figura 4.2.2. Parâmetros de duração de potencial de ação (PA) de miócitos ventriculares de ratos neonatos (N=9) e adultos (N=12): t_{0mV} foi calculado a partir do pico do PA até o potencial de membrana (E_m) alcançar o valor de 0 mV; APD30, APD50 e APD90 foram os tempos calculados a partir do disparo do PA até o E_m alcançar o valor de 30, 50 e 90% do potencial de repouso (* $p < 0,05$, teste t de Student).

Ainda a partir dos registros de PA foi possível determinar a variação mínima do E_m para que o limiar fosse atingido (ΔE_{limiar}), e a taxa de despolarização máxima ($dV/dt_{\text{máx}}$) (Figuras 4.2.3.A e 4.2.3.C, respectivamente). Como o PA foi disparado por um protocolo de estimulação em que a corrente era gradualmente aumentada, foi possível determinar também a densidade de I_{limiar} (Figura 4.2.3.B). Houve diferença significativa entre ΔE_{limiar} em miócitos de ratos neonatos e adultos (neonato: $29,33 \pm 3,94$ mV, N= 9; adulto: $17,01 \pm 2,79$ mV, N= 10; $p = 0,02$) (Figura 4.2.3.A), embora o valor do potencial diastólico não varie com a idade (neonato: $-76,24 \pm 3,87$ mV, N= 9; adulto: $-79,80 \pm 1,32$ mV, N= 12; $p = 0,41$). Como ΔE_{limiar} é a diferença entre E_{limiar} e o potencial diastólico, E_{limiar} foi menos negativo em miócitos de ratos neonatos (neonato: $-46,91 \pm 3,79$ mV, N= 9; adulto: $-63,13 \pm 3,65$ mV, N= 10; $p = 0,001$). A maior despolarização necessária para que o PA fosse evocado em miócitos de ratos neonatos poderia explicar a necessidade de maior densidade de I_{limiar} ($17,43 \pm 3,78$ pA/pF, N= 9 vs. $5,80 \pm 0,42$ pA/pF em adultos, N= 10; $p = 0,04$) (Figura 4.2.3.B). Ainda foi observado que $dV/dt_{\text{máx}}$ foi significativamente menor em neonatos: $41,94 \pm 3,46$ V/s, N= 9 vs. $115,00 \pm 19,69$ mV/ms em adultos, N=12; $p = 0,004$. Este parâmetro está relacionado à fase zero do PA (Figura 1.1), devida principalmente à ativação da I_{Na} . Por-

tanto, diferenças na I_{Na} durante o desenvolvimento poderiam explicar a diferença encontrada na taxa de despolarização do PA.

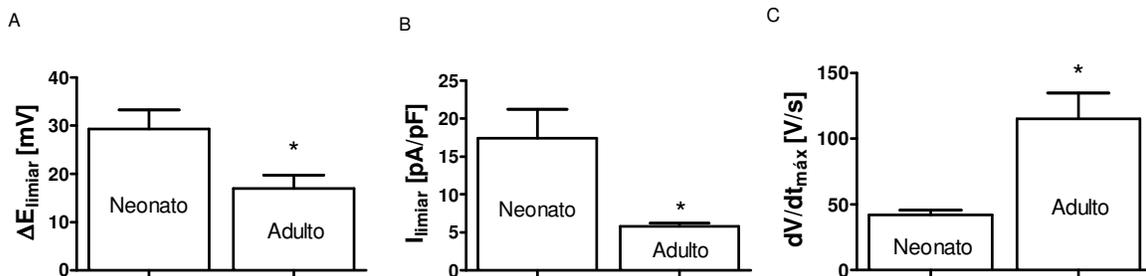


Figura 4.2.3. (A) Variação mínima do potencial de membrana para que o limiar fosse atingido (ΔE_{limiar}); (B) densidade de corrente de estimulação necessária para que o PA fosse disparado (I_{limiar}); (C) taxa de despolarização máxima da membrana durante a fase 0 do potencial de ação ($dV/dt_{máx}$). * $p < 0,05$, teste t de Student.

4.2.2 Corrente de Na^+ (I_{Na})

A análise de variância bifatorial das curvas $I \times V$ (Figura 4.2.4) indicou diferença significativa entre idades e E_m teste, além de interação entre estes fatores, tanto para I_{Na} absoluta (Figura 4.2.4.A), quanto para a densidade de I_{Na} (Figura 4.2.4.B) ($p < 0,0001$). Não houve diferença dependente da idade com relação aos potenciais de reversão da I_{Na} ($25,55 \pm 2,86$ mV, $N = 14$ e $32,73 \pm 3,80$ mV, $N = 9$ para neonatos e adultos, respectivamente, $p = 0,14$). Embora a I_{Na} absoluta de pico tenha sido menor em neonatos ($-968,4 \pm 117,2$ pA, $N = 14$; vs $-5178,0 \pm 494,1$ pA, $N = 9$ em adultos; $p < 0,0001$) (Figura 4.2.4.A), a densidade de pico da corrente foi maior nos primeiros (neonato: $-73,29 \pm 6,26$ pA/pF, $N = 14$; adulto: $-42,93 \pm 7,83$, $N = 9$; $p = 0,0066$) (Figura 4.2.4.B). Além disso, pode-se observar na Figura 4.2.4 que houve um desvio de 10 mV do E_m em que ocorre o pico da I_{Na} , que se deu em E_m menos negativo em neonatos do que em adultos. Isto poderia indicar diferenças na relação entre ativação dos canais e E_m .

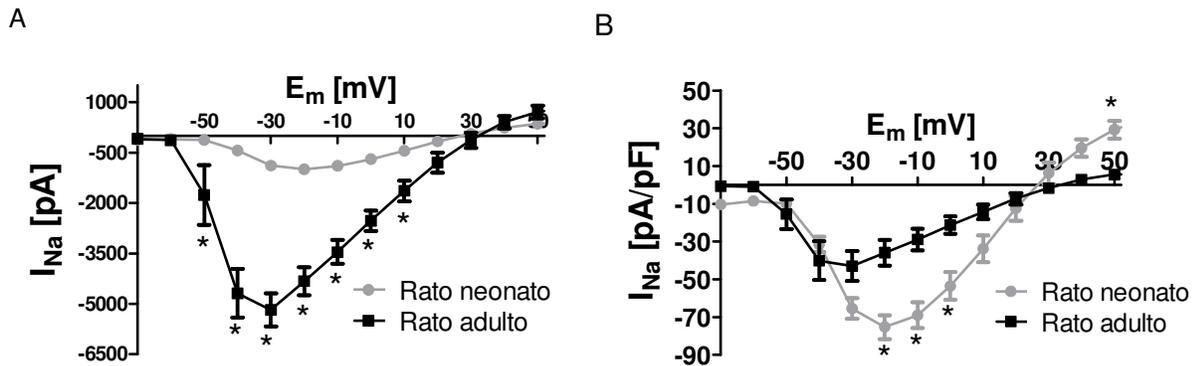


Figura 4.2.4. Curvas corrente-tensão da corrente de sódio (I_{Na}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, $N=14$) e adultos (preto, $N=9$). * $p < 0,05$ vs. adulto (teste de Bonferroni).

As curvas de ativação e inativação, que correspondem à relação entre os valores dos parâmetros de ativação e inativação em *steady-state* (m_{∞} e h_{∞} , respectivamente) e E_m , estão apresentadas na Figura 4.2.5 (curva de ativação: $N=14$ e 9 para miócitos de ratos neonatos e adultos, respectivamente; curva de inativação: $N=12$ e 9 para miócitos de ratos neonatos e adultos, respectivamente). Os parâmetros das curvas individuais estão apresentados na Tabela 4.2.1.

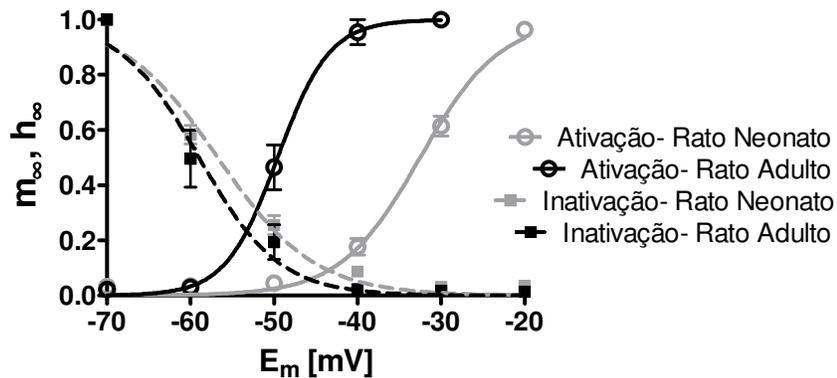


Figura 4.2.5. Curvas médias de inativação e ativação em *steady-state* calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente de sódio e tensão determinada em 12 (inativação) e em 14 (ativação) miócitos ventriculares de ratos neonatos ($r^2=0,90$ e $0,88$, respectivamente) e de 9 miócitos de ratos adultos ($r^2=0,91$ e $0,94$, respectivamente).

Tabela 4.2.1. Parâmetros das curvas de ativação e inativação em *steady-state* obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K). A comparação das médias foi realizada com o teste *t* de Student, para o qual os valores de *p* estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).

	Inativação		Ativação	
	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]
Neonato	$-58,18 \pm 0,56$ (N= 12)	$4,21 \pm 0,36$ (N= 12)	$-34,90 \pm 1,19$ * (N= 14)	$5,00 \pm 0,39$ * (N= 14)
Adulto	$-56,40 \pm 1,34$ (N= 9)	$3,63 \pm 0,67$ (N= 9)	$-46,53 \pm 1,69$ (N= 9)	$1,77 \pm 0,43$ (N= 9)
Valor de <i>p</i>	0,249	0,427	< 0,0001	< 0,0001

Como já havia sido comentado, o desvio do pico da I_{Na} em 10 mV para a direita no caso dos miócitos de neonatos poderia ser resultado de diferenças da dependência de E_m com relação à ativação dos canais de Na^+ , o que foi de fato observado. Houve deslocamento da curva de ativação à direita, de modo que o $V_{1/2}$ (E_m em que metade dos canais de Na^+ estão ativados) foi ~12 mV menos negativo em células de neonatos (Tabela 4.2.1). Também foi observada diferença com relação à inclinação das curvas de ativação, que foi ~3 vezes maior nestas células (Tabela 4.2.1). A maior inclinação também contribuiria para a necessidade de maior despolarização para a ativação de uma dada fração dos canais. Não foi observada diferença significativa com relação às curvas de inativação de neonatos e de adultos.

4.2.3 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})

A análise de variância revelou influência significativa de E_m e da idade sobre o valor de pico de I_{Ca} , tanto para a corrente absoluta, quanto para a densidade de corrente ($p < 0,02$, Figura 4.2.6). No caso da corrente absoluta, também ocorreu interação significativa entre esses fatores ($p < 0,001$). Apesar de não ter sido detectada interação entre E_m e idade para a densidade de corrente ($p = 0,34$), foi possível observar maior densidade da I_{Ca} em neonatos em valores de E_m mais negativos que -20 mV ($p = 0,0013$). Esta diferença possivelmente foi responsável pela influência significativa da idade, detectada na análise de variância, uma vez que, em valores de E_m correspondentes à ativação de I_{CaL} , houve considerável semelhança entre os valores observados em a-

dultos e neonatos. Esse componente de I_{Ca} provavelmente corresponde à corrente mediada por canais de Ca^{2+} do tipo-T (I_{CaT}), que apresenta pico em $E_m = -30$ mV, com densidade de ~ 2 pA/pF em células ventriculares de ratos neonatos (Leuranguer *et al.*, 2000), valores próximos aos obtidos neste trabalho. Essa corrente não é significativa em miócitos ventriculares de roedores adultos (Leuranguer *et al.*, 2000).

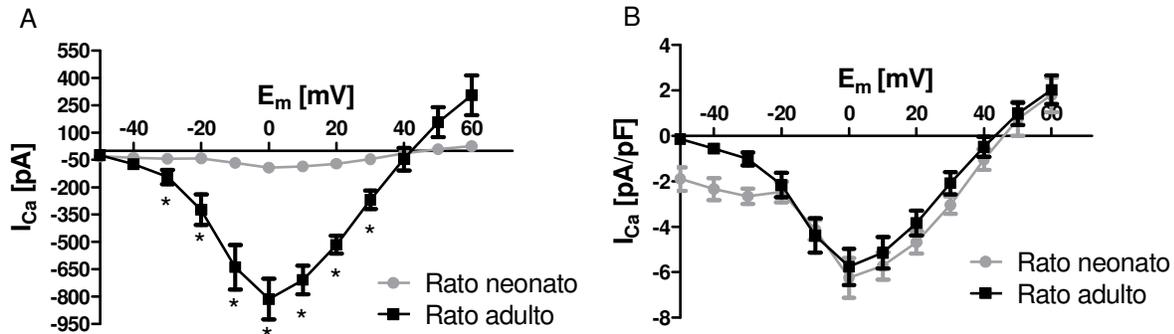


Figura 4.2.6. Curvas corrente-tensão da corrente de cálcio (I_{Ca}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 11) e adultos (preto, N= 6). * $p < 0,001$ vs. adulto (teste *post-hoc* de Bonferroni).

Não foi observada diferença significativa entre os parâmetros de ativação e inativação em *steady-state* da I_{Ca} (d_{∞} , f_{∞}) em cardiomiócitos de ratos neonatos e adultos (Figura 4.2.7), mas I_{Ca} apresentou inativação mais lenta em células de ratos neonatos (constante de tempo de inativação na Tabela 4.2.2).

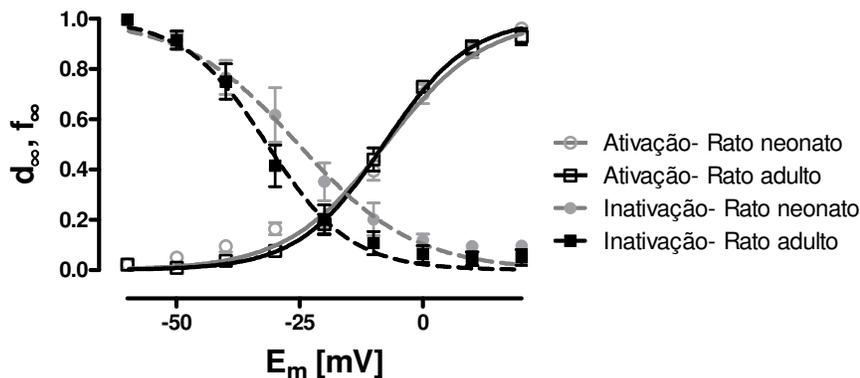


Figura 4.2.7. Curvas médias de ativação (d_{∞}) e de inativação (f_{∞} , linha tracejada) em *steady-state* calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente de cálcio e tensão determinada em 11 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, $r^2 = 0,839$) e em 8 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, $r^2 = 0,922$) nos casos das curvas de ativação, e em 6 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, $r^2 = 0,893$) em 6 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, $r^2 = 0,927$) no caso da curva de inativação.

Tabela 4.2.2. Parâmetros das curvas de ativação e inativação em *steady-state* obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K) e constante de tempo de inativação obtida por uma função exponencial (constante de tempo τ). A comparação das médias foi realizada com o teste *t* de Student, para o qual os valores de *p* estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).

	Ativação		Inativação		Constante de tempo de inativação
	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	τ [ms]
Neonato	$-7,37 \pm 1,61$ (N= 11)	$9,86 \pm 0,42$ (N= 11)	$-25,63 \pm 3,82$ (N= 6)	$9,31 \pm 0,88$ (N= 6)	$40,65 \pm 2,08$ *
Adulto	$-8,00 \pm 1,15$ (N= 8)	$8,73 \pm 0,79$ (N= 8)	$-30,39 \pm 3,26$ (N= 6)	$9,16 \pm 2,74$ (N= 6)	$31,30 \pm 3,48$ (N= 8)
Valor de <i>p</i>	0,772	0,090	0,366	0,961	0,027

4.2.4 Corrente transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_K) de K^+

Nas Figuras 4.2.8.A e 4.2.9.A, é possível observar os valores de pico das correntes absolutas I_{to} e I_K em miócitos ventriculares de ratos neonatos e adultos. Nos dois casos, houve influência significativa de idade e E_m sobre o valor de pico da corrente, além de ter sido observada interação significativa entre os fatores ($p < 0,0001$). Resultados semelhantes foram observados quando o valor da corrente foi normalizado pela capacitância da membrana (densidade de corrente, Figuras 4.2.8.B e 4.2.9.B). Este resultado confirma a hipótese de que a maior duração do PA em miócitos de animais neonatos está associada à menor densidade das correntes responsáveis pela repolarização da membrana.

