Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
Departamento de Engenharia Biomédica

Dissertação de Mestrado

Liberação fracional de Ca^{2+} no modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado: experimentação e modelamento matemático

Aluno: Marina Carneiro Monteiro

Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Co-orientadora: Profª. Drª. Rosana Almada Bassani

Trabalho apresentado à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Campinas, 2011

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

M764L

Monteiro, Marina Carneiro
Liberação fracional de Ca2+ no modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado: experimentação e modelamento matemático / Marina Carneiro Monteiro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana Almada Bassani.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Miócitos cardiacos. 2. Cafeína. 3. Tetracaína. 4. Modelo matemático. 5. Retículo sarcoplasmático. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Fractional Ca2+ release in the model of the functionally isolated sarcoplasmic reticulum: experimentation and mathematical modeling
Palavras-chave em Inglês: Cardiac myocytes, Caffeine, Tetracaine, Mathematical model, Sarcoplasmic reticulum
Área de concentração: Engenharia Biomédica
Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica
Banca examinadora: Maria Júlia Marques, Eduardo Tavares Costa
Data da defesa: 16-12-2011
Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Marina Carneiro Monteiro

Data da Defesa: 16 de dezembro de 2011

Título da Tese: "Liberação fracional de Ca2+ no modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado: experimentação e modelamento matemático"

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

Profa. Dra. Maria Julia Marques: _____

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa: _____

“É a vida, é bonita”
Gonzaguinha

Dedico este trabalho a meus queridos e admiráveis pais,
Maurílio e Maria Geralda.

Agradecimentos

Aos meus pais, Maurílio Pereira Monteiro e Maria Geralda C. Monteiro, aos meus irmãos, Ana Carolina C. Monteiro e Lucas A. C. Monteiro, aos meus tios, Pedro Marques Carneiro e Maria Aparecida Carneiro, pelo imenso amor e por sempre confiarem em mim.

Aos Profs. José Wilson M. Bassani e Rosana A. Bassani pela orientação, exemplo, paciência e amizade.

Ao amigo Diogo C. Soriano, pelo apoio no uso da instrumentação e do software Matlab e pelas conversas motivadoras.

À bióloga Elizângela S. de Oliveira, pelo preparo dos miócitos e soluções e pela presteza e paciência no ensino de técnicas de laboratório e isolamento dos miócitos.

Ao Prof. Pedro X. de Oliveira, pelo suporte no uso do Matlab e prontidão em ajudar.

Aos funcionários e estagiários do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, em especial às secretárias Adriana Chaves Cavalcanti e Larissa Rossi Kaschel, ao Engenheiro Sérgio P. Moura, a Márcia de Almeida Queiroz e aos técnicos Carlos Alberto Lourenço da Silva, Mauro Sérgio Martinazzo e Renato da Silva Moura, pelo apoio técnico.

Aos colegas e amigos de laboratório, pela constante ajuda e conselhos: Alexandra V. S. da Fonseca, Rafael de Almeida Ricardo, Jair Trapé Goulart, Natália Ferreira Oshiyama, Arnaldo Fim Neto, Ana Letícia F. de Moraes, Danielle Ferreira Feliciano, Marcelo de A. Viana, Hélcio Ferreira Sarabando, Olívia Campos Coiado, Luiza N. S. do Prado, Marcelo S. da Rocha.

Aos amigos, por dividir os receios e multiplicar as alegrias, de longe e de perto.

Ao meu sobrinho Caio Monteiro Froes, pela motivadora curiosidade.

Apoio

Este trabalho teve apoio do CNPq (Proc. nº 135205/2008-5).

Resumo

A fração do conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) liberada a cada contração (*Fractional Release* – FR) em miócitos cardíacos é regulada pela corrente de entrada de Ca^{2+} através da membrana celular pelos canais de Ca^{2+} tipo-L ($I_{Ca,L}$) e pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$). Em trabalho anterior foi desenvolvido, no nosso laboratório, um modelo experimental denominado de modelo do RS funcionalmente isolado (MRSFI). Neste modelo, cardiomiócitos são perfundidos em solução sem Na^+ e sem Ca^{2+}, o que torna as suas membranas eletricamente inexcitáveis e inibe o transporte do íon pelo trocador Na^+/Ca^{2+}. As variações (transientes) da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) medidas com o indicador fluorescente Fluo-3 AM (5 µM, 20 min, 24ºC) são evocadas por aplicação de pulsos rápidos (100 ms) de cafeína (10 mM). No presente trabalho, o MRSFI foi usado para estudo da relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ na ausência do gatilho fisiológico ($I_{Ca,L}$) para liberação reticular de Ca^{2+}. Após depleção do conteúdo de Ca^{2+} do RS pela aplicação prolongada de cafeína, foram aplicados diferentes números de estímulos elétricos nos miócitos para recarregar a organela com diferentes $[Ca^{2+}]_{RS}$ (de 55,3 ± 10,0 a 123,0 ± 10,3 µM, $p < 0,05$). A variação total de Ca^{2+} celular foi calculada pela adição da variação do Ca^{2+} livre à variação do Ca^{2+} ligado aos *buffers* (ligantes passivos, B) intracelulares (miofilamentos + fluo-3), ou seja, $\Delta[Ca^{2+}]_T = \Delta[Ca^{2+}]_i + \Delta[Ca^{2+}]_B$. A $\Delta[Ca^{2+}]_T$ evocada pelos pulsos rápidos de cafeína foi dividida pelo $[Ca^{2+}]_{RS}$, para estimativa da FR, que variou com $[Ca^{2+}]_{RS}$ (de 5,4 ± 5,4 a 82,8 ± 7,2 %, $p < 0,05$) de modo não-linear, similar ao já descrito em miócitos cujo gatilho da liberação de Ca^{2+} foi $I_{Ca,L}$. Este comportamento foi encontrado também *in silico* pelo uso de um modelo da dinâmica do Ca^{2+} intracelular que simula o MRSFI, acrescido de descrições de *buffers* de Ca^{2+} intrarreticular e citosólico. Associada à relação de FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtida pelo modelo matemático, a comparação de transientes da $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulado indicou que a introdução dos *buffers* resultou em simulações mais realistas do comportamento de miócitos cardíacos. Como complemento ao entendimento da liberação de Ca^{2+} pelo RS, o MRSFI foi aplicado ao estudo do efeito da tetracaína (20, 50 ou 100 µM), inibidor da liberação de Ca^{2+} do RS, sobre a FR. A concentração do fármaco que causou 50 % da inibição máxima sobre FR (IC_{50}) foi de 51,8 ± 6,2 µM. Assim, com o uso do MRSFI, pode ser estimado o efeito da tetracaína sobre a liberação de Ca^{2+} do RS em células intactas sem alterações desta liberação decorrentes da ação da droga sobre a excitabilidade da célula.

Abstract

The fraction of the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} content released at a twitch (Fractional Release – FR) in cardiac myocytes is regulated by the transmembrane inward Ca^{2+} current through the L-type Ca^{2+} channel ($I_{Ca,L}$) and by the SR Ca^{2+} content ($[Ca^{2+}]_{SR}$). In the experimental model of the functionally isolated SR model (FISRM), previously developed in this laboratory, cardiomyocytes are perfused with Na^+, Ca^{2+}-free solution, which makes the cells electrically unexcitable and thermodynamically inhibits the sarcolemmal Na^+/Ca^{2+} exchanger. Variations in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured with the Ca^{2+} indicator fluo-3 and Ca^{2+} transients due to SR release are evoked by pulse-like (100 ms duration) application of 10 mM caffeine. In the present work, the FISRM was used to study the relationship between FR and $[Ca^{2+}]_{SR}$ in the absence of $I_{Ca,L}$, the physiological trigger for the release of Ca^{2+} from the SR. After SR Ca^{2+} depletion by prolonged application of caffeine, 1-20 electrical stimuli were applied to reload the organelle with different $[Ca^{2+}]_{SR}$ (from 55.3 ± 10.0 to 123.0 ± 10.3 μM, $p < 0.05$). The total $[Ca^{2+}]$ variation during transients ($\Delta[Ca^{2+}]_T$) was estimated from the measured $[Ca^{2+}]_i$ and the Ca^{2+} buffering parameters previously determined, including fluo-3. The $\Delta[Ca^{2+}]_T$ evoked by the caffeine pulses was divided by $[Ca^{2+}]_{SR}$ to estimate FR, which showed a non-linear relationship with $[Ca^{2+}]_{SR}$ (ranging from 5.4 ± 5.4 to 82.8 ± 7.2 %, $p < 0.05$), as previously described in cardiac myocytes in which SR Ca^{2+} released was induced by $I_{Ca,L}$. This behavior was also observed *in silico*, with a model of the intracellular Ca^{2+} dynamics which simulates the FISRM, after inclusion of intra-SR and cytosolic Ca^{2+} buffers. It was possible to observe that the introduction of the buffers resulted in more realistic simulations. In addition, the FISRM was applied to the study of the effect of tetracaine, a putative SR Ca^{2+} release inhibitor, on FR. The tetracaine concentration that caused 50% inhibition of FR (IC_{50}) was 51.8 ± 6.2 μM. The FISRM may thus be a useful experimental model to investigate in intact cells the selective effects on SR Ca^{2+} release of drugs that may also affect sarcolemmal currents, which is the case of tetracaine.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Transporte de Ca^{2+} durante excitação elétrica e contração de miócito cardíaco de mamíferos. RyR: receptor de rianodina; RS: retículo sarcoplasmático; $I_{Ca,L}$: corrente de Ca^{2+} tipo-L; NCX: trocador Na^{+}-Ca^{2+}; ATP: ATPase de Ca^{2+}. Modificado de Bers, 2002. 2

Figura 1.2: Modelo experimental do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado. Caf: cafeína; RyR: receptor de rianodina; RS: retículo sarcoplasmático; ATP: ATPase de Ca^{2+}. Modificado de Soriano, 2007. 4

Figura 1.3: Estados dos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, segundo modelo matemático de Tang & Othmer (1994). L_i é a taxa de associação (para valores positivos de i) ou de dissociação (para valores negativos de i) de Ca^{2+} aos sítios reguladores do canal. 6

Figura 3.1: Câmara de perfusão de miócitos (PI 0302.403-2). Modificado de Soriano, 2007. 10