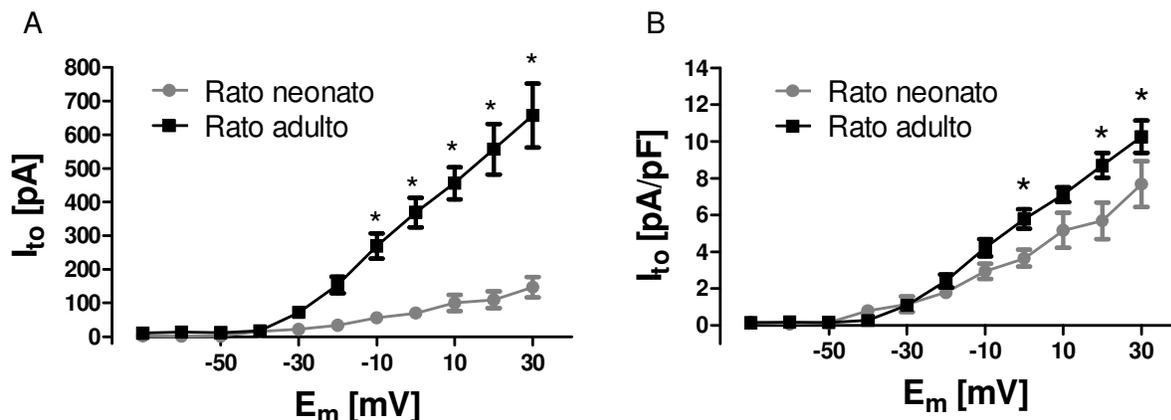


Figura 4.2.8. Curvas corrente-tensão da corrente transiente de saída de K^+ (I_{to}), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 4) e adultos (preto, N= 5). * $p < 0,05$ vs. adulto (teste *post-hoc* de Bonferroni).

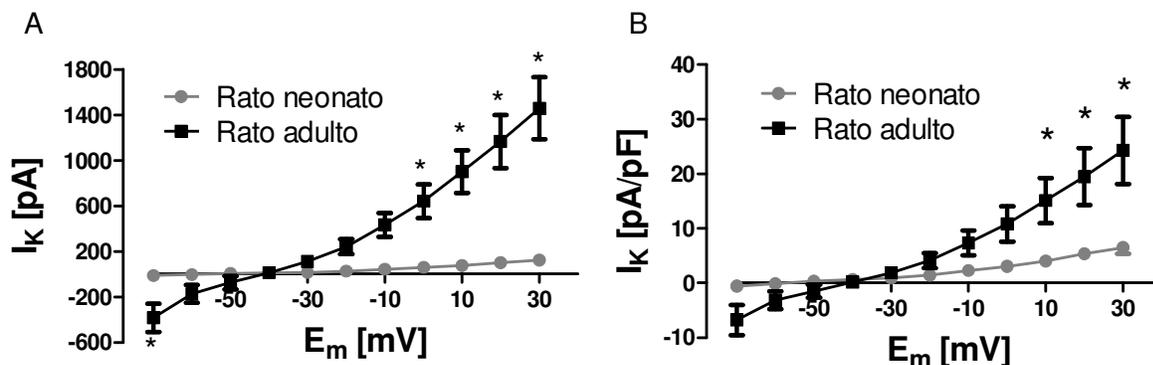


Figura 4.2.9. Curvas corrente-tensão da corrente retificadora tardia de K^+ (I_K), em valores absolutos (A) e em densidade de corrente (B), em miócitos de ratos neonatos (cinza, N= 5) e adultos (preto, N= 6). * $p < 0,05$ vs. adulto (teste *post-hoc* de Bonferroni).

As curvas de ativação e inativação em *steady-state* da I_{to} (M_∞ e H , respectivamente, Figura 4.2.10.A) e da I_K (X_∞ e X_i , respectivamente, Figura 4.2.10.B) não apresentaram diferenças significativas, exceto pelo fator de inclinação da curva de ativação de I_K , como mostra a Tabela 4.2.3. O fator de inclinação é maior em neonatos, o que indicou que a ativação dos canais que medeiam I_K ocorreu durante uma faixa maior de E_m que em adultos.

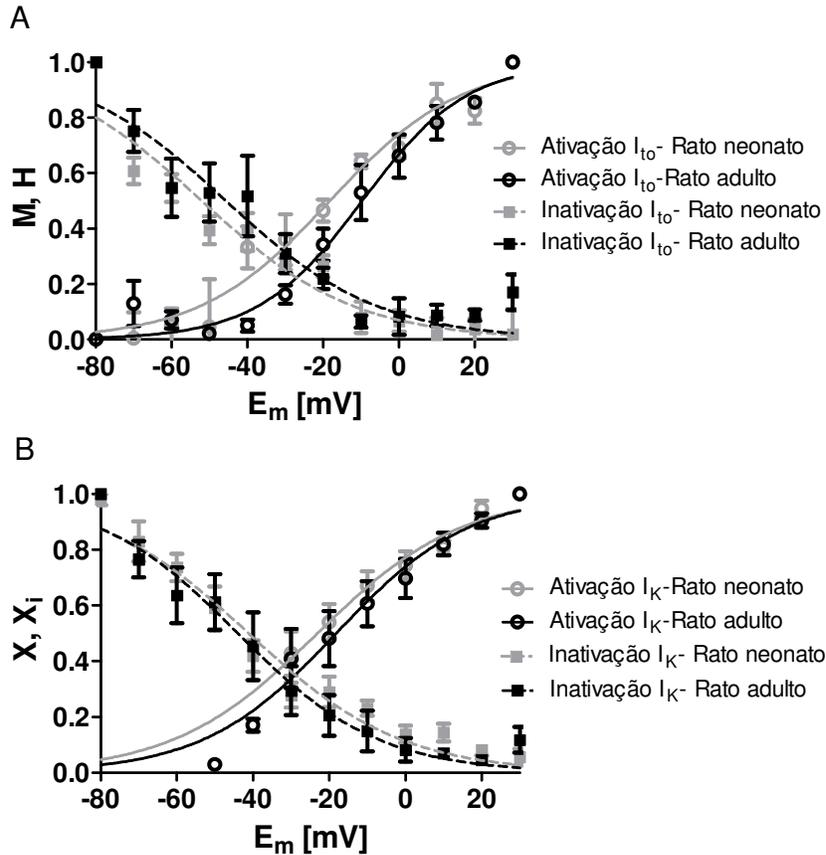


Figura 4.2.10. (A) Curvas médias de ativação (M_∞) e de inativação (H , linha tracejada) em *steady-state* calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente transiente de saída de K^+ e tensão determinada em 4 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, $r^2=0,839$) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, $r^2=0,842$) nos casos das curvas de ativação, e em 5 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, $r^2=0,832$) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, $r^2=0,773$) no caso da curva de inativação. (B) Curvas médias de ativação (X_∞) e de inativação (X_i , linha tracejada) em *steady-state* calculadas por ajuste da função sigmóide de Boltzmann aos pontos obtidos a partir da relação da corrente retificadora tardia de K^+ e tensão determinada em 5 miócitos ventriculares de ratos neonatos (linha cheia de cor cinza, $r^2=0,774$) e em 6 miócitos de ratos adultos (linha cheia de cor preta, $r^2=0,741$) nos casos das curvas de ativação, e em 6 miócitos de ratos neonatos (linha tracejada de cor cinza, $r^2=0,861$) e em 5 miócitos de ratos adultos (linha tracejada de cor preta, $r^2=0,793$) no caso da curva de inativação.

Tabela 4.2.3. Parâmetros das curvas de ativação e inativação em *steady-state* das correntes transiente de saída (I_{to}) e retificadora tardia (I_K) de K^+ , obtidos pelo ajuste com a equação de Boltzmann (parâmetros $V_{1/2}$ e K). A comparação das médias foi realizada com o teste t de Student, para o qual os valores de p estão apresentados na última linha da tabela (* indica diferença significativa entre os parâmetros calculados comparados aos em miócitos de ratos adultos).

	Ativação- I_{to}		Inativação- I_{to}		Ativação- I_K		Inativação- I_K	
	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]	$V_{1/2}$ [mV]	K [mV]
Neonato	-19,35± 1,92 (N= 4)	18,85± 4,63 (N= 4)	-51,83± 3,37 (N= 5)	18,95± 1,12 (N= 5)	-24,47± 4,63 (N= 5)	19,19± 1,48 * (N= 5)	-41,31± 2,37 (N= 6)	19,69± 2,88 (N= 6)
Adulto	-9,18± 3,67 (N= 5)	12,21± 1,47 (N= 5)	-46,24± 5,82 (N= 4)	18,70± 4,72 (N= 4)	-21,52± 4,99 (N= 5)	14,65± 1,05 (N= 5)	-43,26± 5,90 (N= 5)	15,27± 3,98 (N= 5)
Valor de p	0,06	0,17	0,41	0,96	0,65	< 0,05	0,75	0,38

4.3 MODELO MATEMÁTICO

4.3.1 Geometria da célula

Durante os registros eletrofisiológicos, foram realizadas medidas de tamanho da célula. Os miócitos ventriculares de ratos neonatos apresentaram $24,00 \pm 1,08 \mu\text{m}$ de comprimento e $16,00 \pm 0,66 \mu\text{m}$ de diâmetro (N= 20). Foram utilizados os valores médios de comprimento e diâmetro e considerou-se o formato cilíndrico como o formato das células, o que resultou em um volume total $V_T = 4,825 \text{ pl}$. O volume total da célula foi dividido em quatro compartimentos, mantendo a proporção apresentada no trabalho de Wang e Sobie (2008): mioplasma e núcleo ($V_{mio} = 71,33\%$ do V_T), retículo sarcoplasmático não-juncional ($V_{RSNJ} = 6,56\%$ do V_T), retículo sarcoplasmático juncional ($V_{RSJ} = 0,0375\%$ do V_T) e espaço subsarcolemático ($V_{ss} = 0,96\%$ do V_T) (Tabela 4.3.1). O restante foi destinado ao volume ocupado pelas mitocôndrias.

Tabela 4.3.1. Áreas e volumes calculados.

Parâmetro	Definição	Valor
A_s	Área de superfície do cilindro	$1,60849 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$
V_{mio}	Volume do mioplasma	$3,44167 \cdot 10^{-6} \mu\text{l}$
V_{RSJ}	Volume do retículo sarcoplasmático juncional	$0,18094 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$
V_{RSNJ}	Volume do retículo sarcoplasmático não-juncional	$0,31652 \cdot 10^{-6} \mu\text{l}$
V_{ss}	Volume do espaço subsarcolemático	$4,632 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$

4.3.2 Concentrações iônicas

Nos experimentos realizados, a solução externa que se assemelha à composição do meio extracelular é a de *Tyrode*, a partir da qual foram determinadas as concentrações iônicas extracelulares (Tabela 4.3.2). A $[\text{Na}^+]_i$ em miócitos quiescentes de ratos neonatos foi determinada neste trabalho (item 3.1) e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica foi considerada igual a $0,14 \mu\text{M}$ com base em um trabalho de Bassani e Bassani (2002). Tanto a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSJ}}$ quanto a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSNJ}}$ foram calculadas a partir do estudo publicado por Bassani et al. (2012). As demais concentrações iônicas intracelulares foram mantidas iguais às do trabalho de Wang e Sobie (2008).

Tabela 4.3.2. Concentrações iônicas.

Parâmetro	Definição	Valor (μM)
$[\text{K}^+]_o$	Concentração extracelular de K^+	$6 \cdot 10^3$
$[\text{Na}^+]_o$	Concentração extracelular de Na^+	$14 \cdot 10^4$
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	Concentração extracelular de Ca^{2+}	$1 \cdot 10^3$
$[\text{Cl}^-]_o$	Concentração extracelular de Cl^-	$149 \cdot 10^3$
$[\text{Na}^+]_i$	Concentração intracelular de Na^+	$163 \cdot 10^2$
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração intracelular de Ca^{2+}	0,14
$[\text{K}^+]_i$	Concentração intracelular de K^+	$1,3645 \cdot 10^5$
$[\text{Cl}^-]_i$	Concentração intracelular de Cl^-	$3 \cdot 10^4$
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ss}}$	Concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemático	$1867 \cdot 10^{-4}$
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSJ}}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático juncional	$7425417 \cdot 10^{-4}$
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RSNJ}}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático não-juncional	$7423063 \cdot 10^{-4}$

4.3.3 Corrente de Na⁺ (I_{Na})

A I_{Na} foi determinada experimentalmente neste trabalho (item 3.2.2). No caso, a I_{Na} é dependente dos parâmetros da Equação 3. Como já descrito no item 3.4, o parâmetro de ativação (m) foi calculado utilizando-se a curva de ativação em *steady-state* como base (Figura 4.2.5), já que a curva descreve a dependência de tensão do parâmetro de ativação em *steady-state* (m_∞). Sabe-se que o parâmetro em *steady-state* é representado pela Equação 42, em que α_m e β_m são constantes de taxa de transição do estado não-permissivo para o estado permissivo e do estado permissivo para o não-permissivo, respectivamente.

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} \quad (42)$$

Portanto, valores para α_m e β_m puderam ser estimados tal que os valores de m_∞ em diferentes E_m pudessem ser ajustados por uma curva que se aproximasse da curva de ativação obtida experimentalmente, já mostrada na Figura 4.2.5. A partir dos valores estimados das taxas α_m e β_m , o parâmetro m pôde ser obtido pela resolução da equação diferencial representada pela Equação 43. As Equações 44 e 45 representam os ajustes obtidos para α_m e β_m , respectivamente, como pode ser observado na Figura 4.3.1.

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1 - m) - \beta_m \cdot m \quad (43)$$

$$\alpha_m = \frac{0,35 \cdot (E_m + 50,13)}{1 - e^{-0,1(E_m + 50,13)}} \quad (44)$$

$$\beta_m = 0,07 \cdot e^{-E_m/7,9} \quad (45)$$

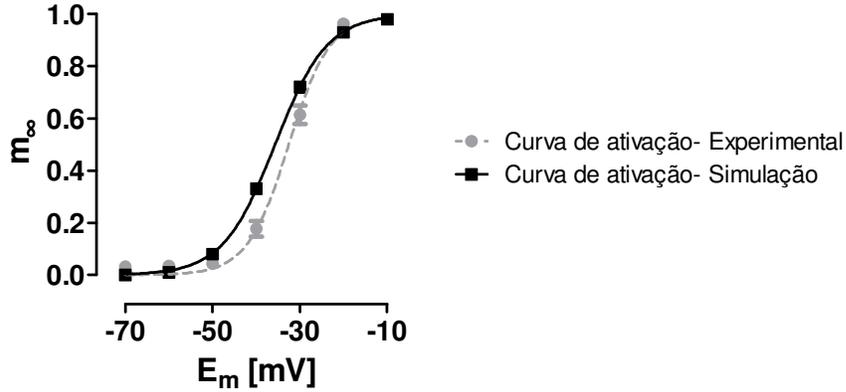


Figura 4.3.1. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em *steady-state* (m_{∞}), a partir das Equações 44 e 45, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

O parâmetro de inativação em *steady-state* (h_{∞}) foi calculado como na Equação 46, em que α_h e β_h são constantes de taxa de transição do estado não-permissivo para o estado permissivo e vice-versa, respectivamente.

$$h_{\infty} = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h} \quad (46)$$

A partir de mudanças nos valores das taxas α_h e β_h foi possível obter valores de h_{∞} em diferentes E_m . Estas alterações foram feitas de forma que os pontos obtidos pudessem ser ajustados por uma curva que fosse semelhante à obtida experimentalmente (Figura 4.2.5). Para que o ajuste numérico de h_{∞} se aproximasse da curva experimental como na Figura 4.3.2, os parâmetros α_h e β_h foram ajustados separadamente para diferentes faixas de potencial: como na Equação 47 para $E_m \geq -40$ mV, e como na Equação 48 para $E_m < -40$ mV.

$$\alpha_h = 0 \text{ e } \beta_h = \frac{1}{0,9 \cdot (1 + e^{-(E_m + 10,66)/11,1})} \quad (47)$$

$$\alpha_h = 1,8 \cdot e^{-(E_m + 80)/6,8} \text{ e } \beta_h = 4 \cdot e^{0,079 \cdot E_m} + 310000 \cdot e^{0,35 \cdot E_m} \quad (48)$$

Como no caso do parâmetro de ativação m , o parâmetro de inativação h foi obtido a partir da resolução da equação diferencial apresentada na Equação 49.

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h \quad (49)$$

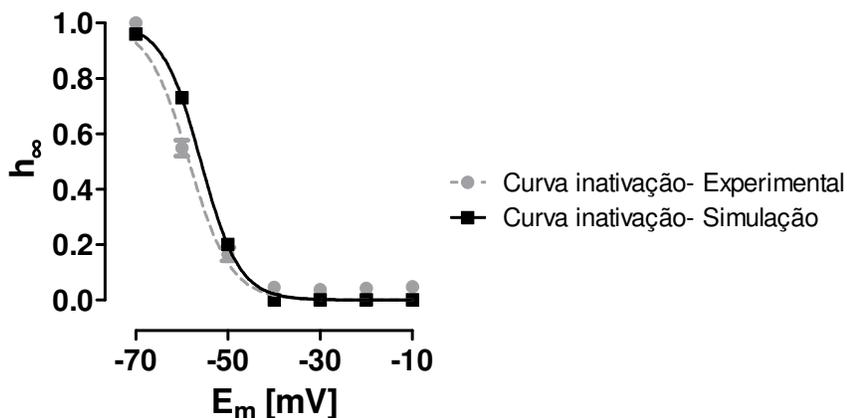


Figura 4.3.2. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em *steady-state* (h_∞), a partir das equações 47 e 48, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

A $\overline{G_{Na}}$ utilizada foi de 2 mS/ μ F, valor aproximado do obtido experimentalmente ($1,66 \pm 0,19$ mS/ μ F, N= 11), o que resultou em uma densidade de corrente semelhante à encontrada experimentalmente (Figura 4.3.3).

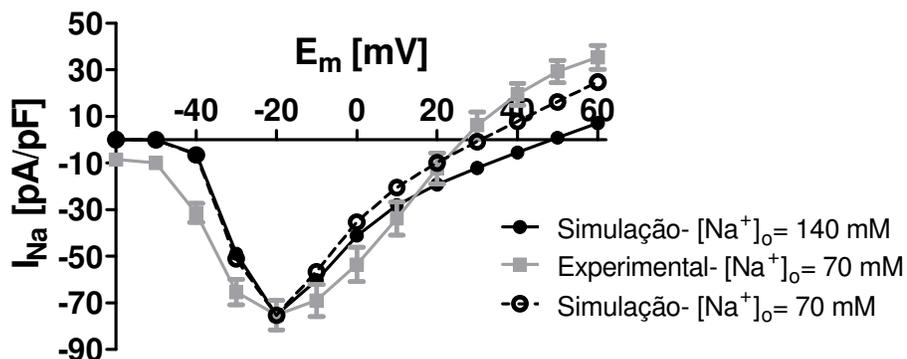


Figura 4.3.3. Curvas corrente-tensão da corrente de Na^+ (I_{Na}) em unidade de densidade de corrente. A diferença entre a curva obtida experimentalmente (em cinza) e por simulação (em preto) não foi significativa ($p > 0,05$). O potencial de reversão diferiu bastante do encontrado experimentalmente devido à diferente $[Na^+]_o$ utilizada na simulação (140 x 70 mM). Quando a $[Na^+]_o = 70$ mM foi utilizada, o potencial de reversão ficou menos positivo e mais próximo do experimental.

4.3.4 Corrente retificadora tardia de K^+ (I_K)

Foram medidas experimentalmente I_K e I_{to} , cujos resultados foram apresentados no item 4.2.4.

No caso de I_K , foram realizadas modificações na equação de X_i (Luo e Rudy, 1994) para que os valores desse parâmetro em cada E_m se aproximassem dos valores obtidos experimentalmente (Figura 4.2.10.B). Assim, com a Equação 50 foi possível obter a aproximação dos valores experimentais apresentada na Figura 4.3.4.

$$X_i = 1,5 / (1 + e^{(E_m + 60)/32,1}) \quad (50)$$

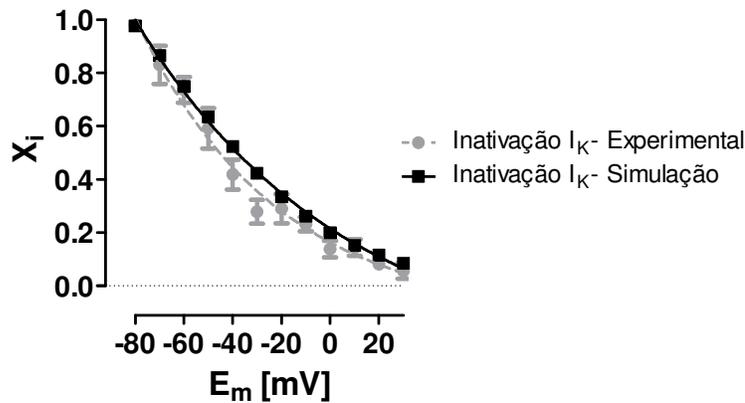


Figura 4.3.4. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em *steady-state* (X_i) a partir da Equação 50 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

Já o procedimento para obtenção da equação do parâmetro de ativação (X) de I_K foi similar ao descrito no item 3.4. Sabe-se que

$$X_\infty = \frac{\alpha_x}{\alpha_x + \beta_x} \quad (51)$$

Portanto, foram realizadas alterações nos valores das taxas α_x e β_x para que a curva de ajuste dos pontos fosse semelhante à curva de ativação em *steady-state* obtida experimentalmente (Figura 4.2.10.B). O melhor ajuste (Figura 4.3.5) foi obtido com as Equações 52 e 53 para as taxas α_x e β_x , respectivamente.

$$\alpha_x = 0,0002 \cdot \frac{E_m + 22}{1 - e^{-0,148(E_m + 22)}} \quad (52)$$

$$\beta_x = 0,000131 \cdot \frac{E_m + 22}{-1 + e^{0,0687 \cdot (E_m + 22)}} \quad (53)$$

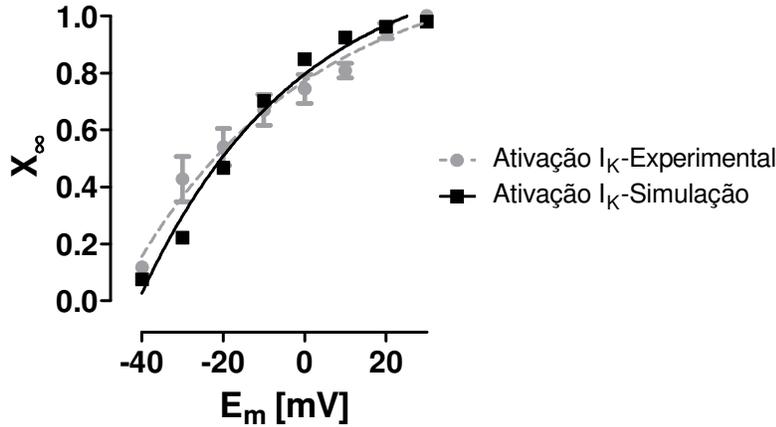


Figura 4.3.5. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em *steady-state* (X_∞) a partir das Equações 52 e 53 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

O parâmetro de ativação X foi obtido então a partir da resolução da equação diferencial apresentada na Equação 54.

$$\frac{dX}{dt} = \alpha_x \cdot (1 - X) - \beta_x \cdot X \quad (54)$$

A $\overline{G_K}$ utilizada foi de 0,0854 mS/ μ F, valor de acordo com o calculado a partir dos experimentos ($\overline{G_K} = 0,072 \pm 0,020$ mS/ μ F, N= 5).

4.3.5 Corrente transiente de saída de K^+ (I_{t0})

De acordo com o trabalho de Nygren *et al.* (1998), a I_{t0} pode ser descrita como na Equação 7 do item 3.4. Foram realizadas modificações na equação de H para que os valores desse parâmetro em cada E_m se aproximassem dos valores obtidos experimentalmente (Figura 4.2.10.A), o que foi obtido com a Equação 55, como pode ser observado na Figura 4.3.6.

$$H = 2,1 / (1 + e^{(E_m + 85)/30}) \quad (55)$$

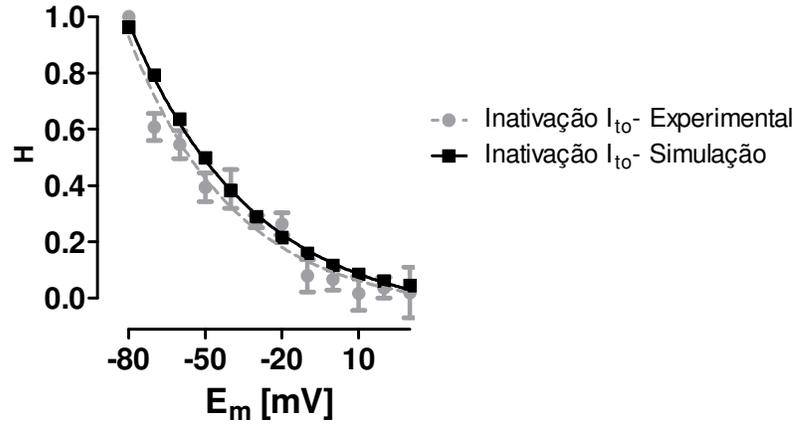


Figura 4.3.6. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em *steady-state* (H) a partir da equação 55 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

O procedimento para obtenção da equação do parâmetro de ativação (M) de I_{t0} foi realizado a partir de alterações nos valores das taxas α_M e β_M , já que o parâmetro em *steady-state* é dado por

$$M_{\infty} = \frac{\alpha_M}{\alpha_M + \beta_M} \quad (56)$$

Portanto, foram realizadas alterações nos valores das taxas α_M e β_M para que a curva de ajuste aos pontos se assemelhe à curva de ativação em *steady-state* obtida experimentalmente (Figura 4.2.10.A). As taxas α_M e β_M foram equacionadas como abaixo para que o ajuste dos pontos fosse o apresentado na Figura 4.3.7.

$$\alpha_M = \frac{8}{1 - e^{-(E_m - 47)/20}} \quad (57)$$

$$\beta_M = \frac{2,7}{1 + e^{(E_m + 85)/29,5}} \quad (58)$$

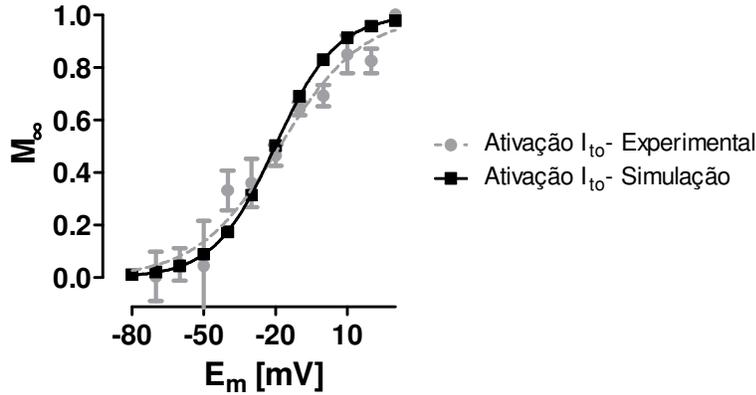


Figura 4.3.7. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em *steady-state* (X_{∞}) a partir das Equações 57 e 58 e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

O parâmetro de ativação M foi obtido então a partir da resolução da equação diferencial apresentada na Equação 59.

$$\frac{dM}{dt} = \alpha_M \cdot (1 - M) - \beta_M \cdot M \quad (59)$$

A $\overline{G_{to}}$ utilizada foi de 0,0682 mS/ μ F, valor de acordo com o calculado a partir dos experimentos ($\overline{G_{to}} = 0,075 \pm 0,014$ mS/ μ F, N= 4).

4.3.6 Corrente de Ca^{2+} (I_{Ca})

Nos registros eletrofisiológicos foram observadas duas componentes de I_{Ca} , a gerada pelo influxo de íons pelo canal tipo-L e outra pelo canal tipo-T. Portanto, foi realizada uma divisão da I_{Ca} de acordo com a faixa de E_m em que cada uma das duas é mais significativa. No caso, a I_{CaT} (Equação 10) é mais significativa que a I_{CaL} em potenciais mais negativos ou igual a -20 mV, enquanto que a I_{CaL} (Equação 9) é predominante em potenciais menos negativos que -20 mV (Figura 4.2.6.B).

As constantes de ativação foram obtidas a partir do ajuste das taxas de transição entre os estados permissivo e não-permissivo, assim como foi explicado no item 3.4. As taxas referentes à

curva de ativação de I_{CaT} foram modificadas como nas Equações 60 e 61, enquanto que as Equações 62 e 63 são as taxas referentes à curva de ativação de I_{CaL} .

$$\alpha_b = \frac{e^{(E_m-8)/22}}{15,5 + e^{(E_m-8)/22}} \quad (60)$$

$$\beta_b = \frac{1}{15,5 + 0,1 \cdot e^{(E_m-8)/22}} \quad (61)$$

$$\alpha_d = \frac{0,08 \cdot (E_m + 9)}{1 - e^{-(E_m+9)/8,24}} \quad (62)$$

$$\beta_d = \frac{0,035 \cdot (E_m + 9) \cdot e^{-(E_m+9)/8,24}}{1 - e^{-(E_m+9)/8,24}} \quad (63)$$

Os parâmetros de ativação em *steady-state* da I_{CaT} (b_∞) e da I_{CaL} (d_∞) são dados pelas Equações 64 e 65, respectivamente.

$$b_\infty = \frac{\alpha_b}{\alpha_b + \beta_b} \quad (64)$$

$$d_\infty = \frac{\alpha_d}{\alpha_d + \beta_d} \quad (65)$$

A curva de ajuste dos pontos para cada E_m ficou semelhante à obtida experimentalmente (Figura 4.3.8).

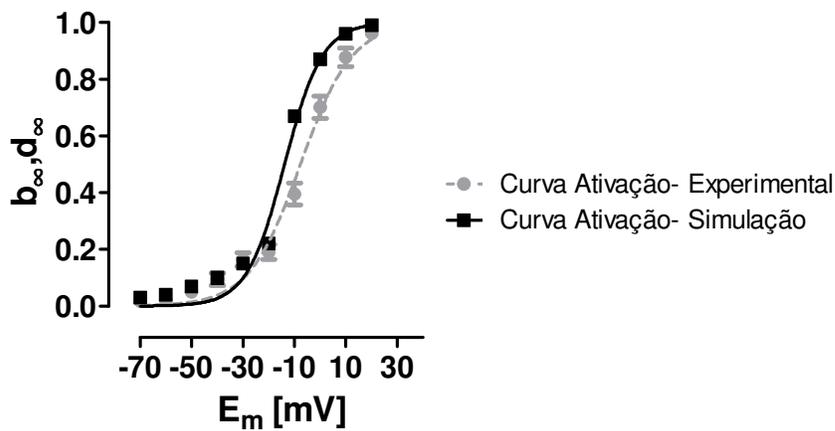


Figura 4.3.8. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de ativação em *steady-state* da I_{CaT} (b_∞ , para $E_m \leq -20$ mV) e da I_{CaL} (d_∞ , para $E_m > -20$ mV) e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

A partir das taxas de transição, foi possível obter então os parâmetros de ativação de I_{CaT} (Equação 66) e de I_{CaL} (Equação 67), por meio de resolução das equações diferenciais.

$$\frac{db}{dt} = \alpha_b \cdot (1 - b) - \beta_b \cdot b \quad (66)$$

$$\frac{dd}{dt} = \alpha_d \cdot (1 - d) - \beta_d \cdot d \quad (67)$$

A constante de inativação da I_{CaL} (f) também foi obtida a partir do ajuste das taxas de transição entre os estados permissivo e não-permissivo. As Equações 68 e 69 indicam o ajuste final para que a curva de inativação em *steady-state* se aproximasse da obtida experimentalmente para $E_m > -20$ mV (Figura 4.3.9).

$$\alpha_f = \frac{0,001 + e^{(2 \cdot E_m)/60}}{\left(5 + e^{(E_m + 30,06)/20,6}\right) \cdot \left(0,001 + e^{(2 \cdot E_m)/60}\right)} \quad (68)$$

$$\beta_f = \frac{0,6 \cdot \left(5 + e^{(E_m + 30,06)/20,6}\right)}{\left(5 + e^{(E_m + 30,06)/20,6}\right) \cdot \left(0,001 + e^{(2 \cdot E_m)/60}\right)} \quad (69)$$

A partir da resolução da Equação 70, foi possível obter o parâmetro de inativação da I_{CaL} .

$$\frac{df}{dt} = \alpha_f \cdot (1 - f) - \beta_f \cdot f \quad (70)$$

Já a constante de inativação da I_{CaT} (g) foi obtida a partir da determinação da constante em *steady-state* (g_∞ , Equação 71) e da constante de tempo referente à inativação (τ_g , Equação 72), uma alternativa ao uso das taxas α_g e β_g (Hille, 1992). A curva de inativação em *steady-state* se aproximou da obtida experimentalmente para $E_m \leq -20$ mV com os ajustes realizados em g_∞ e τ_g (Figura 4.3.9).

$$g_\infty = \frac{1}{1 + e^{(E_m + 66)/6,6}} \quad (71)$$

$$\tau_g = 8 + \frac{32}{1 + e^{(E_m + 65)/5}} \quad (72)$$

Sabe-se que g_∞ e τ_g são dados pelas Equações 73 e 74, respectivamente, portanto, mais uma vez é possível obter-se a resolução da Equação 75 e determinar o parâmetro de inativação.

$$g_\infty = \frac{\alpha_g}{\alpha_g + \beta_g} \quad (73)$$

$$\tau_g = \frac{1}{\alpha_g + \beta_g} \quad (74)$$

$$\frac{dg}{dt} = \alpha_g \cdot (1 - g) - \beta_g \cdot g \quad (75)$$

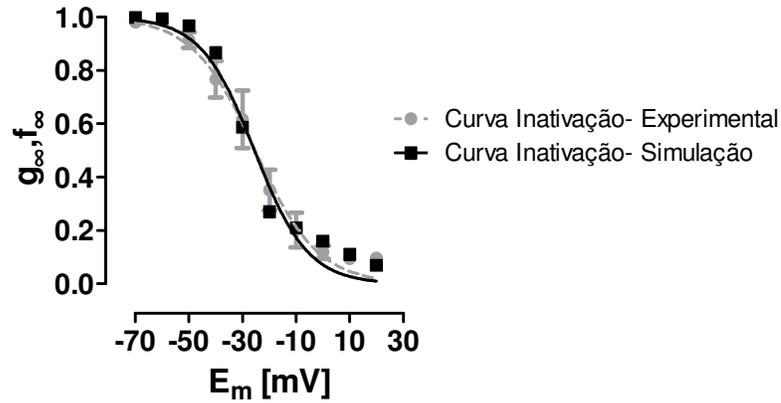


Figura 4.3.9. Ajuste numérico (preto) do parâmetro de inativação em *steady-state* da I_{CaT} (g_{∞} , para $E_m \leq -20$ mV) e da I_{CaL} (f_{∞} , para $E_m > -20$ mV) a partir das equações 68-69 e 71-72, e curva obtida experimentalmente (cinza, linha tracejada).