Figura 3.2: Instrumentação para medição da $[Ca^{2+}]_i$ – 1: LED azul de alta potência; 2: lentes e filtro passa-faixa de excitação; 3: espelho dicróico; 4: lente objetiva de 40 X; 5: câmara de perfusão; 6: LED vermelho; 7: espelho refletor de vermelho; 8: câmera CCD (*charge coupled device*); 9: obturador (*shutter*) com fenda retangular; 10: filtro passa-faixa de emissão; 11: tubo fotomultiplicador. Modificado de Soriano *et al.*, 2007b. 11

Figura 3.3: Sistema de troca rápida de soluções – 1: Ponta perfusora; 2: Micromanipulador; 3: Válvula solenóide; 4: câmara de perfusão 13

Figura 3.4: Esquema do sistema de troca rápida de soluções – A: Ponta perfusora com dois lumens para aplicação de Caf00 e Tyr00 posicionada em região da lamínula próxima à lente objetiva; B: Vista superior do sistema de troca rápida de soluções. 14

Figura 3.5: Protocolo experimental para estudo de relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$: Após aplicação prolongada de Caf00 (não mostrada), foram aplicados diferentes números de estímulos elétricos (estão mostrados 20 estímulos, traços verticais na linha inferior), na presença de TyN. A aplicação de Tyr00 por 30 s foi seguida por: A) aplicação prolongada (>1 min) de Caf00 ou B) pulsos de Caf00

(setas pretas) alternadamente com Tyr00 pela ponta perfusora. Antes da estimulação elétrica (EE) dos miócitos, foi feita perfusão com solução TyN, por 1 min. 16

Figura 3.6: Protocolo experimental para estudo do efeito da tetracaína sobre liberação de Ca^{2+} do RS. Inicialmente, foi feita a aplicação de estímulos elétricos (EE: traços verticais na linha horizontal inferior) e perfusão dos miócitos com TyN por 3 min. Em seguida, foi feita a aplicação de pulsos de cafeína (setas pretas) alternadamente com: (A) Tyr00 (situação controle) ou (B) Tyr00 contendo tetracaína (TTC). Foi aplicada Tyr00 por 2 min para lavagem da tetracaína antes da aplicação prolongada (>1 min) de cafeína. 17

Figura 3.7: Modelo simplificado dos mecanismos envolvidos na dinâmica do transporte de Ca^{2+} no miócito cardíaco. SLT: conjunto de transportadores transarcolema deste íon; RS: retículo sarcoplasmático; MF: miofilamentos; SL: sarcolema; ATP: ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA); vazamento: fluxos de vazamento de Ca^{2+} transarcolema e entre RS e citosol. Modificado de Tang & Othmer (1994). 18

Figura 4.1: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por estimulação elétrica (EE; 20 estímulos) em TyN, seguidos por: (A) transiente gerado por aplicação prolongada de cafeína ou (B) transientes evocados por pulsos de cafeína (setas) em Tyr00. 24

Figura 4.2: Média ± erro padrão da média dos conteúdos de Ca^{2+}do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) estimados como função do número de estímulos elétricos aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Uma função exponencial foi ajustada aos pontos com k = 0,318 ± 0,078 e platô = 118 ± 8,54 µM. 25

Figura 4.3: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por estimulação elétrica (EE) com 7 estímulos durante perfusão com TyN seguidos por 3 transientes gerados pela aplicação de 5 pulsos de cafeína (setas) em Tyr00. 26

Figura 4.4: Média ± erro padrão da média do número de transientes gerados pelos 5 pulsos de cafeína e do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$), seguindo a aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após depleção de Ca^{2+} do RS. A função exponencial ajustada ao número de transientes gerados apresentou: k = 0,115 ± 0,061 e platô = 4,95 ± 1,09 27

Figura 4.5: Média ± erro padrão da média das amplitudes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) gerados por estimulação elétrica (quadrados brancos) e por pulsos de cafeína (quadrados pretos) em função dos números de estímulos elétricos aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Círculos pretos: conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$). Exponenciais foram ajustadas às $\Delta[Ca^{2+}]_i$ obtidos pela estimulação elétrica (k = 0,114 ± 0,066 e platô = 0,525 ± 0,14 µM) e pelos pulsos de cafeína (k = 0,113 ± 0,090 e platô = 0,757 ± 0,252 µM)..... 28

Figura 4.6: Média ± erro padrão da média da concentração diastólica de Ca^{2+} no citosol ($[Ca^{2+}]_d$) em resposta à aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após depleção do RS. 29

Figura 4.7: Média ± erro padrão da liberação fracional de Ca^{2+} (FR) *versus* média ± erro padrão do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) calculados neste trabalho (círculos brancos). Mostrados também FR ativada por corrente de Ca^{2+} tipo-L encontradas por Bassani *et al*. (1995; quadrados pretos) e por Shannon *et al.* (2000a; triângulos cinzas). Funções sigmóides foram ajustadas aos pontos obtidos neste trabalho (linha contínua; EC50 = 103 ± 7,8 µM e Hill slope = 0,027) e por Shannon *et al.* (2000a; linha tracejada; EC50 = 105,3 ± 0,05 µM e Hill slope = 0,025)..... 30

Figura 4.8: Transientes de Ca^{2+} gerados por estimulação elétrica (EE) seguidos por transientes evocados por pulsos de cafeína (setas) alternados com: (A) Tyr00 ou (B) Tyr00 contendo 20 µM de tetracaína (TTC). Em seguida, é mostrado transiente de $[Ca^{2+}]_i$ gerado pela aplicação prolongada de cafeína em meio sem tetracaína..... 31

Figura 4.9: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} (FR) durante a aplicação do 5º pulso de cafeína na presença de diferentes concentrações de tetracaína ([TTC])..... 33

Figura 4.10: Média ± erro padrão da média do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) após pulsos de cafeína em diferentes concentrações de tetracaína ([TTC])..... 34

Figura 4.11: Média ± erro padrão da média da inibição da liberação fracional de Ca^{2+}, calculada como a diferença entre liberação fracional na situação controle (FR_{ctr}) e liberação fracional na presença de tetracaína (FR_{TTC}) dividida por FR_{ctr}, em função da concentração de tetracaína ([TTC]). Função sigmóide ajustada aos pontos: coeficiente de Hill = 0,05 e IC_{50} = 51,83 ± 013 µM..... 35

Figura 4.12: A) Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por simulação de MRSFI de acordo com modificações de modelo matemático de Tang & Othmer (1994) sugeridas por Soriano *et al.* (2007a); B) Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ simulado em escala temporal ampliada sobreposto ao transiente obtido por MRSFI experimental. 36

Figura 4.13: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulados foram sobrepostos (A e B) e normalizados para comparação temporal (B)..... 37

Figura 4.14: Conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) em função da concentração inicial de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$) no modelo sem e com as descrições dos *buffers* de Ca^{2+} para diferentes valores de $B_{max\text{-}RS}$. 39

Figura 4.15: Transientes evocados pelos pulsos de cafeína (setas) e oscilações espontâneas de $[Ca^{2+}]_i$ em modelo contendo *buffers* para $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ = 75 µM ($B_{max\text{-}RS}$ = 1800 µM)..... 40

Figura 4.16: Simulação do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no modelo contendo *buffers* de Ca^{2+} no interior do RS e no citoplasma (parâmetros do *buffer* intrarreticular: B_{max} = 1800 µM; k_{on} = 0,55 $\mu M^{-1}s^{-1}$; k_{off} = 650 s^{-1}; parâmetros do *buffer* citosólico: B_{max} = 3 µM; k_{on} = 1 $\mu M^{-1}s^{-1}$; k_{off} = 0,8 s^{-1}; $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ = 60 µM. Liberação fracional de Ca^{2+} (FR) foi equivalente à razão entre redução máxima de $[Ca^{2+}]_{RS}$ durante pulso de cafeína (B) e $[Ca^{2+}]_{RS}$ no repouso (A). 41

Figura 4.17: Liberação fracional de Ca^{2+} (FR) em função do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no MRSFI simulado pelo modelo sem e com os *buffers* de Ca^{2+}, para 3 valores de $B_{max\text{-}RS}$: 1400, 1800 e 2000 µM. Sigmóides ajustada aos pontos obtidos pelo modelo com *buffers* de Ca^{2+} para valores de $B_{max\text{-}RS}$ de 1400, 1800 e 2000 µM apresentaram Hill slope de 0,046, 0,040 e 0,042, respectivamente, e nível de estabilização de FR de 58,7, 60,0 e 56,2 %, respectivamente. 42

Figura 4.18: Comparação das relações entre liberação fracional de Ca^{2+} (FR) e conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) *in vitro* e *in silico* ($B_{max\text{-}RS}$ = 1800 µM). As funções sigmóides ajustadas aos pontos *in vitro* e *in silico* apresentaram Hill slope de 0,027 e 0,040, respectivamente, e nível de saturação de FR de 107,4 % e 60,0 %, respectivamente. 43

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Valores usados por Soriano et al (2007a) para as taxas de dissociação e associação dos sítios reguladores dos RyR ao Ca^{2+} na ausência e presença de cafeína. As taxas foram alteradas de modo a favorecer a permanência dos RyR no estado aberto para simulação do pulso de cafeína. 20

Tabela 3.2: Valores dos parâmetros do modelo matemático usados por Tang & Othmer (1994) e por Soriano (2007) para simulação do MRSFI 21

Tabela 3.3: Valores dos parâmetros das formulações dos *buffers* intrarreticular e citosólico utilizados 22

Tabela 4.1: Média ± erro padrão da média dos conteúdos de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$; em µM) estimados como função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. n: número de células usadas; p: obtido por análise de variância monofatorial. 25

Tabela 4.2: Média ± erro padrão da média do número de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (NTr) evocados por 5 pulsos de cafeína de acordo com o número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. p: obtido por análise de variância monofatorial. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1..... 26

Tabela 4.3: Média ± erro padrão da média da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$; em µM) gerados pelos pulsos de cafeína em função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1. 27

Tabela 4.4: Média ± erro padrão da média da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$; em µM) gerados pela aplicação de diferentes números de estímulos elétricos (NEE) após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1. 27

Tabela 4.5: Média ± erro padrão da média da concentração diastólica de Ca^{2+} no citosol ($[Ca^{2+}]_d$; em µM) medida após aplicação de diferentes números de estímulos elétricos (NEE) posteriores à

depleção de Ca^{2+} do RS. p: obtido por análise de variância monofatorial para amostras pareadas (n = 10). 29
Tabela 4.6: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} pelo RS (FR) em função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1 30

Tabela 4.7: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} em cada pulso de cafeína ($FR_{1º\ pulso}$ a $FR_{5º\ pulso}$; em %) em diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). n: número de células usadas 32

Tabela 4.8: Média ± erro padrão da média do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) após pulsos de cafeína alternados com soluções contendo diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). Foram usadas mesmas células da Tabela 4.7. 33

Tabela 4.9: Média ± erro padrão da média da inibição da liberação fracional de Ca^{2+} causada pela perfusão dos miócitos com diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). p: obtido por análise de variância monofatorial. 34

Tabela 4.10: Valores de amplitude, tempo de queda do pico até metade da amplitude ($t_{1/2}$) e tempo de subida (t_s) do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulado por modelo sem *buffers*, somente com *buffer* de Ca^{2+} do RS e com os dois *buffers* (RS e citosólico) 37

Tabela 4.11: Conteúdos de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no modelo matemático contendo ou não as descrições dos *buffers* de Ca^{2+} para diferentes concentrações iniciais de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$). No modelo contendo os *buffers*, foram testados 3 valores de $B_{max\text{-}RS}$: 1400, 1800 e 2000 µM. 39

Tabela 4.12: Conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$, em µM) e liberação fracional de Ca^{2+} (FR, em %) em função da concentração de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$) obtidos pelo modelo sem e com os *buffers* de Ca^{2+}. Neste caso, foram testados 3 valores de $B_{max\text{-}Rs}$: 1400, 1800 e 2000 µM. 42

Tabela 4.13: Valores de níveis de saturação da liberação fracional de Ca^{2+} (FR, em %) para diferentes $B_{max\text{-}RS}$. 43

Lista de abreviações

B_{max} – concentração máxima de sítios de ligação

$[Ca^{2+}]_i$ – concentração citosólica de Ca^{2+} livre

$\Delta[Ca^{2+}]_i$ – amplitude do transiente da concentração citosólica de Ca^{2+} livre

$[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ – concentração inicial de Ca^{2+} livre no retículo sarcoplasmático

$[Ca^{2+}]_{RS}$ – conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

$[Ca^{2+}]_T$ – concentração total de Ca^{2+}

CSQ – calsequestrina

FR – liberação fracional de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático

$I_{Ca,L}$ – corrente de Ca^{2+} por canais de membrana de Ca^{2+} tipo-L

IC_{50} – concentração de tetracaína para causar 50% da inibição máxima

MRSFI – modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado

NCX – trocador Na^{+}-Ca^{2+}

PA – potencial de ação

RS – retículo sarcoplasmático

RyR – receptor de rianodina

SERCA – ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

$t_{1/2}$ – tempo de queda do pico até metade da amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

t_s – tempo de subida até o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

Trabalhos publicados pela autora

MONTEIRO, M.C.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Modelo Matemático do Retículo Sarcoplasmático Funcionalmente Isolado em Miócitos Cardíacos: Influência de *buffers* de Ca^{2+}. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2010, Tiradentes. *Anais do XXII Congresso de Engenharia Biomédica*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, 2010. p.453 – 456.

MONTEIRO, M.C.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Fractional Ca^{2+} release in the functionally isolated sarcoplasmic reticulum. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro.

Sumário

1. Introdução **1**

2. Objetivos **7**

3. Material e Métodos **8**

3.1. Animais 8

3.2. Soluções 8

3.3. Isolamento dos miócitos ventriculares 9

3.7. Sistema de troca rápida de soluções 13

3.8. Protocolo Experimental 15

3.8.1. Liberação fracional de Ca2+ versus conteúdo de Ca2+ do RS 15

3.8.2. Efeito da tetracaína sobre a liberação fracional de Ca2+ do RS 16

3.9. Análise estatística 17

3.10. Modelo matemático da dinâmica do Ca2+ intracelular 18

3.10.1. Simulação do MRSFI 20

3.10.2. Implementação dos buffers de Ca2+ intrarreticulares e citosólicos 21

3.10.3. Liberação fracional versus conteúdo de Ca2+ do RS in silico 22

3.10.4. Integração, software e microcomputador 23

4. Resultados **24**

4.1. Relação entre liberação fracional de Ca2+ e conteúdo de Ca2+ do RS 24

4.2. Efeitos da tetracaína sobre FR 30

4.3. Simulação do MRSFI 35

4.4. Simulação do MRSFI com buffers de Ca2+ 36

4.5. Relação entre liberação fracional e conteúdo de Ca2+ do RS in silico 38

5. Discussão **44**

5.1. Regulação da liberação fracional pelo conteúdo de Ca2+ do RS 44

5.2. Modulação da liberação de Ca2+ do RS pela tetracaína no MRSFI 47

5.3. Implementação de buffers de Ca2+ no MRSFI in silico 49

6. Conclusões **53**

7. Referências **54**

Anexo – Certificados de aprovação para experimentação animal **62**

1. Introdução

O íon Ca^{2+} é um importante alvo de estudos na busca de um maior entendimento do funcionamento do coração de mamíferos, pois este íon participa de todo processo de excitação elétrica e contração das células musculares (miócitos) cardíacas. Quando são aplicados estímulos elétricos suficientemente intensos a essas células, ocorrem respostas elétricas, caracterizadas por rápida despolarização da membrana celular (sarcolema), seguida por retorno ao potencial de repouso, que são denominadas potencial de ação (PA). Durante o PA, ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} tipo L, por onde ocorre influxo de Ca^{2+} na célula, a favor do gradiente eletroquímico do íon. Em condições fisiológicas, esta corrente de entrada de Ca^{2+} ($I_{Ca,L}$) pode ativar diretamente os miofilamentos, que são a unidade efetora da contração celular, mas ativa principalmente os canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), denominados também receptores de rianodina (RyR). Isto ocorre por meio da ligação de Ca^{2+} a esses canais, de acordo com o mecanismo descrito por Fabiato (1983). Como o RS é o principal estoque de Ca^{2+} para a contração celular, a ativação dos RyR promove uma massiva liberação de Ca^{2+} do RS para o citoplasma (Figura 1.1). Consequentemente, a concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre ($[Ca^{2+}]_i$), que na diástole está em torno de 100-200 ηM, é elevada para valores próximos a 1 µM. O íon difunde-se pelo citoplasma, liga-se à troponina C dos miofilamentos e ativa a contração celular (Bers, 2001).

A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, por sua vez, a atividade de transportadores de Ca^{2+} do sarcolema e outras organelas, o que implica na redução dessa concentração para seus valores basais. Dessa maneira, Ca^{2+} se dissocia da troponina C, levando ao relaxamento celular. A variação da $[Ca^{2+}]_i$, denominada transiente de $[Ca^{2+}]_i$, é, portanto, o elemento que acopla a excitação elétrica e a contração celular. Quatro principais transportadores que removem Ca^{2+} do citoplasma foram identificados (Figura 1.1): 1) a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), que recapta o íon para o RS, restaurando, assim, o estoque da organela; 2) o trocador Na^{2+}-Ca^{2+} (NCX), que, operando em seu modo direto, transporta um íon Ca^{2+} para o exterior da célula em troca da entrada de três íons Na^{+}; 3) a ATPase de Ca^{2+} de membrana, extrusor de Ca^{2+} da célula; e 4) o uniporter mitocondrial, que transporta Ca^{2+} para o interior da organela. Bassani *et al*. (1994) estimaram a participação relativa desses transportadores em diferentes espécies de mamíferos. Observou-se que a remoção conjunta de Ca^{2+} pelos dois últimos transportadores (sistemas lentos) em miócitos de ratos e coelhos corresponde a apenas 1-2 % do fluxo total de Ca^{2+} durante a fase de queda da $[Ca^{2+}]_i$. Foi observado também que a SERCA é o principal

transportador do íon nas duas espécies, uma vez que contribui com 92 e 70 % deste fluxo, em ratos e coelhos, respectivamente, enquanto a participação do NCX corresponde a 7 %, em ratos, e 28 %, em coelhos. Além da diferença entre espécies, esta participação pode variar ao longo do desenvolvimento do animal (Bassani & Bassani, 2002) e em condições patológicas (Pogwizd *et al.*, 1999; Piacentino *et al.*, 2003).

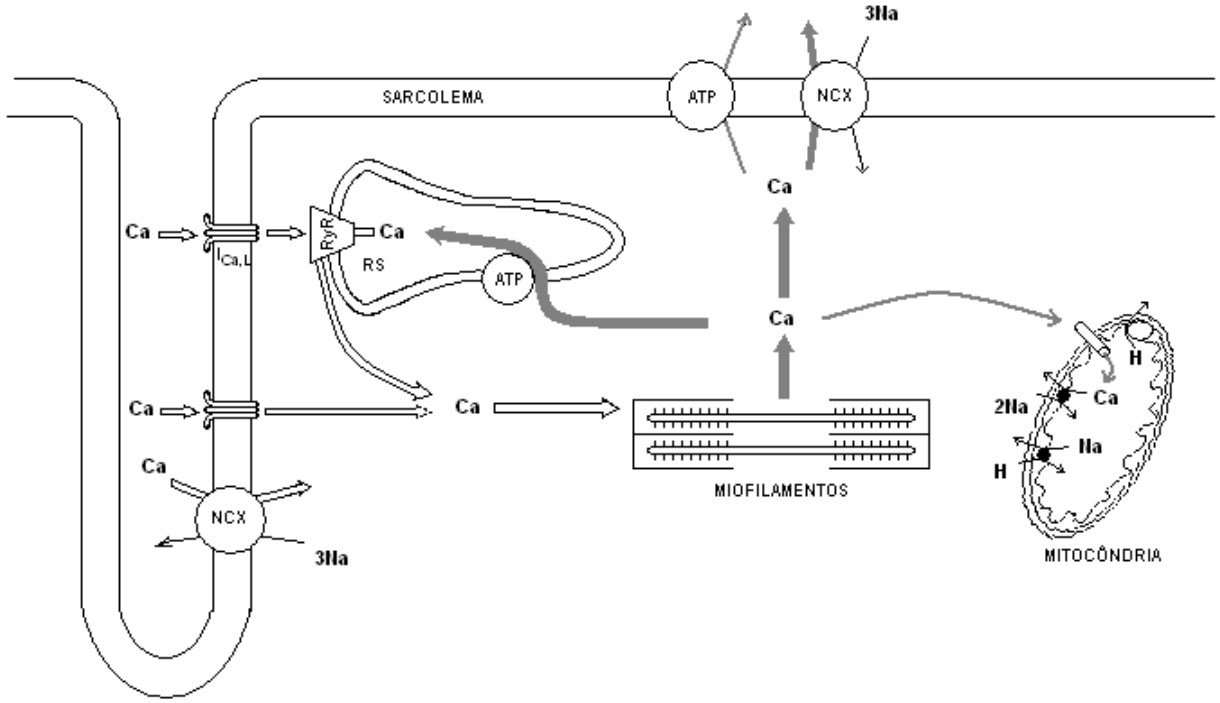

Figura 1.1: Transporte de Ca^{2+} durante excitação elétrica e contração de miócito cardíaco de mamíferos. RyR: receptor de rianodina; RS: retículo sarcoplasmático; $I_{Ca,L}$: corrente de Ca^{2+} tipo-L; NCX: trocador Na^{+}-Ca^{2+}; ATP: ATPase de Ca^{2+}. Modificado de Bers, 2002.