A $\overline{G_{CaL}}$ utilizada foi de 0,2653 mS/ μ F, valor próximo dos calculados a partir dos experimentos ($\overline{G_{CaL}} = 0,202 \pm 0,025$ mS/ μ F, N= 5), enquanto o valor da $\overline{G_{CaT}}$ foi de 0,05 mS/ μ F, também próximo do obtido experimentalmente ($\overline{G_{CaT}} = 0,044 \pm 0,005$ mS/ μ F, N= 5) o que resultou em valores de densidade de I_{CaT} próximos dos encontrados experimentalmente, como pode ser observado na Figura 4.3.10.

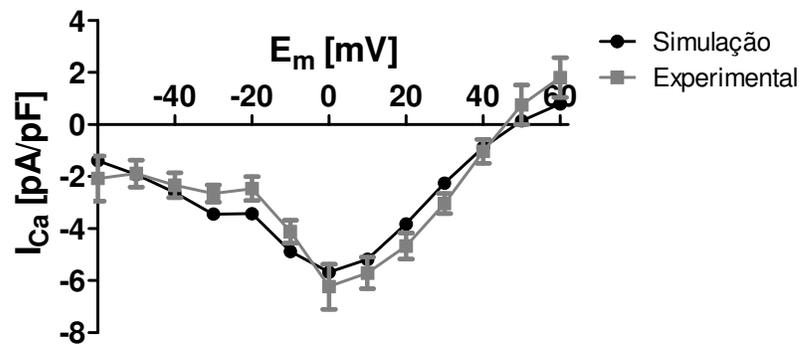


Figura 4.3.10. Curvas corrente-tensão da corrente de Ca^{2+} (I_{Ca}) em unidade de densidade de corrente. A diferença entre a curva obtida experimentalmente (em cinza) e por simulação (em preto) não foi significativa ($p > 0,05$).

4.3.7 Potencial de ação (PA)

O PA simulado teve formato semelhante ao PA medido em uma célula ventricular de rato neonato, como pode ser visto na Figura 4.3.11.

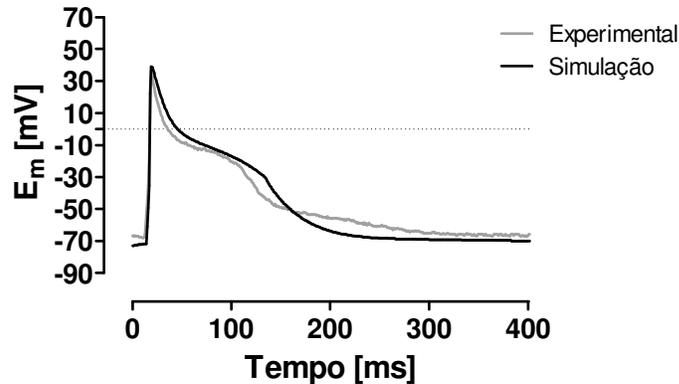


Figura 4.3.11. Potencial de ação (PA) medido em uma célula ventricular de rato neonato (em cinza) e PA simulado com o modelo desenvolvido (em preto).

Os parâmetros de tempo também tiveram valores próximos aos calculados por meio dos registros eletrofisiológicos: t_{0mV} calculado a partir do PA simulado de 34,6 ms vs. t_{0mV} experimental na faixa de 17,67-53,95 ms; APD30 obtido na simulação de 103,0 ms vs. valor experimental de 43,83-105,40 ms; APD50 igual a 127,5 ms na simulação vs. valor experimental de 59,85-157,00 ms; APD90 de 200,0 ms de acordo com o PA simulado vs. valor experimental de 137,10-304,00 ms. Além disso, os valores de E_{pico} (39,09 mV) e $E_{diastólico}$ (-72,86 mV) também estão dentro das faixas de potenciais obtidas experimentalmente (14,65-39,15 mV e -85,17--67,31 mV, respectivamente).

4.3.8 Dinâmicas de Na^+ e Ca^{2+}

Foi determinada a $[Na^+]_i$ durante estimulação à frequência de 0,5 Hz (Figura 4.3.12). É possível observar que o valor de $[Na^+]_i$, após ser atingido o estado de regime permanente, se aproxima do valor obtido experimentalmente (29,6 mM na simulação vs. $33,40 \pm 4,62$ obtido experimentalmente).

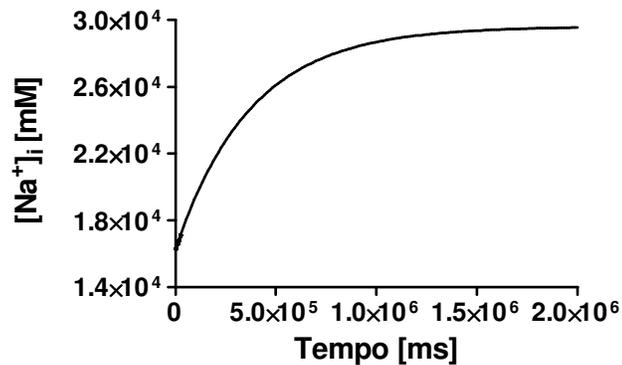


Figura 4.3.12. $[Na^+]_i$ durante estimulação a 0,5 Hz por aproximadamente 33 min, quando já foi alcançado um estado de regime permanente. Ocorre um acúmulo de Na^+ ao longo do tempo no meio intracelular, de 16,3 a 29,6 mM.

A amplitude do transiente de Ca^{2+} intracelular foi de $0,26 \mu M$ (Figura 4.3.13) e a constante de tempo de queda da $[Ca^{2+}]_i$ foi de $287,69 \pm 1,91$ ms (ajuste realizado com uma função monoexponencial, $r^2 = 0,99$).

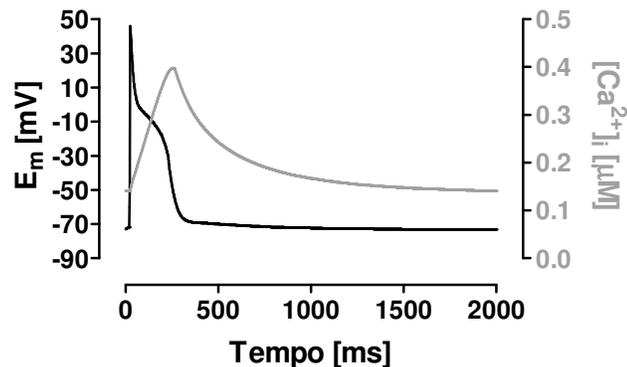


Figura 4.3.13. Variação do potencial de membrana (eixo da esquerda, em preto) e da $[Ca^{2+}]_i$ (eixo da direita, em cinza) ao longo de 2 s de simulação.

Também foram realizadas simulações para determinar a participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} durante o processo de relaxamento celular. Os principais responsáveis pela remoção de Ca^{2+} do citosol são a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), o NCX e os transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial). Para que a participação individual de cada um dos transportadores fosse analisada, foi necessário bloquear a participação dos outros transportadores. A participação da SERCA foi avaliada após a I_{NCX} e a $I_{p(Ca)}$ serem zeradas. Já a participação do NCX foi avaliada quando os fluxos de Ca^{2+} envolvidos na recaptção e liberação de Ca^{2+} do RS foram zerados, além da $I_{p(Ca)}$ ser igualada a zero. A participação dos trans-

portadores lentos foi considerada quando tanto a SERCA quanto o NCX estavam inibidos. Assim, foi possível obter as integrais dos fluxos referentes a cada um dos transportadores por meio da integral no tempo a partir do pico do transiente de Ca^{2+} intracelular, i.e., a fase de decaimento do transiente (Bassani e Bassani, 2002), que podem ser vistas na Figura 4.3.14. A partir das integrais dos fluxos, foram calculadas as porcentagens dos fluxos mediados por cada transportador de acordo com o fluxo total de Ca^{2+} . A SERCA teve maior papel na remoção de Ca^{2+} do meio intracelular (63,6%), enquanto o NCX teve participação de 26,8% e os transportadores lentos somaram 9,6% da participação (Figura 4.3.15).

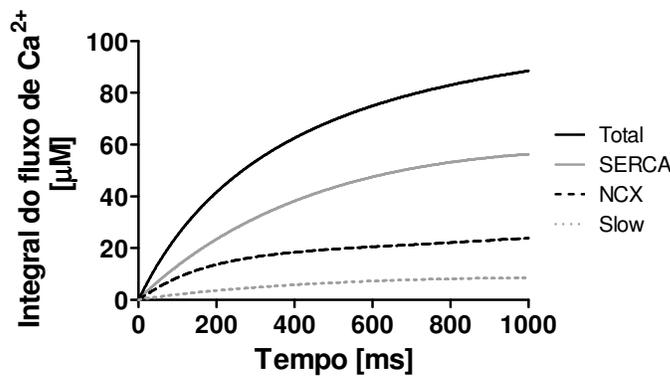


Figura 4.3.14. Integral do fluxo de Ca^{2+} mediado por cada transportador durante a queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$: ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), e transportadores lentos (Slow, grupo formado pelo uniporter mitocondrial e pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema).

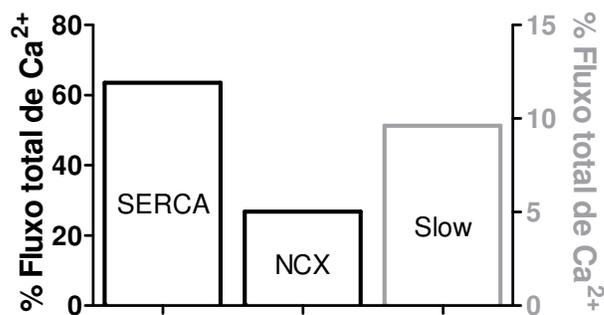


Figura 4.3.15. Contribuição relativa de cada um dos transportadores para o declínio da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante o processo de relaxamento celular. Do fluxo total, a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA) é responsável por 63,6% da remoção do Ca^{2+} do meio intracelular, enquanto que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) tem 26,8% de participação e os transportadores lentos (Slow, grupo formado pelo uniporter mitocondrial e pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema, eixo da direita) contribuem com 9,6%.

Na Figura 4.3.16, é possível observar a variação de $[Ca^{2+}]$ nos retículos sarcoplasmáticos juncional e não-juncional ao longo do tempo.

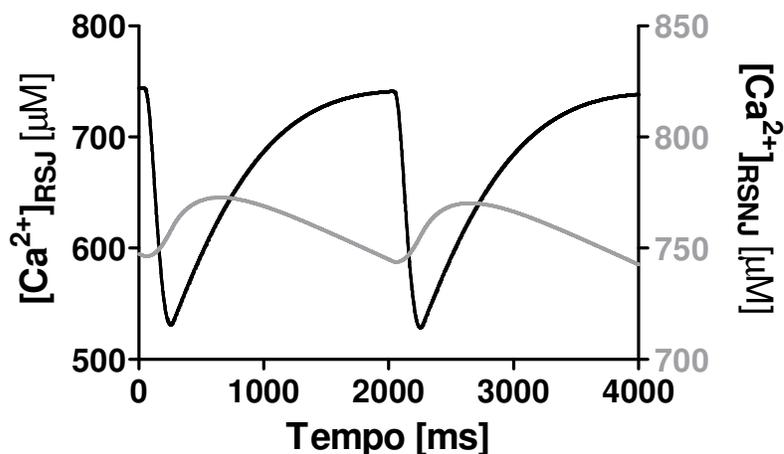


Figura 4.3.16. Variação de $[Ca^{2+}]$ no retículo sarcoplasmático juncional ($[Ca^{2+}]_{RSJ}$, eixo da esquerda) e no não-juncional ($[Ca^{2+}]_{RSNJ}$, eixo da direita) ao longo de 4 s de simulação.

A carga total no RS foi de $755,72 \mu M$ de Ca^{2+} , enquanto que restou $528,66 \mu M$ de Ca^{2+} no RS após a liberação de Ca^{2+} para o citosol durante um *twitch*, conforme pode ser observado na Figura 4.3.16. A partir destes dados, foi possível então calcular a liberação fracional de Ca^{2+} do RS, que corresponde à razão entre $[Ca^{2+}]$ que foi liberada do RS (diferença entre a carga total e o que sobrou no RS após a liberação de Ca^{2+}) e a carga total de Ca^{2+} no RS. A liberação fracional de Ca^{2+} do RS calculada a partir desses dados foi de 30,04%.

5 DISCUSSÃO

O valor médio de capacitância de membrana calculado a partir de experimentos em *volta-ge-clamp* em células de neonato mostrou-se cerca de 9 vezes menor do que em células de adulto, semelhante ao valor relatado por Vornanen (1996). Sabe-se que, após o processo de isolamento de miócitos ventriculares de ratos durante as primeiras semanas de vida, células de vários tamanhos e formas são encontradas na solução de suspensão (Gomes *et al.*, 2001). No caso, para realização dos experimentos deste trabalho, foram utilizadas células com formato mais próximo do esferóide, encontradas com maior frequência que as mais alongadas. Células imaturas são aproximadamente 5 vezes menores em comprimento e possuem largura ~2 vezes menor que de adultos, além de túbulos T inexistentes ou ainda pouco desenvolvidos (Dan *et al.*, 2007). Essas podem ser as principais causas para a menor capacitância de membrana em miócitos de recém-nascidos que de adultos, já que há uma menor área total disponível para o acúmulo de cargas. A partir do valor médio de capacitância de membrana, foi possível calcular uma área capacitiva de $1,64 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$, ou seja, a área de membrana em que pode ocorrer acúmulo de cargas. Esse valor é semelhante ao da área de superfície calculada considerando a célula de recém-nascido como um cilindro. De acordo com as medidas de comprimento e diâmetro realizadas durante os experimentos, a área do cilindro é de $1,61 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$. Essa semelhança evidencia a existência de túbulos T ainda pouco desenvolvidos ou inexistentes em células imaturas.

Sabe-se que o campo elétrico externo necessário para que miócitos isolados de ratos neonatos sejam estimulados é maior que o requerido para células de ratos adultos, principalmente devido a diferenças de geometria dessas células (Gomes *et al.*, 2001). Além disso, neste trabalho foi mostrado que também foi necessária maior despolarização da membrana para que o PA fosse evocado em cardiomiócitos de neonatos, já que o E_m limiar foi menos negativo e o E_m diastólico foi semelhante ao medido em células de adultos. Esta necessidade de maior despolarização da membrana poderia explicar a maior densidade de corrente aplicada para que o PA fosse evocado no caso dos neonatos, indicando que as células ventriculares de ratos recém-nascidos são menos excitáveis que as de adultos.

A excitabilidade celular depende das propriedades biofísicas dos canais de Na^+ dependentes de tensão presentes no sarcolema, já que a fase de rápida despolarização do PA (fase zero) é gerada pelo aumento da condutância ao Na^+ (Draper e Weidmann, 1951; Cohen *et al.*, 1984).

Uma das diferenças observadas nos experimentos de medição de I_{Na} foi o desvio do pico da curva $I \times V$ em 10 mV para a direita no caso dos ratos neonatos. Este desvio poderia ser consequência de diferenças na dependência de E_m da ativação dos canais de Na^+ durante o desenvolvimento, o que de fato foi observado. Houve um desvio da curva de ativação de ~ 10 mV para a direita, no caso das células imaturas, que também já havia sido relatado em um estudo feito por Stocker e Bennett (2006) em células cultivadas de neonato com relação à cultura de miócitos de adulto. Esta alteração, além de inclinação ~ 3 vezes maior da curva de ativação em neonatos, implicaria na necessidade de desenvolvimento de potenciais menos negativos para levar a um dado aumento relativo da condutância da membrana ao Na^+ , além da ativação dos canais ocorrer durante uma faixa mais ampla de E_m . Assim, seria esperado que o E_m limiar das células de ratos neonatos fosse menos negativo, o que foi observado no presente estudo. O desvio da curva de ativação à direita e a maior inclinação dessa curva também poderiam explicar a menor taxa de despolarização observada nos miócitos de recém-nascidos. Esta diferença com relação às curvas de ativação dos canais de Na^+ em células ventriculares de ratos neonatos e adultos provavelmente é consequência da expressão predominante, em adultos e neonatos, de diferentes canais de Na^+ com diferentes propriedades biofísicas. Em dois trabalhos feitos pelo mesmo laboratório, Kaufmann e colaboradores (2010) detectaram a existência da isoforma $Na_v1.2$ em miócitos de ratos neonatos, enquanto que Maier *et al.* (2004) não observaram essa isoforma em miócitos de camundongos de 8 a 10 semanas de idade. A expressão de diferentes isoformas ao longo do desenvolvimento poderia indicar possíveis modificações na composição das subunidades α dos canais de Na^+ , responsáveis pela formação de poros, embora se tratem de diferentes espécies de roedores. Outro estudo mostrou que, quando ocorre expressão de subunidade β , além da expressão de subunidade α de canais de Ca^{2+} ativados por K^+ , a curva de ativação fica deslocada para a esquerda quando comparada com a curva obtida quando há somente expressão da subunidade α (Ahring *et al.*, 1997). O deslocamento para a direita da curva de ativação dos canais de Na^+ , no caso dos neonatos, poderia então indicar menor expressão de subunidades β dos canais de Na^+ quando comparado aos adultos.