Como o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ resulta principalmente da ativação dos RyR, alterações da atividade desses canais provocam variações da liberação de Ca^{2+} do RS e, consequentemente, do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. Diversos trabalhos mostraram que o Ca^{2+} intrarreticular (i.e., concentração de Ca^{2+} no interior do RS) modula a atividade dos RyR (Bassani *et al.*, 1995; Lukyanenko *et al.*, 1996; Shannon *et al.*, 2000a; Laver, 2007; Qin *et al.*, 2008; Eisner *et al.*, 2009). Foi visto que a sobrecarga de Ca^{2+} do RS gera liberações espontâneas de Ca^{2+}, que podem dar origem a arritmias (Wier & Blatter, 1991; Williams *et al.*, 1992; Eisner *et al.*, 2009). Lukyanenko *et al.* (1996) demonstraram que há um aumento da probabilidade de abertura dos RyR incorporados a bicamadas lipídicas em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+} no lado da bicamada correspondente ao interior do RS. Em alguns estudos (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a) foi demonstrado que a fração do conteúdo de Ca^{2+} do RS liberada a

cada contração (FR) depende deste conteúdo. Primeiramente, FR foi calculada por Bassani *et al.* (1993) durante excitação elétrica de miócitos cardíacos de coelho. Em trabalhos posteriores, Bassani *et al.* (1995) e Shannon *et al.* (2000a) estudaram a relação entre FR e o conteúdo de Ca^{2+} do RS em miócitos cardíacos de furão e de coelho, respectivamente. Em ambos os estudos, essa relação mostrou um comportamento não-linear, pois, além de não haver liberação de Ca^{2+} pela organela (FR = 0 %) até que fossem atingidos valores consideráveis da carga de Ca^{2+} do RS (próximos a 50 µM), em cargas mais altas, pequenas alterações do conteúdo do RS foram acompanhadas por grandes variações de FR.

Em trabalho anterior neste laboratório (Soriano *et al.*, 2007a), foi desenvolvido um modelo experimental no qual a função do RS foi isolada (modelo do RS funcionalmente isolado, MRSFI; Figura 1.2). Neste modelo, miócitos cardíacos de rato foram mantidos em repouso elétrico em meio sem Na^+ e sem Ca^{2+}, sem haver, portanto, entrada de Ca^{2+} por meio da $I_{Ca,L}$, nem efluxo pelo NCX, principal competidor da SERCA pelo Ca^{2+} citoplasmático. Os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram evocados pela aplicação de pulsos de cafeína. Este composto atravessa rapidamente o sarcolema e aumenta a probabilidade de abertura dos RyR (Sitsapesan & Williams, 1990). Quando a concentração da cafeína na proximidade dos canais atinge cerca de 1 mM (O'Neill *et al.*, 1990), a $[Ca^{2+}]_i$ diastólica torna-se suficiente para ativar os RyR e, em decorrência da liberação massiva de Ca^{2+}, ocorre a contração celular. Como, neste modelo experimental, a cafeína é rapidamente lavada, o Ca^{2+} liberado através dos RyR retorna ao RS por meio da captação do íon pela SERCA, uma vez que o fluxo de Ca^{2+} mediado por esta enzima é muito maior do que os fluxos carreados pelos outros transportadores lentos (Bassani *et al.*, 1992; 1994), que podem ser desconsiderados nestas condições.

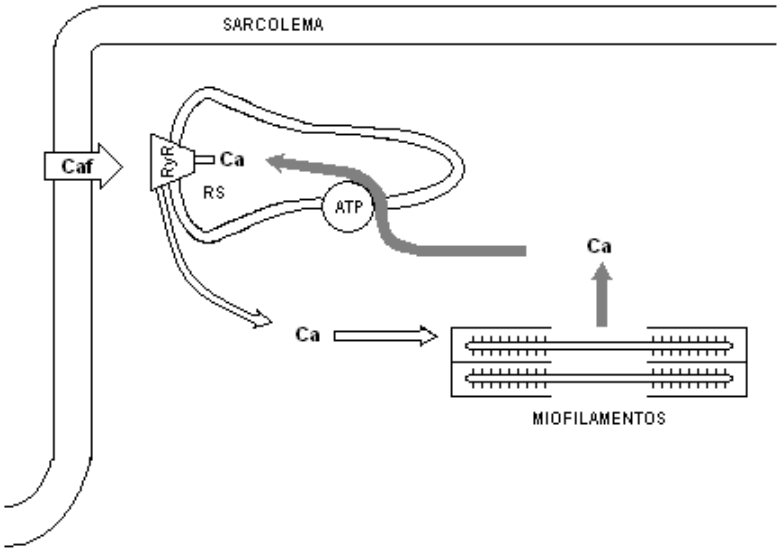

Figura 1.2: Modelo experimental do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado. Caf: cafeína; RyR: receptor de rianodina; RS: retículo sarcoplasmático; ATP: ATPase de Ca^{2+}. Modificado de Soriano, 2007.

No presente trabalho, o MRSFI, inicialmente desenvolvido para o estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA, foi aplicado ao estudo da liberação do íon pelo RS, mais especificamente com foco na FR, de modo a complementar o entendimento da função da organela e sua regulação. Por meio deste modelo experimental, buscou-se investigar como o conteúdo de Ca^{2+} do RS modula a FR na ausência do gatilho fisiológico ($I_{Ca,L}$) da liberação de Ca^{2+} pelos RyR.

A modulação da liberação de Ca^{2+} pelos RyR pode ser provocada também por alguns compostos exógenos, como é o caso do anestésico local tetracaína (Antoniu *et al*., 1985; Palade, 1987; Xu *et al*., 1993; Overend *et al*., 1997; Overend *et al*., 1998). Em estudos com RS isolado de músculo esquelético de coelho, observou-se que a tetracaína inibiu a liberação de Ca^{2+} pela organela (Antoniu *et al*., 1985; Palade, 1987; Xu *et al*., 1993). Além disso, foi visto também que este composto reduziu a frequência das liberações espontâneas de Ca^{2+} pelo RS (Overend *et al*., 1997) e a amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos de ratos (Overend *et al*., 1998). No entanto, já é bem conhecida a inibição de correntes de membrana causada pela tetracaína (Hille, 1977; Carmeliet *et al*., 1986). Sabe-se que em células neuronais de sapo e de rato a concentração do fármaco que provoca metade da inibição máxima (IC_{50}) sobre canais de Na^+ de membrana dependentes de tensão elétrica é de 0,7 e 12,5 µM, respectivamente (Bräu *et al*., 1998; John *et al*., 2004). Carmeliet *et al.* (1986) observaram que correntes de Ca^{2+} do sarcolema também são inibidas pelo fármaco, apesar de apresentarem menor sensibilidade à tetracaína (IC_{50} = 80 µM). Esta faixa da concentração efetiva do fármaco

sobre as correntes de membrana é menor do que aquela encontrada para os RyR (0,1-1 mM; Bers, 2001).

Assim, a tetracaína inibe principalmente correntes de membrana, as quais participam da geração do PA, e, portanto, reduz a excitabilidade celular. Esta redução altera ou até mesmo impede a liberação de Ca^{2+} pelo RS, caso impeça a geração do PA e/ou de $I_{Ca,L}$ de magnitude suficiente para ativar os RyR , o que pode impossibilitar o estudo do efeito da tetracaína diretamente sobre os RyR em células intactas. No presente trabalho, este estudo foi realizado por meio do uso do MRSFI, sem as interferências resultantes da ação do fármaco sobre os fenômenos elétricos de membrana, pois, neste modelo experimental, a liberação de Ca^{2+} independe da excitação elétrica celular. Dessa maneira, qualquer alteração do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ seria decorrente apenas do efeito da tetracaína sobre os RyR.

Além da experimentação com miócitos cardíacos, o modelamento matemático do transporte e regulação de Ca^{2+} nestas células tem sido explorado como ferramenta para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de excitação e contração celular (Luo & Rudy, 1994; Tang & Othmer, 1994; Shannon et al., 2004). Num estudo prévio (Soriano *et al.*, 2007a), um modelo teórico simplificado que descreve a dinâmica de Ca^{2+} intracelular (Tang & Othmer, 1994) foi adaptado para simular o MRSFI. Para descrever o transporte de Ca^{2+} em miócitos cardíacos, Tang & Othmer (1994) propuseram um modelo matemático em que os RyR podem se encontrar em quatro diferentes estados. A transição entre estes estados é governada pela ligação do Ca^{2+} a sítios reguladores desses canais, com diferentes taxas de associação e dissociação (Figura 1.3). Segundo este modelo, o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ resulta na ligação do íon a sítios reguladores positivos dos RyR (i.e., que promovem a abertura do canal) de baixa afinidade, porém com alta taxa de associação. O aumento de $[Ca^{2+}]_i$ também leva à ligação de Ca^{2+} a sítios reguladores negativos (i.e., que causam fechamento do canal) de alta afinidade. Contudo, a baixa taxa de associação de Ca^{2+} a estes sítios faz com que a inibição ocorra posteriormente à ativação dos RyR. Durante a fase de declínio do transiente de Ca^{2+}, o íon se desliga primeiramente dos sítios reguladores positivos, o que leva os RyR para o estado refratário, e, mais lentamente, se desliga dos sítios reguladores negativos, tornando os canais novamente ativáveis. Neste modelo, os fenômenos elétricos de membrana e a entrada de Ca^{2+} foram descritos apenas como um pulso de Ca^{2+} no citoplasma. Além disso, NCX e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema foram combinados em um só transportador. Na simulação do MRSFI, Soriano *et al.* (2007a) eliminaram os termos referentes aos fluxos de entrada e saída de Ca^{2+} através do sarcolema e simularam os pulsos de cafeína por meio da alteração instantânea das

taxas de associação e dissociação de Ca^{2+} aos sítios reguladores dos RyR, de modo a favorecer a permanência desses canais no estado aberto.

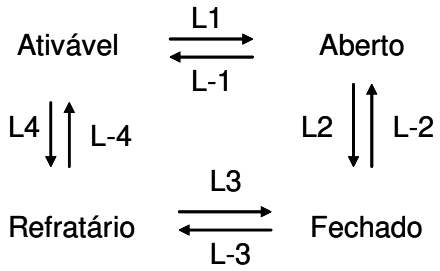

Figura 1.3: Estados dos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, segundo modelo matemático de Tang & Othmer (1994). L_i é a taxa de associação (para valores positivos de i) ou de dissociação (para valores negativos de i) de Ca^{2+} aos sítios reguladores do canal.

No presente trabalho, buscou-se otimizar a simulação do MRSFI por meio do acréscimo de elementos importantes na dinâmica do Ca^{2+} intracelular que não foram originalmente considerados no modelo de Tang & Othmer (1994) ou na sua modificação por Soriano et al (2007a). Sabe-se que o comportamento temporal do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ depende da presença de ligantes passivos (ou *buffers*) de Ca^{2+} na célula (Berlin *et al.*, 1994; Eisner *et al.*, 2000; Bers, 2001). Estes *buffers* de Ca^{2+}, cujos principais exemplos no citoplasma são a troponina C e a calmodulina, amortecem variações abruptas da concentração do íon: este se liga ao *buffer* quando há aumento de sua concentração livre, e se dissocia dele quando sua concentração livre é reduzida. No interior do RS, também foram identificados *buffers* de Ca^{2+} (Bers, 2001). Por amortecer as variações da concentração do íon na organela, a existência da calsequestrina (CSQ), principal *buffer* de Ca^{2+} do RS (Jorgensen *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1988), está relacionada com a alta capacidade da organela em armazenar Ca^{2+} (Jones *et al.*, 1998). Além disso, há indicações de que a CSQ esteja envolvida na regulação da liberação de Ca^{2+} pelos RyR (Györke *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2008). Neste trabalho, foram implementadas equações que descrevem estes *buffers* de Ca^{2+}, com o objetivo de produzir simulações mais realistas do transporte e regulação do Ca^{2+} em miócitos cardíacos.

2. Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram:

a) Estudar a relação entre FR e conteúdo de Ca^{2+} do RS no MRSFI, no qual o gatilho fisiológico ($I_{Ca,L}$) da liberação de Ca^{2+} pelo RS está ausente.

b) Por meio do MRSFI, estudar o efeito direto da tetracaína, modulador dos RyR, sobre a FR em miócitos intactos.

c) Introduzir descrições de *buffers* de Ca^{2+} citosólico e intrarreticular ao modelo matemático que simula o MRSFI (Soriano *et al.*, 2007a) e aplicar estas alterações ao estudo da relação entre FR e conteúdo de Ca^{2+} do RS *in silico*.

3. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido em sua totalidade no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (3-8 meses de idade) provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB-UNICAMP) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB-UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, onde receberam água e ração à vontade, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os ratos não sofreram nenhuma manipulação experimental até o dia de serem sacrificados para o isolamento das células. O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação Animal (Instituto de Biologia / UNICAMP; certificados No. 1517-1, 1737-1, 2088-1F e 2490-1A).

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com exceção das soluções utilizadas no isolamento dos miócitos cardíacos, que foram preparadas com água ultrafiltrada (tipo I, resistividade > 18 MΩ.cm). As soluções apresentaram pH de 7,4 a 23° C. Na composição das soluções abaixo, a concentração dos solutos está expressa em mM.

a) Solução de Tyrode normal (TyN): NaCl 140; KCl 6; $MgCl_2$ 1,5; ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N"-2 etano-sulfônico (HEPES) 5; glicose 11; $CaCl_2$ 1; pH ajustado com NaOH.

b) Solução de Tyrode sem Ca^{2+} e Na^{+} (Tyr00): composição semelhante a TyN, exceto pela substituição equimolar de NaCl e $CaCl_2$ por LiCl e ácido etileno glicol-bis (β-aminoetil eter)- N-N-N´-N´ tetraacético (EGTA), respectivamente. O ajuste do pH foi feito com KOH.

c) Solução Tyr00 com cafeína (Caf00): cafeína foi adicionada como um sólido à solução Tyr00, na concentração de 10 mM.

e) Solução Krebs-Henseleit para Isolamento de Células: NaCl 115; KCl 4,6; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 25; $MgSO_4$ 2,4; glicose 11,1.

f) Solução cardioplégica (Cpl-P): KH_2PO_4 10; KCl 30; $MgCl_2$ 1; taurina 20; glicose 11; HEPES 10; ácido glutâmico 70; albumina sérica bovina 0,5 mg/mL; pH 7,4 a 23º C ajustado com KOH.

g) Solução estoque de fluo-3: 1 mM fluo-3 AM (acetoximetil-éster, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

h) Solução fluo-3 para incubação de miócitos (TyN-Fluo): 10 µL da solução estoque de fluo-3 foram adicionados a 10 µL de solução 2% (v/v em DMSO) de Pluronic (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e diluídos em 980 µL de TyN. Pluronic é um agente dispersante que facilita a difusão do fluo-3 para o interior da célula. A solução de 10 µM de fluo-3 foi novamente diluída em TyN para a concentração final de 5 µM, e esta foi a solução usada para o carregamento do miócito com o indicador.

3.3. Isolamento dos miócitos ventriculares

As células foram isoladas por digestão enzimática conforme descrito anteriormente (Penna & Bassani, 2010). Os ratos foram sacrificados por exsanguinação após concussão cerebral, com imediata retirada do coração. O coração foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit sem cálcio a 37 °C em um sistema de Langendorff por 5 minutos. Em seguida o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,5-1 mg/ml de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, EUA) por 15-20 minutos. A seguir, a enzima foi removida por perfusão com solução de Tyrode sem Ca^{2+} contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/mL) por cerca de 10 minutos. O tecido ventricular esquerdo foi então delicadamente triturado em solução cardioplégica para dissociação das células. A solução cardioplégica foi usada também para lavagem e armazenamento das células.

3.4. Medição de $[Ca^{2+}]_i$

Para realização dos experimentos com os miócitos, foi usada uma câmara de perfusão de acrílico desenvolvida por Gomes (1997; número da patente: PI 0302.403 - 2), com 5 entradas de soluções e uma saída conectada a um sistema de vácuo para retirada do excesso da solução e para estabelecimento de um fluxo aparentemente laminar (Figura 3.1). A câmara

apresenta um rasgo de volume aproximado de 280 µL, cuja base é uma lamínula de vidro onde a suspensão de miócitos foi efetivamente depositada.

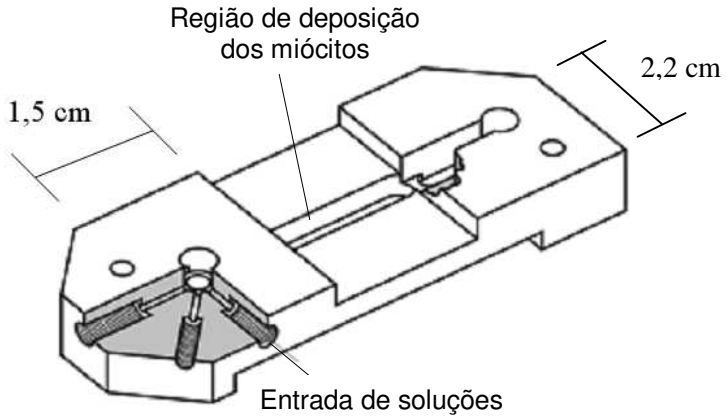

Figura 3.1: Câmara de perfusão de miócitos (PI 0302.403-2). Modificado de Soriano, 2007.

Após lavagem da lamínula com álcool e água deionizada e secagem, foi aplicada uma fina camada de colágeno para fixação dos miócitos na lamínula. Após 20 min, a suspensão de miócitos foi depositada (aproximadamente 100 µL) e esperou-se 20 min até o início da perfusão das células com as diversas soluções.

Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente (0,5 Hz, pulsos bipolares de tensão, com duração de 3 ms e amplitude 20 % acima do limiar de excitação dos miócitos) para indução das contrações. A estimulação foi feita por meio de um par de eletrodos de aço inoxidável conectados a um estimulador elétrico, desenvolvido no CEB-UNICAMP.

Após serem depositados na câmara de perfusão, os miócitos foram perfundidos com TyN e estimulados eletricamente por cerca de 10 min. Em seguida, a estimulação e perfusão foram cessadas e 10 µL de TyN-Fluo foram adicionados à câmara. Após 20 min de incubação, os miócitos voltaram a ser perfundidos por TyN por cerca de 20 min para desesterificação do indicador.

A medição da $[Ca^{2+}]_i$ foi feita pelo uso de instrumentação desenvolvida anteriormente em nosso laboratório (Soriano *et al.*, 2007b) que consistiu em 3 sistemas ópticos: óptica de excitação do indicador, óptica de emissão do indicador e óptica de projeção da imagem (Figura 3.2).

Na óptica de excitação, um LED (*light emitting diode*) azul de alta potência (17,1 W; OT16–5100–BL, Opto Technology, Wheeling, Illinois, EUA) produziu um feixe de luz que atravessou um conjunto de lentes, um filtro passa-faixa de excitação (460-500 nm) e um diafragma, e foi refletido por um espelho dicróico para a câmara onde os miócitos foram depositados, após ser condensado por uma lente objetiva de 40 X próxima à câmara.