Curiosamente, observou-se que, em neonatos, a densidade de I_{Na} foi ~ 2 vezes maior que em adultos, o que não era esperado, já que esta diferença não foi observada por Xu *et al.* (1991), que, no entanto, trabalharam com células em cultura. Chiamvimonvat *et al.* (1995) mostraram que a densidade da I_{Na} em células ventriculares cultivadas de rato neonato é modulada pela $[Ca^{2+}]_i$. Além disso, o estudo de Snopko *et al.* (2007) aponta que, em cultura, algumas caracterís-

ticas na sinalização de Ca^{2+} tornam-se diferentes daquelas de miócitos recém-isolados. Por exemplo, ocorre um aumento da concentração citosólica basal de Ca^{2+} e diminuição da amplitude do transiente de Ca^{2+} em células cultivadas por 3 e 4 dias. Portanto, estas alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem modificar a densidade da I_{Na} quando os miócitos são mantidos em cultura. Uma possível explicação para a maior densidade de I_{Na} poderia ser a maior expressão de canais de Na^+ dependentes de tensão (Na_v) no ventrículo de neonato vs. adulto. Abd Allah *et al.* (2012) e Gershome *et al.* (2011) realizaram comparações entre a expressão de diferentes isoformas dos canais de Na^+ , no caso $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.4$ e $\text{Na}_v1.5$, em miócitos ventriculares isolados de coelhos durante o desenvolvimento. No trabalho de Gershome *et al.* (2011), foi observada maior expressão das isoformas $\text{Na}_v1.4$ e $\text{Na}_v1.1$ em células de coelhos de 3 dias de idade do que em adultos, e não foi detectada diferença significativa com relação à isoforma $\text{Na}_v1.5$, enquanto que, no trabalho de Abd Allah *et al.* (2012), houve diferença significativa na expressão das três isoformas em questão, sempre maior em miócitos de neonatos (2-7 dias) que de adultos. Se esta diferença também ocorrer em ratos, a maior expressão dessas isoformas poderia explicar a maior densidade de I_{Na} em miócitos ventriculares de ratos recém-nascidos quando comparado aos adultos. Além disso, há um estudo feito por Spach e Kootsey (1985) que mostra que, quando ocorre colisão da frente de onda de propagação do sinal elétrico com barreiras estruturais, a taxa de despolarização aumenta e ocorre redução da I_{Na} , provavelmente causada pelo fato de que a rápida despolarização para um alto potencial de pico diminui a *driving force* e aumenta a taxa de inativação da I_{Na} , provocando redução no valor da densidade. Esta poderia ser outra provável causa para a menor densidade de I_{Na} em miócitos de ratos adultos, já que há uma maior quantidade de barreiras estruturais nessas células (Olivetti *et al.*, 1980; Nassar *et al.*, 1987), o que aumenta a resistência para a propagação do sinal.

A partir da I_{Na} medida em células de recém-nascidos, foi possível calcular a $[\text{Na}^+]_i$. Como os experimentos foram realizados a 23 °C, o coeficiente RT/F da equação de Nernst ($E_{\text{Na}} = (RT/F) \cdot \ln([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i)$) pode ser considerado igual a 25,47 mV (Hille, 1992). Como foi utilizada $[\text{Na}^+]_o = 70$ mM e o potencial de reversão da I_{Na} foi ~ 26 mV, $[\text{Na}^+]_i \approx 25$ mM de acordo com a solução da equação de Nernst. No entanto, como os experimentos feitos para medir a $[\text{Na}^+]_i$ com o indicador CoroNa Green foram realizados em $[\text{Na}^+]_o = 140$ mM (solução de *Tyrode*) e o potencial de reversão se modifica de acordo com essa concentração (vide Figura 4.3.3), não se pode comparar o valor calculado de $[\text{Na}^+]_i$ com o experimental utilizando este potencial de reversão da I_{Na} como referência. Em outro estudo realizado com células ventriculares isoladas de ratos

de 1 dia de idade (Conforti *et al.*, 1992), a solução de banho para medir a I_{Na} continha 143 mM de Na^+ e os experimentos também foram realizados à temperatura ambiente, condições mais próximas dos experimentos de fluorescência realizados com o indicador CoroNa Green. A partir dos dados de Conforti e colaboradores (1992), tem-se um potencial de reversão de ~ 56 mV, obtido a partir da curva $I \times V$, o que resultaria em $[Na^+]_i \approx 16$ mM de acordo com a solução da equação de Nernst. Este valor está próximo ao valor encontrado, neste trabalho, de $[Na^+]_i$ em células quiescentes de ratos neonatos ($18,0 \pm 1,8$ mM). Após 5 min de estimulação elétrica a 0,5 Hz, a $[Na^+]_i$ aumentou significativamente em células imaturas quando comparado aos miócitos de adultos (33 vs. 14 mM, respectivamente), dado inexistente na literatura até o presente momento. O método desenvolvido para medição de $[Na^+]_i$, no entanto, parece ser confiável, devido à coincidência dos valores de $[Na^+]_i$ em células quiescentes e estimuladas eletricamente, medidos neste trabalho em miócitos ventriculares recém-isolados de ratos adultos, com obtidos em experimentos realizados com um indicador ratiométrico (Despa *et al.*, 2002). Sabe-se que o acúmulo de Na^+ intracelular devido a aumento de frequência de estimulação é arritmogênico (Faber e Rudy, 2000). No recém-nascido, no entanto, esta parece ser a condição fisiológica normal. Este aumento poderia ter sido causado pelo influxo de Na^+ em resposta à estimulação (I_{Na}) e/ou acoplado à extrusão de Ca^{2+} pelo trocador Na^+/Ca^{2+} presente na membrana, um dos mecanismos responsáveis pela remoção rápida de Ca^{2+} do citosol (Blaustein e Lederer, 1999), ou ainda devido à extrusão ácida pelo trocador Na^+/H^+ (Bers *et al.*, 2003). Além disso, o acúmulo de Na^+ poderia ter sido causado devido a menor extrusão de Na^+ por meio da ATPase Na^+/K^+ (Bers *et al.*, 2003).

Sabe-se que a expressão e a atividade do NCX são maiores em miócitos ventriculares de ratos neonatos que em adultos (Boerth *et al.*, 1994; Bassani e Bassani, 2002). Portanto, foram realizados experimentos para analisar se o NCX teria influência no acúmulo intracelular de Na^+ nas células de neonatos. Nos experimentos em que os canais de Ca^{2+} do sarcolema foram bloqueados, com ou sem concomitante inibição do NCX (i.e., inibição da geração de transientes de Ca^{2+} associados ao PA, o que resultaria em influxo de Ca^{2+} mediado pelo NCX semelhante àquele na condição de repouso elétrico), o aumento significativo da $[Na^+]_i$ não foi mais observado. Portanto, os resultados levam a concluir que este aumento deva ser dependente da elevação sistólica de $[Ca^{2+}]_i$, a qual eleva a *driving force* para a extrusão de Ca^{2+} acoplada ao influxo de Na^+ pelo NCX (Kang e Hilgemann, 2004). Curiosamente, o modelo de PA ventricular de camundongo neonato

de Wang e Sobie (2008) conseguiu prever a maior acumulação citosólica de Na^+ durante a atividade elétrica.

Estudos mostram ainda outras diferenças entre células ventriculares de neonatos com relação às de adultos. Alguns artigos, por exemplo, apresentam resultados de maior densidade de I_{CaL} em recém-nascidos que em adultos (Cohen e Lederer, 1988) e de geração do transiente de Ca^{2+} intracelular mais dependente do influxo pelos canais de Ca^{2+} que da liberação de Ca^{2+} do RS (Haddock *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2005). As densidades da I_{Ca} medidas neste trabalho, no entanto, não foram significativamente diferentes em células de ratos neonatos e adultos, como também já havia sido observado em outros trabalhos (Masuda e Sperelakis, 1993; Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1998). Porém, foi possível observar que, além da componente causada pelos canais de Ca^{2+} tipo-L, no neonato também há a componente de I_{Ca} causada pelos canais tipo-T, característica de células de recém-nascidos (Leuranguer *et al.*, 2000). A inativação da I_{Ca} também foi significativamente mais lenta em células de recém-nascidos, cerca de 30%, como mostrado neste trabalho, e que também já havia sido detectada por Katsube *et al.* (1998). Esta pode ser uma das causas para que, na fase de platô, a duração do PA seja ~2 vezes maior em cardiomiócitos de rato neonato que de adulto, já que ocorre influxo maior de Ca^{2+} durante o PA (Ferraz, 2003). Além disso, sabe-se que a I_{to} também age não só durante a repolarização inicial da membrana após o pico do PA, mas também em parte da fase de platô (Clark *et al.*, 1993) e na fase APD30, que também foi maior em neonatos que em adultos. Essas maiores durações devem então ter sido causadas pela densidade aproximadamente 2 vezes menor de I_{to} em ratos de 5 dias que nos de 30 dias de idade (Xu *et al.*, 1996), resultado semelhante ao obtido neste trabalho. Também foi observado prolongamento do PA em fases mais tardias da repolarização (APD50 e APD90). Nestas fases do PA, há ainda influência de I_{to} , e também da corrente de saída de K^+ em *steady-state* (I_{Kss}) e retificadora de entrada de K^+ (I_{K1}), consideradas as componentes que mais influenciam na duração e taxa de repolarização do PA no ventrículo do roedor (Grandy *et al.*, 2007). Sabe-se que I_{K1} possui densidade ~2 vezes menor em recém-nascidos (Wahler, 1992). E como a I_{Kss} é uma componente da I_{K} , que, de acordo com este trabalho, foi ~4 vezes menor em miócitos de ratos neonatos que em adultos, pode-se dizer que a menor densidade das principais correntes repolarizantes em células em desenvolvimento poderia explicar o aumento observado na duração do PA.

O modelo mais simples de propagação do PA está relacionado a uma estrutura linear, em que as células formam uma cadeia contínua de elementos excitáveis, e o fluxo da corrente se dá a

partir da célula despolarizada para células vizinhas menos despolarizadas via junções *gap*, que são caminhos resistivos intercelulares. Uma consequência da estrutura cardíaca é que, durante a propagação das ondas elétricas, há interação com obstáculos estruturais que existem no nível celular, como as membranas, e também no nível mais macroscópico, e.g., barreiras de tecido conectivo (Le Grice *et al.*, 1995). Além disso, o sucesso da condução elétrica também depende da excitabilidade da membrana, e é o equilíbrio entre as propriedades resistivas do conjunto das células excitáveis e o grau de excitabilidade que faz com que a condução não seja bloqueada (Wang e Rudy, 2000). Experimentos mostraram que a taxa de despolarização máxima da membrana é proporcional ao quadrado da velocidade de condução (Buchanan *et al.*, 1995). Portanto, em células ventriculares de neonatos, as menores excitabilidade e $dV/dt_{\text{máx}}$ poderiam diminuir a velocidade de condução do sinal elétrico entre as células quando comparado aos adultos e prejudicar a formação do ciclo cardíaco normal. No entanto, com um padrão de distribuição de junções *gap* ao longo da membrana e menor tamanho das células de recém-nascidos, ao invés de junções *gap* localizadas somente nas regiões mais distais, no final do eixo longitudinal, e maior tamanho das células de adultos, o atraso de propagação intercelular é menor em células em desenvolvimento (Spach *et al.*, 2000). Portanto, provavelmente há um equilíbrio entre as propriedades ativas (elétricas) e passivas (resistivas) da membrana, o que proporciona contração coordenada das células para que ocorra a geração do ciclo cardíaco.

Muitos estudos mostram correlação entre a duração do PA e a contratilidade da célula (Wohlfart, 1979; Schouten, 1986; Boyett e Jewell, 1980), mas as bases fisiológicas para as mudanças que ocorrem na forma do PA na presença de patologias ou mesmo durante o desenvolvimento ainda não são totalmente conhecidas. Por exemplo, a maior duração do PA vista em cardiomiócitos de adultos com hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão, pode ser parte de um retorno generalizado para o fenótipo de fetos e recém-nascidos (Aronson, 1980; Aronson *et al.*, 1984; Keung *et al.*, 1981, 1982). O modelo matemático desenvolvido de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de ratos neonatos pode vir a melhorar o entendimento de como as correntes iônicas modulam o PA, e ajudar no esclarecimento de mecanismos responsáveis por enfermidades contráteis e arritmias.

As simulações realizadas apresentaram concordância com os resultados *in vitro* de densidades de correntes iônicas. As curvas $I \times V$ de I_{Na} e I_{Ca} ficaram muito próximas das obtidas nos experimentos de *whole-cell voltage clamp*, sendo possível identificar até mesmo a presença da

componente da I_{Ca} devida ao canal de Ca^{2+} tipo-T. Além disso, o próprio PA simulado apresentou um formato bem próximo do medido em modo *whole-cell current clamp*, com parâmetros de duração análogos aos calculados a partir dos resultados experimentais. O modelo também conseguiu reproduzir o aumento dependente de atividade da $[Na^+]_i$ observado experimentalmente. A obtenção de um resultado similar por meio da simulação computacional indica que o influxo significativo de Na^+ por meio do NCX possa estar associado à elevação sistólica de $[Ca^{2+}]_i$, embora não se tenha conhecimento de relatos experimentais deste fenômeno publicados na literatura.

Em cardiomiócitos de recém-nascidos, o RS ainda é imaturo comparado com de adultos (Anversa et al., 1980; Hiraokow et al., 1980). Sabe-se também que, em miócitos ventriculares de coelhos neonatos, 90% dos RyRs não estão colocalizados com canais de Ca^{2+} dependentes de tensão presentes no sarcolema (Sedarat et al., 2000). Com menor ativação local de RyRs, a liberação de Ca^{2+} do RS durante o processo de acoplamento excitação-contração deve ser menor que em adultos. No trabalho de Ziman et al. (2010), foi estimada uma liberação fracional de Ca^{2+} do RS de 33% em células de recém-nascidos. No presente trabalho, a simulação também indicou a ocorrência de uma liberação de Ca^{2+} do RS de 30% quando as células ventriculares de ratos neonatos foram estimuladas a 0,5 Hz. Em adultos, essa liberação pode chegar a 73% quando as células são estimuladas a 0,5 Hz (Bassani et al., 1995; Ricardo, 2010; Bassani et al., 2012).

A inativação da I_{CaL} depende não somente do potencial de membrana, mas também da interação de Ca^{2+} com um sítio localizado na região interna do canal. Quando ocorre esta interação, o processo de inativação se torna mais rápido (Hofer et al., 1997). Portanto, se há menos Ca^{2+} disponível no meio intracelular, é esperada menor influência do processo de inativação dependente de Ca^{2+} e, conseqüentemente, um prolongamento da inativação da I_{CaL} . O resultado da menor liberação fracional de Ca^{2+} do RS em neonatos que em adultos, obtido por meio da simulação, poderia explicar então a inativação mais lenta da I_{CaL} . Devido à inativação mais lenta e também à existência da I_{CaT} em recém-nascidos, o *trigger* para a liberação de Ca^{2+} do RS não se torna menor em neonatos que em adultos, pelo contrário, o influxo deve ser maior em células imaturas (Ferraz, 2003). No entanto, isso não faz com que a liberação de Ca^{2+} do RS seja maior, porque, como já comentado, poucos RyRs estão acoplados aos canais de Ca^{2+} do sarcolema.

Apesar de menos Ca^{2+} ser liberado do RS em cardiomiócitos de neonatos que de adultos, esta organela ainda é a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração, já que a ATPase de Ca^{2+} do RS é a principal responsável pela remoção de Ca^{2+} do meio intracelular durante o processo de

relaxamento celular em recém-nascidos, como observado *in silico* e *in vitro* (Bassani e Bassani, 2002). Por outro lado, ainda conforme a literatura (Bassani e Bassani, 2002) e os resultados da simulação computacional, o NCX apresenta diminuição significativa na participação de remoção de Ca^{2+} do citosol durante o desenvolvimento (27% em recém-nascidos vs. 5% em adultos). Portanto, seria interessante investigar se o NCX também contribuiria para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante o processo de acoplamento excitação-contração em recém-nascidos, já que há um estudo que indica que o influxo de Na^+ por isoformas neuronais de canais de Na^+ contribui significativamente para disparar a liberação de Ca^{2+} do RS por meio da ativação do NCX no modo reverso em células ventriculares isoladas de coelhos adultos (Torres *et al.*, 2010).