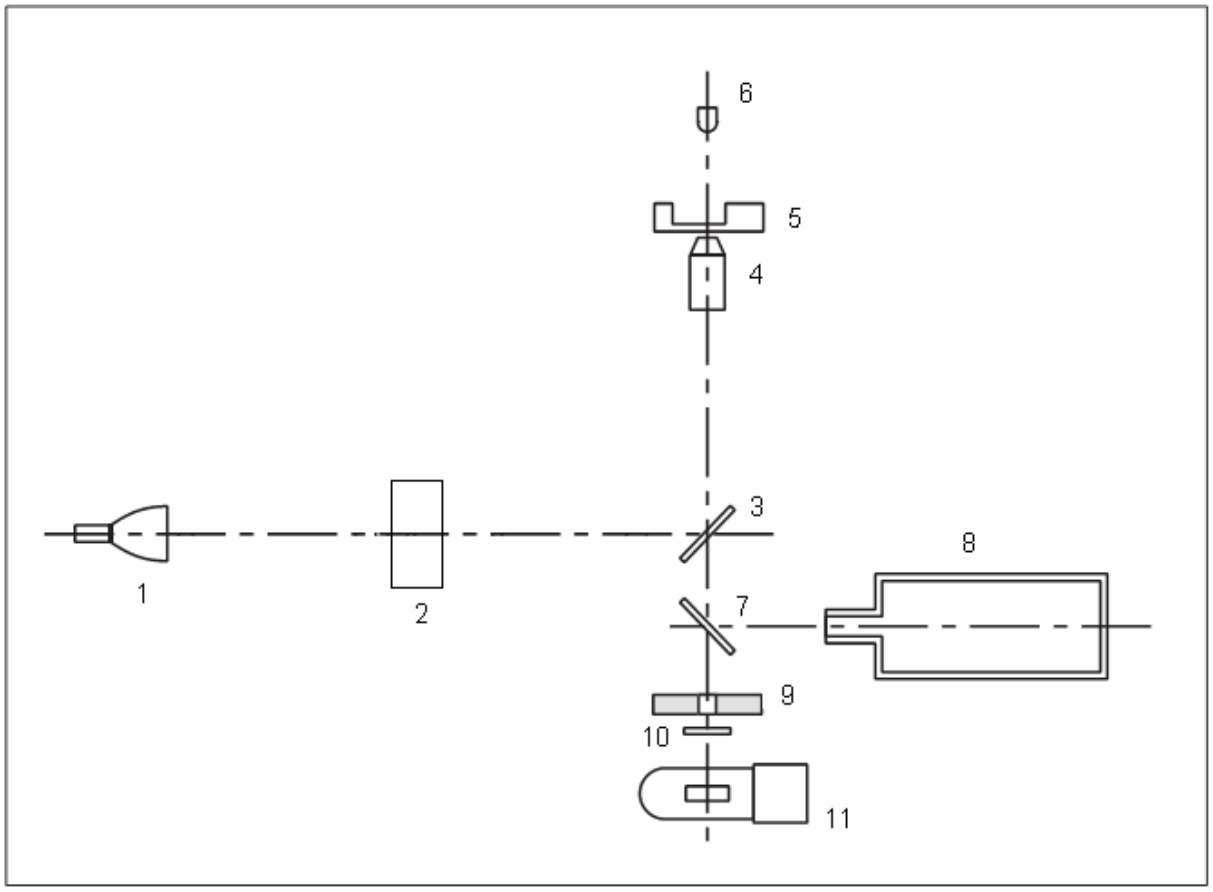

Figura 3.2: Instrumentação para medição da $[Ca^{2+}]_i$ – 1: LED azul de alta potência; 2: lentes e filtro passa-faixa de excitação; 3: espelho dicróico; 4: lente objetiva de 40 X; 5: câmara de perfusão; 6: LED vermelho; 7: espelho refletor de vermelho; 8: câmera CCD (*charge coupled device*); 9: obturador (*shutter*) com fenda retangular; 10: filtro passa-faixa de emissão; 11: tubo fotomultiplicador. Modificado de Soriano *et al.*, 2007b.

Na óptica de emissão do indicador, a fluorescência emitida pelo indicador ligado ao Ca^{2+} foi condensada pela objetiva e atravessou o espelho dicróico e refletor de vermelho, um *shutter* e um filtro passa-faixa de emissão (515-560 nm) até atingir um tubo fotomultiplicador (modelo C6260, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão), onde foi produzida uma corrente elétrica proporcional à intensidade luminosa. Após ser convertido em tensão por um amplificador operacional, o sinal foi enviado para uma placa de aquisição de dados PCI 6229 (National

Instruments, Austin, Texas, E.U.A) conectada ao computador. A visualização e controle deste sinal foram feitos no momento da realização dos experimentos por meio do programa LabVIEW, versão 7.1, com o qual foi desenvolvida uma interface amigável, que permitiu o registro do sinal por meio do acionamento de um botão "Grava". O sinal foi adquirido com uma freqüência de amostragem de 500 Hz e filtrado por um filtro passa-baixa Butterworth, de 4ª ordem, com freqüência de corte de 40 Hz.

Na óptica de projeção da imagem, os miócitos depositados na câmara foram iluminados por um LED vermelho e o feixe de luz atravessou a lente objetiva, o espelho dicróico e foi refletido para uma câmera CCD (*charge coupled device*) por um espelho refletor de vermelho. O sinal foi enviado a um monitor, onde a imagem dos miócitos foi mostrada.

O sinal de fluorescência emitida foi convertido para $[Ca^{2+}]_i$ de acordo com a expressão (Shannon *et al.*, 2002):

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{\frac{F - F_{back}}{F_0 - F_{back}} * k_{d(Ca)}}{\frac{k_{d(Ca)}}{[Ca^{2+}]_d} - \frac{F - F_{back}}{F_0 - F_{back}} + 1} \qquad (3.1)$$

onde F é a fluorescência medida, F_{back} é a fluorescência medida em campo sem célula, F_0 é a fluorescência diastólica, $k_{d(Ca)}$ é a constante de dissociação de Ca^{2+} do indicador (1,1 µM, Harkins *et al.*, 1993) e $[Ca^{2+}]_d$ é a concentração citosólica de Ca^{2+} diastólica (estimada com o indicador indo-1 em nosso laboratório, como 0,222 ou 0,213 µM, em meio com ou sem Ca^{2+}, respectivamente).

A concentração total de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_T$, i.e., livre + ligado) e o conteúdo de Ca^{2+} do RS (veja a seção 3.8.1 para maiores detalhes) foram calculados como a soma da $[Ca^{2+}]_i$ medida pelo indicador e a concentração de Ca^{2+} ligada a sítios passivos (*buffers*) intracelulares, como o próprio indicador e *buffers* endógenos (e.g., troponina C dos miofilamentos e calmodulina). Assim, $[Ca^{2+}]_T$ foi dada por (Bassani & Bers, 1995):

$$[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}]_i + \frac{B^f_{\max} \cdot [Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + k_{df}} + \frac{B^e_{\max} \cdot [Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + k_{de}} \qquad (3.2)$$

onde $[Ca^{2+}]_i$ é a concentração de Ca^{2+} livre no citosol medida com indicador, B^f_{max} é a capacidade máxima de ligação ao íon do fluo-3 (4 µM, Soriano, 2007), k_{df} é a constante de

dissociação aparente do Ca^{2+} do indicador (1,1 µM, Harkins *et al.*, 1993), e B^{e}_{max} (300 µM) e K_{de} (0,53 µM) são, respectivamente, a capacidade máxima de ligação e a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} dos sítios passivos endógenos (Bassani *et al.*, 1998).

3.7. Sistema de troca rápida de soluções

Para implementação do MRSFI, foram feitas aplicações rápidas (pulsos) de cafeína, alternadamente com aplicação de Tyr00 através de uma ponta perfusora, posicionada próximo ao miócito de interesse por meio de um micromanipulador (Narishige, Tokyo, Japão; Figura 3.3).

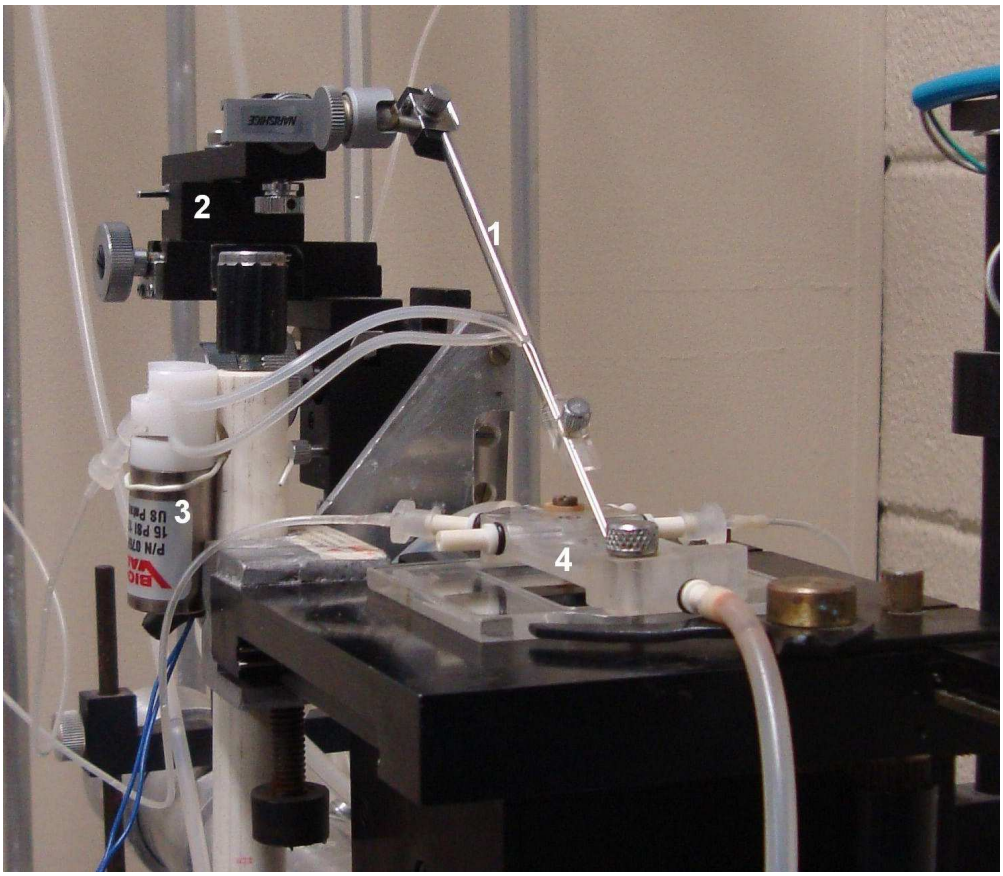

Figura 3.3: Sistema de troca rápida de soluções – 1: Ponta perfusora; 2: Micromanipulador; 3: Válvula solenóide; 4: câmara de perfusão

A aplicação das soluções Caf00 e Tyr00 pela ponta perfusora foi realizada por meio da ativação de uma válvula solenóide (modelo 075P3MP12-01S, Bio-Chem Fluidics, Boonton, New Jersey, EUA), com duas entradas e duas saídas de soluções (Figura 3.3). A solução Tyr00 foi conectada à entrada normalmente aberta e a solução Caf00 foi conectada à entrada

normalmente fechada, de modo que, durante o acionamento da válvula, o fluxo de Tyr00 foi interrompido e o fluxo de Caf00 liberado. O acionamento da válvula foi controlado por um circuito desenvolvido em nosso laboratório (Soriano, 2007), que possibilitou não somente a aplicação prolongada de Caf00 pelo acionamento manual da válvula por meio de uma chave como também a aplicação dos pulsos de cafeína pelo acionamento automático da válvula por meio de um circuito oscilador. A duração e freqüência dos pulsos de Caf00 foram ajustados para 100 ms e 0,07 Hz (14 s de intervalo entre pulsos), respectivamente, pela mudança da resistência de dois *trimpots*. A tensão e corrente aplicadas aos terminais da válvula pelo circuito corresponderam a 12 V e 41 mA, respectivamente.

A escolha de uma válvula com duas entradas e duas saídas permitiu o uso de uma ponta perfusora com dois lumens, pelos quais foram aplicadas as soluções Caf00 e Tyr00 diretamente sobre a região da lamínula onde estava o miócito em observação (Figura 3.4). Dessa maneira, o "volume morto" da ponta perfusora, onde haveria mistura das soluções, foi eliminado, sem haver, portanto, alteração da concentração de Caf00. Assim, o uso do conjunto válvula-ponta perfusora possibilitou uma troca mais rápida das soluções próximo ao miócito de interesse.

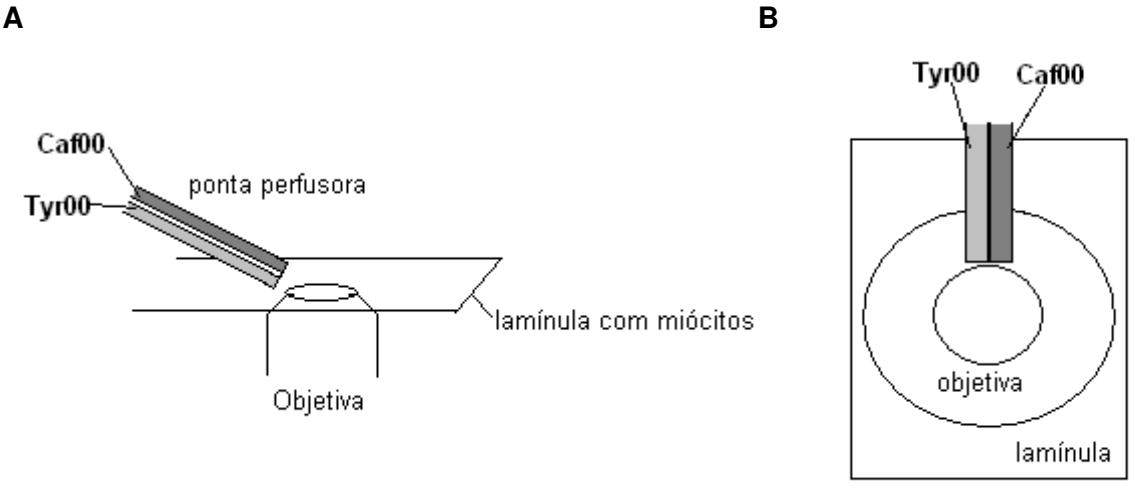

Figura 3.4: Esquema do sistema de troca rápida de soluções – A: Ponta perfusora com dois lumens para aplicação de Caf00 e Tyr00 posicionada em região da lamínula próxima à lente objetiva; B: Vista superior do sistema de troca rápida de soluções.

A perfusão dos miócitos com solução TyN e com solução Tyr00 foi feita pelas entradas da câmara de perfusão quando a ponta perfusora não era acionada. Desta maneira,

perfundindo os miócitos com Tyr00 antes da aplicação pela ponta perfusora, tentou-se garantir a remoção efetiva de Na^+ e Ca^{2+} do meio extracelular por Tyr00 em toda a câmara.

3.8. Protocolo Experimental

3.8.1. Liberação fracional de Ca^{2+} versus conteúdo de Ca^{2+} do RS

No protocolo experimental para estudo da relação entre FR e conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$), primeiramente foi feita uma aplicação prolongada de Caf00 (>1 min) até que o RS fosse depletado de Ca^{2+}. Em seguida, após perfusão com TyN por 1 min para lavagem da cafeína e do EGTA, foram aplicados 2, 5, 7, 15 ou 20 estímulos elétricos, na presença de TyN, para obtenção de cinco diferentes valores de $[Ca^{2+}]_{RS}$. Após a depleção de Ca^{2+} do RS, grande parte do Ca^{2+} que entra na célula pelos canais de membrana durante cada potencial de ação é rapidamente captada pelo RS. Dessa maneira, seu estoque de Ca^{2+} varia com o número de estímulos elétricos aplicados, até atingir a saturação (Bassani *et al.*, 1993; Shannon *et al.*, 2000b; Bassani *et al.*, 2004).

Após a estimulação elétrica, os miócitos foram perfundidos por 30 s com Tyr00 para inibição do NCX. A perfusão dos miócitos com Tyr00 foi seguida pela aplicação prolongada de Caf00 (>1 min) para estimativa de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Figura 3.5A), ou por 5 pulsos de Caf00 alternados com Tyr00 para indução de liberação de Ca^{2+} do RS e consequente geração dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 3.5B).

A amplitude da variação $[Ca^{2+}]_T$ decorrente da aplicação de um dado pulso de Caf00 foi considerada como a quantidade de Ca^{2+} liberada pela organela. Essa quantidade foi dividida pelo $[Ca^{2+}]_{RS}$, representado pela amplitude da variação da $[Ca^{2+}]_T$ decorrente da aplicação prolongada de Caf00 (Bassani & Bers, 1995; Bers, 2001), para, assim, estimar a FR a cada pulso de cafeína.

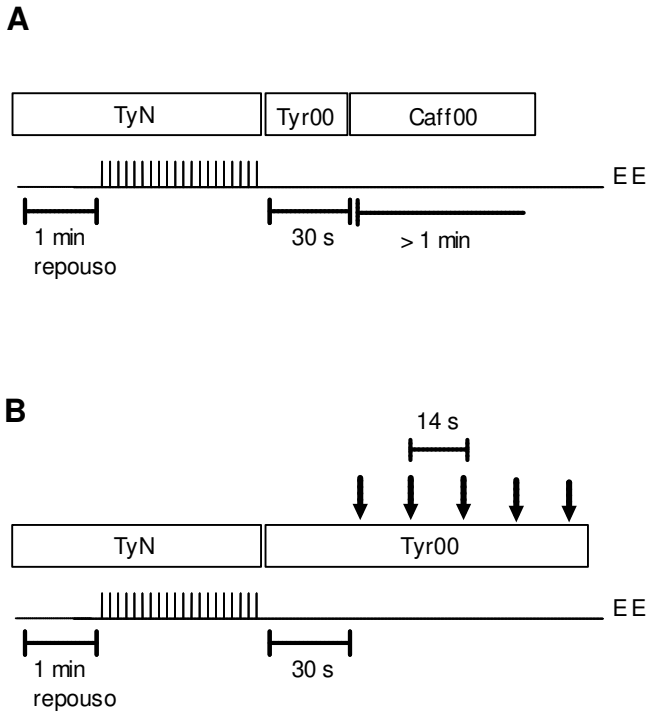

Figura 3.5: Protocolo experimental para estudo de relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$: Após aplicação prolongada de Caf00 (não mostrada), foram aplicados diferentes números de estímulos elétricos (estão mostrados 20 estímulos, traços verticais na linha inferior), na presença de TyN. A aplicação de Tyr00 por 30 s foi seguida por: A) aplicação prolongada (>1 min) de Caf00 ou B) pulsos de Caf00 (setas pretas) alternadamente com Tyr00 pela ponta perfusora. Antes da estimulação elétrica (EE) dos miócitos, foi feita perfusão com solução TyN, por 1 min.

3.8.2. Efeito da tetracaína sobre a liberação fracional de Ca^{2+} do RS

Após 3 min de perfusão com TyN e estimulação elétrica, o miócito foi perfundido, durante 1 min com solução Tyr00 contendo ou não tetracaína nas concentrações de 20, 50 ou 100 µM. Em seguida, transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram evocados por pulsos rápidos de cafeína, como descrito no procedimento anterior, alternados com Tyr00 (controle; Figura 3.6A) ou com a solução contendo tetracaína (Figura 3.6B). Por fim, a célula foi perfundida com Tyr00 por 2 min (para completa lavagem de tetracaína, quando presente) e, a seguir, procedeu-se à aplicação prolongada de cafeína para medição de $[Ca^{2+}]_{RS}$. FR foi estimada como descrito anteriormente. Para levar em conta a possível dependência de uso para a ação do fármaco (i.e., requeira interação com RyRs no estado ativado), foi usado apenas o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo último dos 5 pulsos de cafeína para estimar o efeito causado pela tetracaína sobre a FR. Este

efeito foi expresso como a diferença entre os valores de FR na situação controle e na presença da droga. A redução de FR foi apresentada como porcentagem de FR controle.

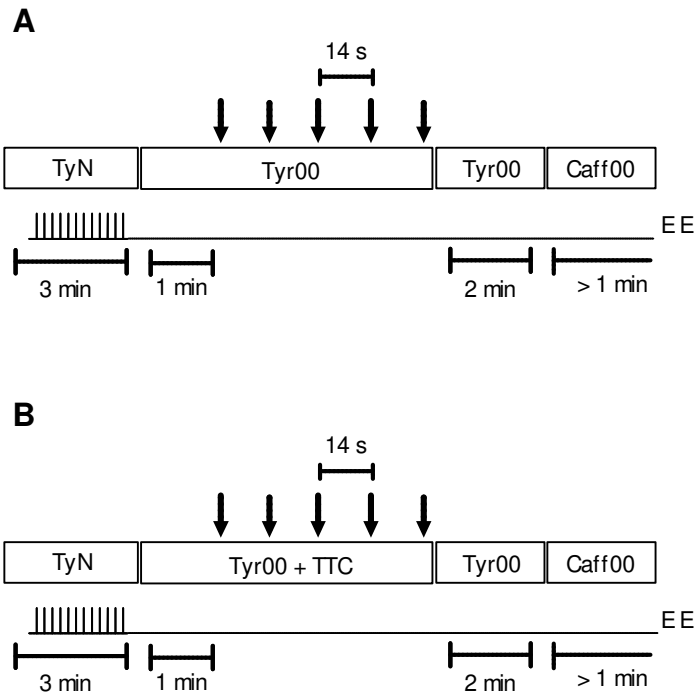

Figura 3.6: Protocolo experimental para estudo do efeito da tetracaína sobre liberação de Ca^{2+} do RS. Inicialmente, foi feita a aplicação de estímulos elétricos (EE: traços verticais na linha horizontal inferior) e perfusão dos miócitos com TyN por 3 min. Em seguida, foi feita a aplicação de pulsos de cafeína (setas pretas) alternadamente com: (A) Tyr00 (situação controle) ou (B) Tyr00 contendo tetracaína (TTC). Foi aplicada Tyr00 por 2 min para lavagem da tetracaína antes da aplicação prolongada (>1 min) de cafeína.