Portanto, a partir do modelo matemático foram obtidos resultados semelhantes a obtidos experimentalmente e presentes na literatura. As principais correntes iônicas foram medidas experimentalmente para que a precisão do modelo fosse maior. Isso possibilitou a utilização de valores de outros parâmetros mais próximos de obtidos experimentalmente com células ventriculares de roedores neonatos, o que não havia sido feito em outros modelos de PA e acoplamento excitação-contração desenvolvidos para células de roedores nessa faixa etária, e.g., o modelo de Wang e Sobie (2008) e Korhonen *et al.* (2009). O modelo, no entanto, ainda precisa ser aperfeiçoado, porque muitos dados ainda são inexistentes na literatura para células recém-isoladas imaturas, principalmente na parte de dinâmica de Ca^{2+} , que apresenta alteração quando as células são mantidas em cultura. A participação relativa da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema na remoção de Ca^{2+} intracelular durante a fase de relaxamento celular, por exemplo, foi de 9% *in silico*, enquanto que a participação obtida experimentalmente foi de 3% (Bassani e Bassani, 2002). Esta diferença pode ter sido causada devido à opção de se utilizar um valor máximo de $I_{p(\text{Ca})}$ mais próximo do utilizado em um modelo de PA ventricular em células de camundongo adulto (Bondarenko *et al.*, 2004), devido ao aumento da atividade da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema em miócitos imaturos (Bassani e Bassani, 2002), mas pode ser que até mesmo o valor utilizado no modelo de adulto esteja superestimado. Os parâmetros relacionados aos RyRs, que foram basicamente os utilizados por Wang e Sobie (2008), ainda não foram obtidos experimentalmente. Como a simulação realizada com estes valores resultou em uma liberação fracional de Ca^{2+} do RS com um valor menor que 10%, foi necessário aumentar o valor da permeabilidade máxima dos RyRs ao Ca^{2+} (v_1) em aproximadamente 2 vezes, utilizando-se o valor presente no modelo de Korhonen *et al.* (2009).

Uma vantagem do modelo matemático desenvolvido foi a utilização da linguagem de programação Fortran. Isto fez com que o tempo de simulação fosse reduzido quando comparado à resolução das equações diferenciais acopladas por meio do programa Matlab. Houve redução de 87% do tempo de simulação, o que possibilitou a análise de parâmetros que necessitavam de longo período de tempo para atingir o estado de regime permanente, como foi o caso da $[Na^+]_i$.

Portanto, apesar de ainda ser necessária a realização de ajustes de algumas variáveis importantes baseando-se em dados experimentais, o modelo desenvolvido neste trabalho conseguiu simular valores de $[Na^+]_i$ em células quiescentes e estimuladas eletricamente, de liberação fracional de Ca^{2+} e de participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} na remoção de Ca^{2+} intracelular durante o processo de relaxamento celular próximos de valores obtidos experimentalmente. Deste modo, o modelo pode ser utilizado para prever alterações eletrofisiológicas dos cardiomiócitos de ratos neonatos em diferentes condições.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou alguns resultados inéditos na literatura e pode vir a contribuir para o melhor entendimento do processo de acoplamento excitação-contração e diferenças observadas durante o desenvolvimento pós-natal de miócitos ventriculares.

Foi observada menor excitabilidade das células de ratos neonatos, o que poderia ser explicada por alteração da ativação da I_{Na} durante essas fases do desenvolvimento. Além disso, foi observado um aumento, dependente da atividade, da $[Na^+]_i$ em células de recém-nascidos, principalmente causado pelo influxo de Na^+ acoplado ao efluxo de Ca^{2+} durante o transiente de Ca^{2+} . Este acúmulo de Na^+ foi reproduzido no modelo matemático desenvolvido de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos de ratos neonatos, o qual também mostrou que o RS é de fato a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração, como concluído a partir de dados experimentais, apesar da organela ainda estar imatura em células de recém-nascidos. Além disso, pelos resultados do modelo, foi possível calcular a liberação fracional de Ca^{2+} do RS em miócitos de ratos neonatos, que foi menor do que em adultos, como também indicado em estudos previamente publicados. Portanto, o modelo pode ser utilizado para prever alterações eletrofisiológicas dos cardiomiócitos de ratos neonatos em diferentes condições e auxiliar na obtenção de conhecimento para o entendimento de mecanismos fisiológicos dependentes da fase de desenvolvimento, o que é crucial para o tratamento de anormalidades eletrofisiológicas e/ou contráteis em pacientes recém-nascidos.

REFERÊNCIAS

ABD ALLAH, E.S.H.; ASLANIDI, O.V.; TELLEZ, J.O.; YANNI, J.; BILLETER, R.; ZHANG, H.; DOBRZYNSKI, H.; BOYETT, M.R. Postnatal development of transmural gradients in expression of ion channels and Ca²⁺-handling proteins in the ventricle. **J Mol Cell Cardiol**, v. 53, n. 2, p. 145-55, ago. 2012.

ACOSTA, D.; RAMOS, K. Cardiotoxicity of tricyclic antidepressants in primary cultures of rat myocardial cells. **J Toxicol Environ Health**, v. 14, p. 137–143, 1984.

AHRING, P.K.; STRØBAEK, D.; CHRISTOPHERSEN, P.; OLESEN, S.P.; JOHANSEN, T.E. Stable expression of the human large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel alpha- and beta-subunits in HEK293 cells. **FEBS Lett**, v. 415, n. 1, p. 67-70, set. 1997.

ANVERSA, P.; OLIVETTI, G.; LOUD, A.V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. **Circ Res**, v. 46, p. 495-502, 1980.

ARONSON, R.S. Characteristics of action potentials of hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. **Circ Res**, v. 47, n. 3, p. 443–454, set. 1980.

ARONSON, R.S.; NORDIN, C. Electrophysiologic properties of hypertrophied myocytes isolated from rats with renal hypertension. **Eur Heart J**, v. 5, Suppl. F, p. 339–345, dez. 1984.

ATTWELL, D.; COHEN, I.; EISNER, D.; OHBA, M.; OJEDA, C. The steady state TTX sensitive ('window') sodium current in cardiac Purkinje fibres. **Pflugers Arch**, v. 379, n. 2, p. 137–142, mar. 1979.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 265, n. 2, p. C533-C540, ago. 1993.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 6, p. H2406-H2413, jun. 2002.

BASSANI, R.A.; GILIOLI, R.; OLIVEIRA, E.S.; HOEHR, N.F. Blood calcium levels in immature rats: influence of extracellular calcium concentration on myocardial calcium handling. **Exp Anim**, v. 61, n. 4, p. 399–405, 2012.

BASSANI, R.A.; RICARDO, R.A.; BASSANI, J.W.M. Estimation of the fractional sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in intact cardiomyocytes using integrated Ca²⁺ fluxes. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, p. 401-408, 2012.

BASSANI, J.W.M.; YUAN, W.; BERS, D.M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. **Am J Physiol**, v. 268, n. 5, p. C1313-C1319, maio 1995.

BEELER, G.W.; REUTER, H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. **J Physiol**, v. 268, n. 1, p. 177–210, jun. 1977.

BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, jan. 2002.

BERS, D.M.; BARRY, W.H.; DESPA, S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 4, p. 897-912, mar. 2003.

BLAUSTEIN, M.P.; LEDERER, J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiol Rev**, v. 79, n. 3, p. 763-854, jul. 1999.

BOERTH, S.R.; ZIMMER, D.B.; ARTMAN, M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger peak near birth in the developing rabbit and rat hearts. **Circ Res**, v. 74, n. 2, p. 354-359, fev. 1994.

BONDARENKO, V.E.; SZIGETI, G.P.; BETT, G.C.L.; KIM, S.J.; RASMUSSEN, R.L. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 3, p. H1378–H1403, set. 2004.

BOYETT MR, JEWELL B. Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon electrical activity in the heart. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 1-52, 1980.

BUCHANAN, J.W.; SAITO, T.; GETTES, L.S. The effects of antiarrhythmic drugs, stimulation frequency, and potassium-induced resting membrane potential changes on conduction velocity and dV/dtmax in guinea pig myocardium. **Circ Res**, v. 56, n. 5, p. 696–703, maio 1985.

CHIAMVIMONVAT, N.; KARGACIN, M.E.; CLARKAND, R.B.; DUFF, H.J. Effects of intracellular calcium on sodium current density in cultured neonatal rat cardiacmyocytes. **J Physiol**, v. 483, n. 2, p. 307-318, mar. 1995.

CHLOPČÍKOVÁ , Š.; PSOTOVÁ, J.; MIKETOVÁ, P. Neonatal rat cardiomyocytes – a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. **Biomed. Papers**, v. 145, n. 2, p. 49–55, 2001.

CLARK, R.B.; BOUCHARD, R.A.; SALINAS-STEFANON, E.; SANCHEZ-CHAPULA, J.; GILES, W.R. Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. **Cardiovasc Res**, v. 27, n. 10, p. 1795-1799, out. 1993.

COHEN, C.J.; BEAN, B.P.; TSIEN, R.W. Maximal upstroke velocity as an index of available sodium conductance. Comparison of maximal upstroke velocity and voltage clamp measurements of sodium current in rabbit Purkinje fibers. **Circ Res**, v. 54, n. 6, p. 636-651, jun. 1984.

COHEN, N.M.; LEDERER, W.J. Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. **J Physiol**, v. 406 , p. 115–146, dez. 1988.

COLUCCI, W.S. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. **Am J Cardiol**, v. 80, n.11A, p. 15L-25L, dez. 1997.

CONFORTI, L.; TOHSE, N.; SPERELAKIS, N. Tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat fetal ventricular myocytes contribution to the plateau phase of action potential. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, n. 2, p. 159-173, fev. 1993.

DAN P, LIN E, HUANG J, BILN P, TIBBITS GF. Three-dimensional distribution of cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchanger and ryanodine receptor during development. **Biophys J**, v. 93, n. 7, p. 2504-2518, out. 2007.

DESPA, S.; ISLAM, M.A.; POGWIZD, S.M.; BERS, D.M. Intracellular $[\text{Na}^+]_i$ and Na^+ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. **J Physiol**, v. 593, p. 133-143, fev. 2002.

DIFRANCESCO, D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. **J Physiol**, v. 314, p. 359–376, maio 1971.

DIFRANCESCO, D., NOBLE, D., 1985. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. **Philos Trans Roy Soc London B Biol Sci**, v. 307, n. 1133, p. 353–398, jan. 1985.

DRAPER, M.H.; WEIDMANN, S. Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. **J Physiol**, v. 115, n. 1, p. 74-94, set. 1951.

EARM, Y.E., NOBLE, D. A model of the single atrial cell: relation between calcium current and calcium release. **Proc Roy Soc London B Biol Sci**, v. 240, n. 1297, p. 83–96, maio 1990.

EBIHARA, L.; JOHNSON, E.A. Fast sodium current in cardiac muscle. A quantitative description. **Biophys J**, v. 32, n. 2, p. 779-790, nov. 1980.

ESTEVEZ, M. D., WOLF, A., SCHRAMM, U. Effect of PSC 833, Verapamil and Amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes. **Toxicol in Vitro**, v. 14, p. 17–23, 2000.

FABER, G.M.; RUDY, Y. Action potential and contractility changes in $[\text{Na}^+]_i$ overloaded cardiac myocytes: a simulation study. **Biophys J**, v. 78, p. 2392–2404, maio 2000.

FERRAZ, S.A. **Estimativa do influxo de cálcio por meio de canais tipo L em miócitos cardíacos isolados de ratos neonatos e adultos**. 2003. 110f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GENTET L.J.; STUART, G.J.; CLEMENTS, J.D. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. **Biophys J**, v. 79, p. 314–320, jul 2000.

GERSHOME, C.; LIN, E.; KASHIHARA, H.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G.F. Colocalization of voltage-gated Na^+ channels with the Na^+ / Ca^{2+} exchanger in rabbit cardiomyocytes during development. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 1, p. H300-H311, jan. 2011.

GOMES, P.A.P. **Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: Medição de [Ca] e limiar de estimulação.** 1997. 182 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

GOMES, P.A.P.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. **IEEE Trans Biomed Eng**, v. 48, n. 6, p. 630-636, jun, 2001.

GRANDY, S.A.; TRÉPANIÉ-BOULAY, V.; FISET, C. Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 4, p. H2168–H2177, out. 2007.

GREENSTEIN, J.L.; WINSLOW, R.L. An integrative model of the cardiac ventricular myocyte incorporating local control of Ca^{2+} release. **Biophys J**, v. 83, n. 6, p. 2918–2945, dez. 2002.

HADDOCK, P.S.; COETZEE, W.A.; CHO, E.; PORTER, L.; KATOH, H.; BERS, D.M.; JAFRI, S.; ARTMAN, M. Subcellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. **Circ Res**, v. 85, n. 5, p. 415-427, set. 1999.

HILGEMANN, D.W.; NOBLE, D. Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transients in rabbit atrium: reconstruction of basic cellular mechanisms. **Proc Roy Soc London B Biol Sci**, v. 230, n. 1259, p. 163–205, mar. 1987.

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes.** 2. ed., Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1992. 607 p.

HIRAKOW, R.; GOTOH, T.; WATANABE, T. Quantitative studies on the ultrastructural differentiation and growth of mammalian cardiac muscle cells: I. The atria and ventricles of the rat. **Acta Anat**, v. 108, p. 230-237, 1980.

HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **J Physiol**, v. 117, n. 4, p. 500–544, ago. 1952.

HOFER, G.F.; HOHENTHANNER, K.; BAUMGARTNER, W.; GROSCHNER, K.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, F.; ROMANIN, C. Intracellular Ca^{2+} inactivates L-type Ca^{2+} channels with a Hill coefficient of approximately 1 and an inhibition constant of approximately 4 μ M by reducing channel's open probability. **Biophys J**, v. 73, n. 4, p.1857-1865, out. 1997.

HUND, T.J.; RUDY, Y. Determinants of excitability in cardiac myocytes: mechanistic investigation of memory effect. **Biophys J**, v. 79, n. 6, p. 3095-3104, dez. 2000.

HUTTER, O.F.; NOBLE, D. Rectifying properties of heart muscle. **Nature**, v. 188, p. 495, nov. 1960.

JAFRI, S.; RICE, J.J.; WINSLOW, R.L. Cardiac Ca^{2+} dynamics: the roles of ryanodine receptor adaptation and sarcoplasmic reticulum load. **Biophys J**, v. 74, n. 3, p. 1149–1168, mar. 1998.

KANG, T.M.; HILGEMANN, D.W. Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. **Nature**, v. 427, n. 6974, p.544–548, fev. 2004.

KAUFMANN, S.G.; WESTENBROEK, R.E.; ZECHNER, C.; MAASS, A.H.; BISCHOFF, S.; MUCK, J.; WISCHMEYER, E.; SCHEUER, T.; MAIER, S.K.G. Functional protein expression of multiple sodium channel α - and β -subunit isoforms in neonatal cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 1, p. 261–269, jan. 2010.

KATSUBE, Y.; YOKOSHIKI, H.; NGUYEN, L.; YAMAMOTO, M.; SPERELAKIS, N. L-type Ca²⁺ currents in ventricular myocytes from neonatal and adult rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, n. 9, p. 873–881, set. 1998.

KEUNG, E.C., ARONSON, R.S. Nonuniform electrophysiologic properties and electrotonic interaction in hypertrophied rat myocardium. **Circ Res**, v. 49, n. 1, p. 150–158, jul. 1981.

KEUNG, E.C.; KEUNG C.S.; ARONSON, R.S. Passive electrical properties of normal and hypertrophied rat myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 243, n. 12, p. H917–H926, dez. 1982.

KORHONEN, T.; HÄNNINEN, S.L.; TAVI, P. Model of excitation-contraction coupling of rat neonatal ventricular myocytes. **Biophys J**, v. 96, n. 3, p. 1189–1209, fev. 2009.

LE GRICE, I.J.; SMAILL, B.H.; CHAI, L.Z.; EDGAR, S.G.; GAVIN, J.B.; HUNTER, P.J. Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 266, n. 2, p. H571–H582, ago. 1995.

LEURANGUER, V.; MONTEIL, A.; BOURINET, E.; DAYANITHI, G.; NARGEOT, J. T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 5, p. H2540–H2548, nov. 2000.

LIMAYE, D.A.; SHAIKH, Z.A. Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 154, p. 59–66, 1999.

LUO, C.H.; RUDY, Y. A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. **Circ Res**, v. 68, n. 6, p. 1501–1526, jun. 1991.

LUO, C.; RUDY, Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential – simulations of ionic currents and concentration changes. **Circ Res**, v. 74, n. 6, p. 1071–1097, jun. 1994 (a).

LUO, C.; RUDY, Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. After depolarizations, triggered activity and potentiation. **Circ Res**, v. 74, n. 6, p. 1097–1113, jun. 1994 (b).

MAHONY, L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. **Cardiovasc Res**, v. 31, p. E61–E67, fev. 1996.

MAIER, S.K.G.; WESTENBROEK, R.E.; MCCORMICK, K.A.; CURTIS, R.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Distinct subcellular localization of different sodium channel α and β sub-

units in single ventricular myocytes from mouse heart. **Circulation**, v. 109, n. 11, p. 1421–1427, mar. 2004.

MASUDA, H.; SPERELAKIS, N. Inwardly rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 265, n. 4, p. H1107–H1111, out. 1993.

MCALLISTER, R.E.; NOBLE, D.; TSIEN, R.W. Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres. **J Physiol**, v. 251, n. 1, p. 1–59, set. 1975.

MEIER, S.D.; KOVALCHUK, Y.; ROSE, C.R. Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na⁺ imaging. **J Neurosc Meth**, v. 155, n. 2, p. 251–259, set. 2006.

MOLLEMAN, A. **Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003. 175 p.