3.9. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (SE). Os dados foram comparados por análise de variância mono e bifatorial, com posterior comparação de médias pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 5.03 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

3.10. Modelo matemático da dinâmica do Ca^{2+} intracelular

No modelo matemático de Tang & Othmer (1994), as frações de RyR nos estados ativável, aberto e fechado, representadas pelas variáveis x_1, x_2 e x_3, respectivamente, foram calculadas pela integração numérica do conjunto de equações diferenciais acopladas, que descrevem a variação temporal dessas variáveis:

$$\begin{aligned}
\frac{dx_1}{dt} &= L_{-1}.x_2 + L_{-4}.\left(1 - \sum_{i=1}^{3} x_i\right) - (L_1 + L_4)x_1.x_4 \\
\frac{dx_2}{dt} &= -L_{-1}.x_2 + L_{-2}.x_3 + (L_1.x_1 - L_2.x_2).x_4 \\
\frac{dx_3}{dt} &= -(L_{-3} + L_{-2}).x_3 + (L_3.(1 - \sum_{i=1}^{3} x_i) + L_2.x_2).x_4
\end{aligned} \tag{3.3}$$

onde $1 - \sum_{i=1}^{3} x_i$ é a fração de canais no estado refratário, x_4 é a concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($[Ca^{2+}]_i$) e L_i é a taxa de associação ou de dissociação de Ca^{2+} aos sítios reguladores do canal (Figura 1.3).

Outros componentes da dinâmica de Ca^{2+} intracelular foram descritos neste modelo (Figura 3.7) de modo simplificado.

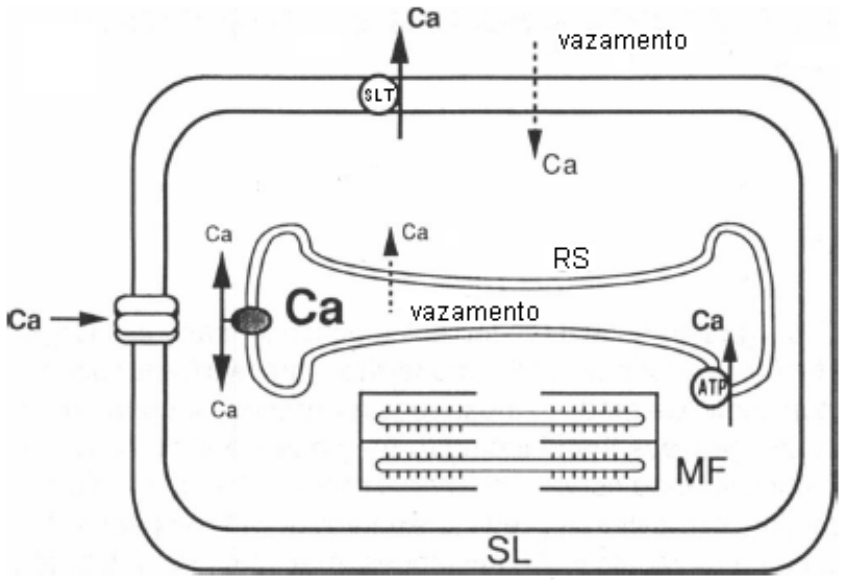

Figura 3.7: Modelo simplificado dos mecanismos envolvidos na dinâmica do transporte de Ca^{2+} no miócito cardíaco. SLT: conjunto de transportadores transarcolema deste íon; RS: retículo sarcoplasmático; MF: miofilamentos; SL: sarcolema; ATP: ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA); vazamento: fluxos de vazamento de Ca^{2+} transarcolema e entre RS e citosol. Modificado de Tang & Othmer (1994).

Os fluxos de Ca^{2+} pelos transportadores de membrana (J_{pm}), que causam a extrusão do íon, e pela SERCA (J_{prs}), que transporta o íon do citosol para o lumen do RS, foram descritos de modo análogo:

$$J_{pm} = \frac{q_1 . x_4^2}{x_4^2 + q_2^2} \tag{3.4}$$

$$J_{prs} = \frac{p_1 . x_4^2}{x_4^2 + p_2^2} \tag{3.5}$$

onde q_1 e p_1 são as velocidades máximas de transporte de Ca^{2+} pelos transportadores de membrana e pela SERCA, respectivamente, e q_2 e p_2 são os valores de $[Ca^{2+}]_i$ para os quais a velocidade de transporte do íon pelos transportadores de membrana e pela SERCA, respectivamente, é metade da sua velocidade máxima correspondente.

O fluxo de entrada de Ca^{2+} através do sarcolema decorrente da estimulação elétrica foi dado por:

$$J(t) = \left(H(t_{on}) - H(t_{off})\right).A_0 \tag{3.6}$$

onde H(t) é uma função degrau do tempo e A_0 é a amplitude do fluxo de entrada de Ca^{2+} no intervalo entre o início (t_{on}) e o fim (t_{off}) da despolarização do sarcolema.

O fluxo de liberação de Ca^{2+} através dos RyR é proporcional à fração de canais no estado aberto e ao gradiente da concentração de Ca^{2+} através da membrana do RS:

$$J_{Ch} = Ch . x_2 . (x_5 - x_4) \tag{3.7}$$

onde Ch é o coeficiente de liberação do canal e x_5 é a concentração de Ca^{2+} do RS.

Os fluxos de vazamento de Ca^{2+} do meio extracelular (J_{Lm}) e do RS (J_{Lrs}) para o citoplasma são proporcionais aos gradientes da concentração do íon através, respectivamente, do sarcolema e da membrana do RS, como descrito:

$$J_{Lm} = g_2 . (C_0 - x_4) \tag{3.8}$$

$$J_{Lrs} = g_1 . (x_5 - x_4) \tag{3.9}$$

onde g_1 e g_2 são coeficientes de vazamento através do sarcolema e da membrana do RS, respectivamente, e C_0 é a concentração extracelular de Ca^{2+}.

As concentrações citosólica e intrarreticular de Ca^{2+} foram calculadas pela integração das equações diferenciais:

$$\frac{dx_4}{dt} = v_r J_{Lrs} + J_{Lm} - J_{pm} + v_r (J_{ch} - J_{prs}) + J(t) \tag{3.10}$$

$$\frac{dx_5}{dt} = -J_{Lrs} + J_{prs} - J_{ch}$$

onde v_r é a razão entre o volume do RS e do citosol.

3.10.1. Simulação do MRSFI

Seguindo as modificações propostas por Soriano *et al*. (2007a) para simulação do MRSFI, neste trabalho, os fluxos de Ca^{2+} através da membrana celular (J(t), J_{Lm} e J_{pm}) foram anulados assim como a concentração extracelular de Ca^{2+} (C_0). As taxas de dissociação e associação dos sítios reguladores dos RyR ao Ca^{2+} foram alteradas, de modo a favorecer a permanência dos canais no estado aberto para simulação do efeito dos pulsos rápidos de cafeína (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Valores usados por Soriano et al (2007a) para as taxas de dissociação e associação dos sítios reguladores dos RyR ao Ca^{2+} na ausência e presença de cafeína. As taxas foram alteradas de modo a favorecer a permanência dos RyR no estado aberto para simulação do pulso de cafeína.

Parâmetro	Ausência de Cafeína	Presença de Cafeína
L_1 [s^{-1}.μM]	13,5	70
L_{-1} [s^{-1}]	7,2	1
L_2 [s^{-1}.μM]	0,8	0,1
L_{-2} [s^{-1}]	0,84	4
L_3 [s^{-1}.μM]	13,5	30
L_{-3} [s^{-1}]	7,2	1
L_4 [s^{-1}.μM]	0,8	1,6
L_{-4} [s^{-1}]	0,84	0,1

Na Tabela 3.2, são mostrados os valores dos demais parâmetros do modelo de Tang & Othmer (1994), com as alterações necessárias para simulação do MRSFI sugeridas por Soriano (2007).

Tabela 3.2: Valores dos parâmetros do modelo matemático usados por Tang & Othmer (1994) e por Soriano (2007) para simulação do MRSFI

Parâmetro [unidade]	Tang & Othmer (1994)	Soriano (2007)
Ch [s^{-1}]	80	80
p_1 [s^{-1}.μM]	1,038 . 10^3	1,038 . 10^3
p_2 [μM]	0,12	0,12
q_1 [s^{-1}. μM]	19	0
q_2 [μM]	0,06	0,06
C_0 [μM]	1500	0
v_r	0,185	0,035*
g_1 [s^{-1}]	0,4	0,4
g_2 [s^{-1}]	1,063. 10^{-2}	0

* O valor de v_r usado neste trabalho foi baseado em valor encontrado por Page *et al.* (1971).

3.10.2. Implementação dos *buffers* de Ca^{2+} intrarreticulares e citosólicos

Neste trabalho, além das modificações dos valores das taxas L_i e de alguns parâmetros do modelo de Tang & Othmer (1994) para simulação do MRSFI descritas na seção anterior (Tabelas 3.1 e 3.2), foram introduzidas formulações referentes aos *buffers* de Ca^{2+} intrarreticulares e citoplasmáticos, baseadas no modelo de Shannon *et al.* (2004):

$$\frac{d[Ca.L]}{dt} = k_{on}.[Ca^{2+}].(B_{\max} - [Ca.L]) - k_{off}.[Ca.L] \qquad (3.11)$$

onde k_{on} e k_{off} são, respectivamente, as taxas de associação e dissociação de Ca^{2+} ao *buffer,* e B_{max} a capacidade máxima de ligação do *buffer*. [Ca^{2+}] e [Ca.L] são, respectivamente, as concentrações de Ca^{2+} livre e ligado ao *buffer*. Inicialmente, foi inserida a formulação referente ao *buffer* intrarreticular, mais especificamente a calsequestrina