NASSAR, R.; REEDY, M.C.; ANDERSON, P.A. Developmental changes in the ultrastructure and sarcomere shortening of the isolated rabbit ventricular myocyte. **Circ Res**, v. 61, n. 3, p. 465–483, set. 1987.

NOBLE, D. A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. **J Physiol**, v. 160, p. 317–352, fev. 1962.

NOBLE, D. From the Hodgkin–Huxley axon to the virtual heart. **J Physiol**, v. 580, p. 15–22, abr. 2007.

NOBLE, D.; TSIEN, R.W. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. **J Physiol**, v. 200, n. 1, p. 205–231, jan. 1969.

NYGREN, A.; FISET, C.; FIREK, L.; CLARK, J.W.; LINDBLAD, D.S.; CLARK, R.B.; GILES, W.R. Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of K⁺ currents in repolarization. **Circ Res**, v. 82, n. 1, p. 63–81, jan. 1998.

OLIVETTI, G. ANVERSA, P.; LOUD, A.V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. **Circ Res**, v. 46, p. 503–512, 1980.

PARKER, T.S.; CHUA, L.O. **Practical numerical algorithms for chaotic systems**. Berlin: Springer Verlag, pp. 83–114, 1989.

PENNA, L.B.; BASSANI, R.A. Increased spontaneous activity and lower inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. **Int J Biol Stress**, v. 13, n. 1, p. 73–82, jan. 2010.

PÉREZ, C.G.; COPELLO, J.A.; LI, Y.; KARKO, K.L.; GÓMEZ, L.; RAMOS-FRANCO, J.; FILL, M.; ESCOBAR, A.L.; MEJÍA-ALVAREZ, R. Ryanodine receptor function in newborn rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. H2527–H2540, maio 2005.

PUGLISI, J.L.; BERS, D.M. LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 6, p. C2049-C2060, dez. 2001.

RAPILA, R; KORHONEN, T; TAVI, P. Excitation-contraction coupling of the mouse embryonic cardiomyocyte. **J Gen Physiol**, v. 132, n. 4, p. 397–405, out. 2008.

REEVES, J.P.; HALE, C.C. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. **J Biol Chem**, v. 259, n. 12, p. 7733-7739, jun. 1984.

REUTER, H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentration. **J Physiol**, v. 192, n. 2, p. 479–492, set. 1967.

REUTER, H.; SEITZ, N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. **J Physiol**, v. 195, n. 2, p. 451–470, mar. 1968.

RICARDO, R.A. **Liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos de ratos estimulados em diferentes frequências**. 2010. 90 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

RICE, J.J.; JAFRI, M.S.; WINSLOW, R.L. Modeling gain and gradedness of Ca^{2+} release in the functional unit of the cardiac diadic space. **Biophys J**, v. 77, n. 4, p. 1871–1884, out. 1999.

SANGUINETTI, M. C.; JURKIEWICZ, N. K. Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. **Am J Physiol**, v. 260, p. H393-H399, 1991.

SCHOUTEN, V.J.A. The negative correlation between action potential duration and force of contraction during restitution in rat myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, v. 18, n. 10, p. 1033-1045, out. 1986.

SEDARAT, F.; XU, L.; MOORE, E.D.W.; TIBBITS, G.F. Colocalization of dihydropyridine and ryanodine receptors in neonate rabbit heart using confocal microscopy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, p. H202–H209, 2000.

SILVA, J.; RUDY, Y. **Ionic mechanisms of ventricular action potential excitation**. In: Zipes DP, Jalife J (eds) *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*, Elsevier, Philadelphia, pp 317-328, 2009.

SNOPKO, R.M.; AROMOLARAN, A.S.; KARKO, K.L.; RAMOS-FRANCO, J.; BLATTER, L.A.; MEJÍA-ALVAREZ, R. Cell culture modifies Ca^{2+} signaling during excitation–contraction coupling in neonate cardiac myocytes. **Cell Calcium**, v. 41, n. 1, p. 13-25, jan. 2007.

SORIANO, D.C. **Modelo experimental e instrumentação para estudo da função do retículo sarcoplasmático no transporte de Ca^{2+} no coração**. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

SPACH, M.S.; HEIDLAGE, J.F.; DOLBER, P.C.; BARR, R.C. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. **Circ Res**, v. 86, n. 3, p. 302–311, fev. 2000.

SPACH, M.S.; KOOTSEY, J.M. Relating the sodium current and conductance to the shape of transmembrane and extracellular potentials by simulation: effects of propagation boundaries. **IEEE Trans Biomed Eng**, v. 32, p. 743–755, 1985.

SPERELAKIS; N. **Origin of resting membrane potentials**. In: Sperelakis N (ed) Cell physiology: source book, Academic Press, California, pp 67-90, 1995.

STERN, M.D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. **Biophys J**, v. 63, n. 2, p. 497–517, ago. 1992.

STOCKER, P.J.; BENNETT, E.S. Differential sialylation modulates voltage-gated Na⁺ channel gating throughout the developing myocardium. **J Gen Physiol**, v. 127, n. 3, p. 253-265, mar. 2006.

TORRES, N.S.; LARBIG, R.; ROCK, A.; GOLDHABER, J.I.; BRIDGE, J.H. Na⁺ currents are required for efficient excitation–contraction coupling in rabbit ventricular myocytes: a possible contribution of neuronal Na⁺ channels. **J Physiol**, v. 588, p. 4249-60, nov. 2010.

VARRO, A.; NEGRETTI, N.; HESTER, S.B.; EISNER, D.A. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. **Pflügers Archiv**, v. 423, p. 158–160, abr. 1993.

VERKERK; A.O.; WILDERS; R.; ZEGERS; J.G.; VAN BORREN; M.M.G.J.; RAVESLOOT; J.H.; VERHEIJCK; E.E. Ca²⁺ activated Cl⁻ current in rabbit sinoatrial node cells. **J Physiol**; v. 540; p. 105–117; abr. 2002.

VORNANEN; M. Contribution of sarcolemmal calcium current to total cellular calcium in post-natally developing rat heart. **Cardiovasc Res**; v. 32; n. 2; p. 400–410; ago. 1979.

WAHLER; G.M. Developmental increases in the inwardly rectifying potassium current of rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**; v. 262; n. 5; p. C1266-C1272; maio 1992.

WANG; L.; DUFF; H.J. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. **Circ Res**; v. 81; n. 1; p. 120–127; jul. 1997.

WANG; L; FENG; Z.P.; KONDO; C.S.; SHELDON; R.S.; DUFF; H.J. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. **Circ Res**; v. 79; n. 1; p. 79–85; jul. 1996

WANG; Y.; RUDY; Y. Action potential propagation in inhomogeneous cardiac tissue: safety factor considerations and ionic mechanism. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; v. 278; n. 4; p. H1019–H1029; abr. 2000.

WANG; L.J.; SOBIE; E.A. Mathematical model of the neonatal mouse ventricular action potential. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; v. 294; n. 6; p. H2565–H2575; jun. 2008.

WENZEL, D.G.; WHEATLEY, J.W.; DON BYRD, G. Effects of nicotine on cultured rat heart cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 17, p. 774–785, 1970.

WETZEL; G.T.; KLITZNER; T.S. Developmental cardiac electrophysiology recent advances in cellular physiology. **Cardiovasc Res**; v. 31; p. E52-E60; fev. 1996.

WOHLFART; B. Relationship between peak force; action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. **Acta Physiol Scand**; v. 106; n. 4; p. 395-409; ago. 1979.

XU; H.; DIXON; J.E.; BARRY; D.M.; TRIMMER; J.S.; MERLIE; J.P.; MCKINNON; D.; NERBONNE; J.M. Developmental analysis reveals mismatches in the expression of K⁺ channel α subunits and voltage-gated K⁺ channel currents in rat ventricular myocytes. **J Gen Physiol**; v. 108; n. 5; p. 405-419; nov. 1996.

XU; H.; GUO; W.; NERBONNE; J.M. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. **J Gen Physiol**; v. 113; n. 5; p. 661-677; maio 1999.

XU; Y.Q.; PICKOFF; A.S.; CLARKSON; S.W. Evidence for developmental changes in sodium channel inactivation gating and sodium channel block by phenytoin in rat cardiac myocytes. **Circ Res**; v. 69; n. 3; p. 644-656; set. 1991.

ZIMAN, A.P.; GÓMEZ-VIQUEZ, N.L.; BLOCH, R.J.; LEDERER, W.J. Excitation-contraction coupling changes during postnatal cardiac development. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 2, p. 379-386, fev. 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Modelo matemático de PA e transporte de Ca²⁺ em miócitos ventriculares de ratos neonatos: Valores das variáveis e dos parâmetros

Tabela A.1. Áreas e volumes calculados.

Parâmetro	Definição	Valor
A_s	Área de superfície do cilindro	$1,60849 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$
V_{mio}	Volume do mioplasma	$3,44167 \cdot 10^{-6} \mu\text{l}$
V_{RSJ}	Volume do retículo sarcoplasmático juncional	$0,18094 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$
V_{RSNJ}	Volume do retículo sarcoplasmático não-juncional	$0,31652 \cdot 10^{-6} \mu\text{l}$
V_{ss}	Volume do espaço subsarcolemático	$4,632 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$

Tabela A.2. Concentrações iônicas.

Parâmetro	Definição	Valor (μM)
$[\text{K}^+]_o$	Concentração extracelular de K^+	$6 \cdot 10^3$
$[\text{Na}^+]_o$	Concentração extracelular de Na^+	$14 \cdot 10^4$
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	Concentração extracelular de Ca^{2+}	$1 \cdot 10^3$
$[\text{Cl}^-]_o$	Concentração extracelular de Cl^-	$149 \cdot 10^3$
$[\text{Na}^+]_i$	Concentração intracelular de Na^+	$163 \cdot 10^2$
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração intracelular de Ca^{2+}	0,14
$[\text{K}^+]_i$	Concentração intracelular de K^+	$1,3645 \cdot 10^5$
$[\text{Cl}^-]_i$	Concentração intracelular de Cl^-	$3 \cdot 10^4$
$[\text{Ca}^{2+}]_{ss}$	Concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemático	0,1867
$[\text{Ca}^{2+}]_{RSJ}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático juncional	742,5417
$[\text{Ca}^{2+}]_{RSNJ}$	Concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático não-juncional	742,3063

Tabela A.3. Parâmetros relacionados ao RS.

Parâmetro	Definição	Valor
v_1	Permeabilidade máxima dos RyRs ao Ca^{2+}	1 ms^{-1}
v_2	Taxa de vazamento de Ca^{2+} do RS	$2,088 \cdot 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$
v_3	Velocidade máxima de captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS	$0,09 \mu\text{M} \cdot \text{ms}^{-1}$
$K_{m,up}$	Concentração na qual a velocidade de recaptação de Ca^{2+} pela SERCA é metade da máxima	$0,5 \mu\text{M}$
τ_{tr}	Constante de tempo de difusão do Ca^{2+} do RSNJ para o RSJ	100 ms
τ_{xfer}	Constante de tempo de difusão do Ca^{2+} do espaço subsarcolemático para o mioplasma	8 ms
k_a^+	Taxa de transição $P_{C1}-P_{O1}$ do RyR	$0,00608 \cdot \mu\text{M}^{-4} \cdot \text{ms}^{-1}$
k_a^-	Taxa de transição $P_{O1}-P_{C1}$ do RyR	$0,07125 \cdot \text{ms}^{-1}$
k_b^+	Taxa de transição $P_{O1}-P_{O2}$ do RyR	$0,00405 \cdot \mu\text{M}^{-3} \cdot \text{ms}^{-1}$
k_b^-	Taxa de transição $P_{O2}-P_{O1}$ do RyR	$0,965 \cdot \text{ms}^{-1}$
k_c^+	Taxa de transição $P_{O1}-P_{C2}$ do RyR	$0,009 \cdot \text{ms}^{-1}$
k_c^-	Taxa de transição $P_{C2}-P_{O1}$ do RyR	$0,0008 \cdot \text{ms}^{-1}$
n	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do RyR $P_{C1}-P_{O1}$	4
m	Parâmetro de cooperatividade de Ca^{2+} do RyR $P_{O1}-P_{O2}$	3
P_{O1}	Fração de RyRs no estado P_{O1}	$1,1 \cdot 10^{-3}$
P_{O2}	Fração de RyRs no estado P_{O2}	$2,9799 \cdot 10^{-8}$
P_{C1}	Fração de RyRs no estado P_{C1}	$0,8986$
P_{C2}	Fração de RyRs no estado P_{C2}	$0,1003$
P_{RyR}	Fator de modulação do RyR	$2,8603 \cdot 10^{-14}$
$[CSQ]_{tot}$	Concentração total de calsequestrina no RSJ	$15 \cdot 10^3 \mu\text{M}$
K_m^{CSQ}	Concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da calsequestrina é metade da máxima	$800 \mu\text{M}$

Tabela A.4. Parâmetros relacionados aos canais de Ca²⁺.

Parâmetro	Definição	Valor
\overline{G}_{CaL}	Condutância máxima do canal de Ca ²⁺ tipo-L	0,2653 mS/ μ F
E_{CaL}	Potencial de reversão da corrente de Ca ²⁺ tipo-L	48,35 mV
\overline{G}_{CaT}	Condutância máxima do canal de Ca ²⁺ tipo-T	0,05 mS/ μ F
E_{CaT}	Potencial de reversão da corrente de Ca ²⁺ tipo-T	47 mV
d	Parâmetro de ativação dos canais de Ca ²⁺ tipo-L	$56305 \cdot 10^{-8}$
f	Parâmetro de inativação dos canais de Ca ²⁺ tipo-L	0,5514
b	Parâmetro de ativação dos canais de Ca ²⁺ tipo-T	0,0201
g	Parâmetro de inativação dos canais de Ca ²⁺ tipo-T	0,8502
$K_{m,CaL}$	Concentração de Ca ²⁺ na qual a corrente de Ca ²⁺ tipo-L é a metade da saturante	0,6 μ M

Tabela A.5. Parâmetros relacionados ao canal de Na⁺.

Parâmetro	Definição	Valor
\overline{G}_{Na}	Condutância máxima do canal de Na ⁺	2 mS/ μ F
G_{Nab}	Potencial de reversão da corrente de Na ⁺ de <i>background</i>	0,0026 mS/ μ F
m	Parâmetro de ativação dos canais de Na ⁺	0,000524
h	Parâmetro de inativação dos canais de Na ⁺	0,9929

Tabela A.6. Parâmetros relacionados às correntes de K⁺ (transiente de saída (I_{to}), retificadora tardia (I_K) e retificadora de entrada (I_{K1})).

Parâmetro	Definição	Valor
\overline{G}_{to}	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I _{to}	0,0682 mS/ μ F
\overline{G}_K	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I _K	0,0854 mS/ μ F
\overline{G}_{K1}	Condutância máxima dos canais que medeiam a corrente I _{K1}	0,18 mS/ μ F
X	Parâmetro de ativação dos canais que medeiam a corrente I _K	0,000406
M	Parâmetro de ativação dos canais que medeiam a corrente I _{to}	0,00133

Tabela A.7. Parâmetros relacionados aos fluxos intracelulares de Ca^{2+} .

Parâmetro	Definição	Valor
$[LTnC]_{tot}$	Concentração total dos sítios de baixa afinidade da TnC	35 μM
$[HTnC]_{tot}$	Concentração total dos sítios de alta afinidade da TnC	70 μM
k_{hTnC}^+	Constante de associação aparente de Ca^{2+} aos sítios de alta afinidade da TnC	0,00237 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$
k_{hTnC}^-	Constante de dissociação aparente de Ca^{2+} dos sítios de alta afinidade da TnC	$3,2 \cdot 10^{-5} \text{ms}^{-1}$
k_{lTnC}^+	Constante de associação aparente de Ca^{2+} aos sítios de baixa afinidade da TnC	0,0327 $\mu\text{M}^{-3} \cdot \text{ms}^{-1}$
k_{lTnC}^-	Constante de dissociação aparente de Ca^{2+} dos sítios de baixa afinidade da TnC	0,0196 ms^{-1}
$[CAM]_{tot}$	Concentração total de calmodulina no mioplasma	25 μM
K_m^{CAM}	Concentração de Ca^{2+} na qual a ocupação dos sítios de ligação de Ca^{2+} da calmodulina é metade da máxima	0,238 μM
$[LTnCCa]$	$[\text{Ca}^{2+}]$ associada aos sítios de ligação de baixa afinidade presentes na TnC	8,922 μM
$[HTnCCa]$	$[\text{Ca}^{2+}]$ associada aos sítios de ligação de alta afinidade presentes na TnC	66,0407 μM

Tabela A.8. Parâmetros relacionados à corrente do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Parâmetro	Definição	Valor
k_{NaCa}	Fator de escalonamento da corrente do NCX	2000 pA/pF
$K_{m,Na}$	Concentração de Na^+ na qual I_{NCX} é a metade da saturante	87500 μM
$K_{m,Ca}$	Concentração de Ca^{2+} na qual I_{NCX} é a metade da saturante	1380 μM
k_{sat}	Fator de saturação do NCX em potenciais muito negativos	0,1
η	Parâmetro de controle da dependência de tensão do NCX	0,35

Tabela A.9. Parâmetros relacionados à corrente da ATPase Na^+/K^+

Parâmetro	Definição	Valor
$I_{\text{NaK}}^{\text{máx}}$	Corrente máxima da ATPase Na^+/K^+	0,88 pA/pF
$K_{m,\text{Na}}$	Concentração de Na^+ na qual a corrente I_{NaK} é a metade da corrente saturante	21000 μM
$K_{m,\text{K}}$	Concentração de K^+ na qual a corrente I_{NaK} é a metade da corrente saturante	1500 μM

Tabela A.10. Parâmetros relacionados à corrente de Ca^{2+} do sarcolema

Parâmetro	Definição	Valor
$I_{p(\text{Ca})}^{\text{máx}}$	Corrente máxima da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema	0,2 pA/pF
$K_{m,p(\text{Ca})}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente $I_{p(\text{Ca})}$ é a metade da saturante	0,5 μM

Tabela A.11. Parâmetros relacionados à corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}

Parâmetro	Definição	Valor
$P_{\text{Cl,Ca}}$	Permeabilidade do canal que medeia a corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}	$2,74 \cdot 10^{-7}$ cm/s
$K_{m,\text{Cl}}$	Concentração de Ca^{2+} na qual a corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+} é metade da saturante	4 μM
$n_{\text{Cl,Ca}}$	Expoente de Hill da corrente de Cl^- ativada por Ca^{2+}	3

Tabela A.12. Parâmetros gerais

Parâmetro	Definição	Valor
C_m	Capacitância específica de membrana	1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
F	Constante de Faraday	96,5 C/mmol
T	Temperatura absoluta	298 K
R	Constante universal dos gases	8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹
E_m	Potencial de membrana	73 mV

APÊNDICE B – Modelo matemático de PA e transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de ratos neonatos: Equações

B.1 DINÂMICA DE Ca^{2+}

B.1.1 Fluxos intracelulares de Ca^{2+}

$$J_{rel} = v_1 (P_{O1} + P_{O2}) P_{RyR} \left([Ca^{2+}]_{RSJ} - [Ca^{2+}]_{ss} \right)$$

$$J_{tr} = \frac{[Ca^{2+}]_{RSNJ} - [Ca^{2+}]_{RSJ}}{\tau_{tr}}$$

$$J_{xfer} = \frac{[Ca^{2+}]_{ss} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_{xfer}}$$

$$J_{leak} = v_2 \left([Ca^{2+}]_{RSNJ} - [Ca^{2+}]_i \right)$$

$$J_{up} = v_3 \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,up}^2 + [Ca^{2+}]_i^2}$$

B.1.2 Armazenamento de Ca^{2+}

$$B_i = \left\{ 1 + \frac{[CAM]_{tot} K_m^{CAM}}{\left(K_m^{CAM} + [Ca^{2+}]_i \right)^2} \right\}^{-1}$$

$$B_{ss} = \left\{ 1 + \frac{[CAM]_{tot} K_m^{CAM}}{(K_m^{CAM} + [Ca^{2+}]_{ss})^2} \right\}^{-1}$$

$$B_{RSJ} = \left\{ 1 + \frac{[CSQ]_{tot} K_m^{CSQN}}{(K_m^{CSQN} + [Ca^{2+}]_{RSJ})^2} \right\}^{-1}$$

$$J_{irpn} = \frac{d[LTnCCa]}{dt} + \frac{d[HTnCCa]}{dt}$$

$$\frac{d[LTnCCa]}{dt} = k_{LTnC}^+ [Ca^{2+}]_i ([LTnC]_{tot} - [LTnCCa]) - k_{LTnC}^- [LTnCCa]$$

$$\frac{d[HTnCCa]}{dt} = k_{HTnC}^+ [Ca^{2+}]_i ([HTnC]_{tot} - [HTnCCa]) - k_{HTnC}^- [HTnCCa]$$

B.1.3 Chaveamento dos receptores de rianodina

$$\frac{dP_{O1}}{dt} = k_a^+ [Ca^{2+}]_{ss}^n P_{C1} - k_a^- P_{O1} - k_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{O1} + k_b^- P_{O2} - k_c^+ P_{O1} + k_c^- P_{C2}$$

$$\frac{dP_{O2}}{dt} = k_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{O1} - k_b^- P_{O2}$$

$$P_{C1} = 1 - (P_{C2} + P_{O1} + P_{O2})$$

$$\frac{dP_{C2}}{dt} = k_c^+ P_{O1} - k_c^- P_{C2}$$

$$\frac{dP_{RyR}}{dt} = -0,04 P_{RyR} - 0,1 \frac{I_{CaL}}{I_{CaL,max}} e^{-(E_m - 5)^2 / 648}$$

B.1.4 Concentrações de Ca^{2+}

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} = B_i (J_{leak} + J_{xfer} - J_{up} - J_{lrpn})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{ss}}{dt} = B_{ss} \left\{ J_{rel} \frac{V_{RSJ}}{V_{ss}} - J_{xfer} \frac{V_{myo}}{V_{ss}} - (I_{CaL} + I_{Cab} - 2I_{NaCa} + I_{p(Ca)} + I_{CaT}) \frac{A_s C_m}{2V_{ss} F} \right\}$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{RSJ}}{dt} = B_{RSJ} (J_{xfer} - J_{rel})$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{RSNJ}}{dt} = (J_{up} - J_{leak}) \frac{V_{myo}}{V_{RSNJ}} - J_{tr} \frac{V_{RSJ}}{V_{RSNJ}}$$

B.1.5 Corrente de Ca^{2+} tipo-L

$$I_{CaL} = \overline{G_{CaL}} \cdot d \cdot f \cdot f_{Ca} \cdot (E_m - E_{CaL})$$

$$f_{Ca} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{K_{m,CaL}} \right)^2}$$

$$\alpha_d = \frac{0,08 \cdot (E_m + 9)}{1 - e^{-(E_m + 9)/8,24}}$$

$$\beta_d = \frac{0,035 \cdot (E_m + 9) \cdot e^{-(E_m + 9)/8,24}}{1 - e^{-(E_m + 9)/8,24}}$$

$$d_\infty = \frac{\alpha_d}{\alpha_d + \beta_d}$$

$$\frac{dd}{dt} = \alpha_d \cdot (1 - d) - \beta_d \cdot d$$

$$\alpha_f = \frac{0,001 + e^{(2-E_m)/60}}{\left(5 + e^{(E_m+30,06)/20,6}\right) \cdot \left(0,001 + e^{(2-E_m)/60}\right)}$$

$$\beta_f = \frac{0,6 \cdot \left(5 + e^{(E_m+30,06)/20,6}\right)}{\left(5 + e^{(E_m+30,06)/20,6}\right) \cdot \left(0,001 + e^{(2-E_m)/60}\right)}$$

$$f_\infty = \frac{\alpha_f}{\alpha_f + \beta_f}$$

$$\frac{df}{dt} = \alpha_f \cdot (1 - f) - \beta_f \cdot f$$

B.1.6 Corrente de Ca²⁺ tipo-T

$$I_{CaT} = \overline{G_{CaT}} \cdot b \cdot g \cdot (E_m - E_{CaT})$$

$$\alpha_b = \frac{e^{(E_m-8)/22}}{15,5 + e^{(E_m-8)/22}}$$

$$\beta_b = \frac{1}{15,5 + 0,1 \cdot e^{(E_m-8)/22}}$$

$$b_\infty = \frac{\alpha_b}{\alpha_b + \beta_b}$$

$$\frac{db}{dt} = \alpha_b \cdot (1 - b) - \beta_b \cdot b$$

$$g_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(E_m + 66)/6,6}}$$

$$\tau_g = 8 + \frac{32}{1 + e^{(E_m + 65)/5}}$$

$$g_{\infty} = \frac{\alpha_g}{\alpha_g \cdot + \beta_g}$$

$$\tau_g = \frac{1}{\alpha_g \cdot + \beta_g}$$

$$\frac{dg}{dt} = \alpha_g \cdot (1 - g) - \beta_g \cdot g$$

B.1.7 Corrente de Ca^{2+} de *background*

$$I_{Cab} = G_{Cab} \cdot (E_m - E_{CaN})$$

$$E_{CaN} = \frac{R \cdot T}{2 \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right)$$

B.1.8 Corrente da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema

$$I_{p(Ca)} = I_{p(Ca)}^{\max} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,p(Ca)}^2 + [Ca^{2+}]_i^2}$$

B.1.9 Corrente do trocador Na⁺/Ca²⁺

$$I_{NCX} = k_{NCX} \cdot \frac{1}{K_{m,Na}^3 + [Na^+]_o^3} \cdot \frac{1}{K_{m,Ca} + [Ca^{2+}]_o} \cdot \frac{1}{1 + k_{sat} \cdot e^{(\eta-1)E_m \cdot F/RT}} \cdot \left[e^{\eta \cdot E_m \cdot F/RT} \cdot [Na^+]_i^3 \cdot [Ca^{2+}]_o - e^{(\eta-1)E_m \cdot F/RT} \cdot [Na^+]_o^3 \cdot [Ca^{2+}]_i \right]$$

B.2 DINÂMICA DE Na⁺

B.2.1 Concentração intracelular de Na⁺

$$\frac{d[Na^+]_i}{dt} = -(I_{Na} + I_{Nab} + 3 \cdot I_{NCX} + 3 \cdot I_{NaK}) \cdot \frac{A_s C_m}{V_{mio} \cdot F}$$

B.2.1 Corrente de Na⁺

$$I_{Na} = \overline{G_{Na}} \cdot m^3 \cdot h \cdot (E_m - E_{Na})$$

$$E_{Na} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)$$

$$\alpha_m = \frac{0,35 \cdot (E_m + 50,13)}{1 - e^{-0,1 \cdot (E_m + 50,13)}}$$

$$\beta_m = 0,07 \cdot e^{-E_m/7,9}$$

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1 - m) - \beta_m \cdot m$$

Para $E_m \geq -40$ mV:

$$\alpha_h = 0$$

Para $E_m < -40$ mV:

$$\alpha_h = 1,8 \cdot e^{-(E_m + 80)/6,8}$$

$$\beta_h = 4 \cdot e^{0,079 \cdot E_m} + 310000 \cdot e^{0,35 \cdot E_m}$$

$$h_\infty = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h}$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h$$

B.2.2 Corrente de Na⁺ de *background*

$$I_{Nab} = G_{Nab} \cdot (E_m - E_{Na})$$

B.3 DINÂMICA DE K⁺

B.3.1 Concentração intracelular de K⁺

$$\frac{d[K^+]_i}{dt} = -(I_{to} + I_K + I_{K1} - 2 \cdot I_{NaK}) \cdot \frac{A_S C_m}{V_{mio} \cdot F}$$

B.3.2 Corrente transiente de saída de K⁺

$$I_{to} = \overline{G_{to}} \cdot M \cdot H \cdot (E_m - E_K)$$

$$E_K = \left(\frac{R \cdot T}{F} \right) \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right)$$

$$H = 2,1 / (1 + e^{(E_m + 85)/30})$$

$$\alpha_M = \frac{8}{1 - e^{-(E_m - 47)/20}}$$

$$\beta_M = \frac{2,7}{1 + e^{(E_m + 85)/29,5}}$$

$$M_\infty = \frac{\alpha_M}{\alpha_M + \beta_M}$$

$$\frac{dM}{dt} = \alpha_M \cdot (1 - M) - \beta_M \cdot M$$

B.3.3 Corrente retificadora tardia de K⁺

$$I_K = \overline{G_K} \cdot X_i \cdot X^2 \cdot (E_m - E_K)$$

$$X_i = 1,5 / (1 + e^{(E_m + 60)/32,1})$$

$$\alpha_x = 0,0002 \cdot \frac{E_m + 22}{1 - e^{-0,148 \cdot (E_m + 22)}}$$

$$\beta_x = 0,000131 \cdot \frac{E_m + 22}{-1 + e^{0,0687 \cdot (E_m + 22)}}$$

$$X_\infty = \frac{\alpha_x}{\alpha_x + \beta_x}$$

$$\frac{dX}{dt} = \alpha_x \cdot (1 - X) - \beta_x \cdot X$$

B.3.3 Corrente retificadora de entrada de K⁺

$$I_{K1} = \overline{G_{K1}} \cdot \frac{[K^+]_o}{210 + [K^+]_o} \cdot \left(\frac{E_m - E_K}{1 + e^{0,0896(E_m - E_K)}} \right)$$

B.3.3 Corrente da ATPase Na⁺/K⁺

$$I_{NaK} = I_{NaK}^{\max} \cdot \frac{f_{NaK}}{1 + (K_{m,Na} / [Na^+]_i)^{1,5}} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{m,Ko}}$$

$$f_{NaK} = \frac{1}{1 + 0,1245 \cdot e^{-0,1 \cdot E_m \cdot F / R \cdot T} + 1 + 0,0365 \cdot \frac{1}{7} \cdot \left(e^{[Na^+]_o / 67300} - 1 \right) e^{-E_m \cdot F / R \cdot T}}$$

B.4 CORRENTE DE Cl⁻ ATIVADA POR Ca²⁺

$$I_{Cl,Ca} = P_{Cl,Ca} \cdot f_{Cl,Ca} \cdot \left(\frac{E_m \cdot F^2}{R \cdot T} \right) \cdot \left[\frac{[Cl^-]_o \cdot e^{E_m \cdot F / RT} - [Cl^-]_i}{e^{E_m \cdot F / RT} - 1} \right]$$

$$f_{Cl,Ca} = \left(\frac{[Ca^{2+}]_{ss}}{K_{m,Cl} + [Ca^{2+}]_{ss}} \right)^{n_{Cl,Ca}}$$

B.5 POTENCIAL DE MEMBRANA

$$\frac{dE_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} \cdot (I_{stim} + I_{ion})$$

$$I_{ion} = I_{Na} + I_{Nab} + I_{CaL} + I_{CaT} + I_{Cab} + I_{p(Ca)} + I_{NCX} + I_{NaK} + I_{to} + I_K + I_{K1} + I_{Cl,Ca}$$

ANEXOS

ANEXO A – Certificado nº 2490-1 (D) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos: Modelo matemático do transporte de calcio em miócitos cardíacos" (protocolo nº 2490-1 (D)), sob a responsabilidade de José W.M. Bassani e Rosana A. Bassani / Natalia Ferreira Oshyama, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

Campinas, 15 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO B – Certificado nº 2491-1 (B) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



CEUA/Unicamp

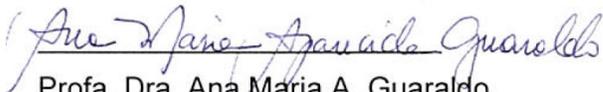
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

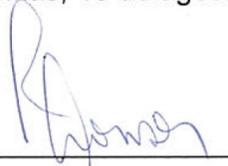
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Isolamento de preparações miocárdicas de ratos imaturos: Regulação adrenérgica do cronotropismo atrial e do inotropismo ventricular durante o desenvolvimento pós-natal de ratos" (protocolo nº 2491-1 (B)), sob a responsabilidade de Dra. Rosana A. Bassani, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

Campinas, 15 de agosto de 2011.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO C – Certificado nº 2587-1 (C) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

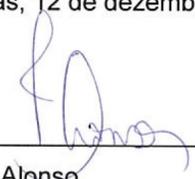
Certificamos que o projeto "**C. Modelo matemático do transporte de calcio em miócitos cardíacos**" (protocolo nº **2587-1 (C)**), sob a responsabilidade de **José W.M. Bassani / Rosana A. Bassani / Natalia Ferreira Oshyama**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

Campinas, 12 de dezembro de 2011.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO D – Certificado nº 2588-1 (C) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



CEUA/Unicamp

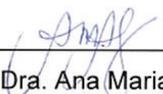
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

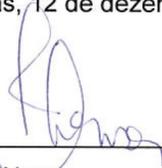
Certificamos que o projeto "**C.Modelo matemático do transporte de calcio em miócitos cardíacos**" (protocolo nº **2588-1 (C)**), sob a responsabilidade de **José W.M. Bassani / Rosana A. Bassani / Natalia Ferreira Oshyama**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

Campinas, 12 de dezembro de 2011.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO E – Certificado nº 2941-1 (A) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



CEUA/Unicamp

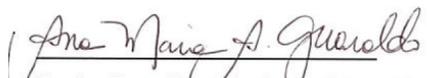
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

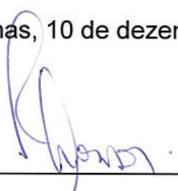
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Modelo matemático do transporte de calcio em miócitos cardíacos**" (protocolo nº **2941-1(A)**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani / Dra. Rosana Bassani / Natalia Ferreira Oshiyama**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **10 de dezembro de 2012**.

Campinas, 10 de dezembro de 2012.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO F – Certificado nº 2942-1 (A) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP



CEUA/Unicamp

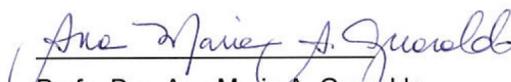
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

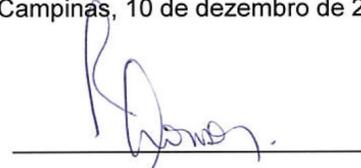
Certificamos que o projeto "**Modelo matemático do transporte de calcio em miócitos cardíacos**" (protocolo nº **2942-1(A)**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani / Dra. Rosana Bassani / Natalia Ferreira Oshiyama**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **10 de dezembro de 2012**.

Campinas, 10 de dezembro de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva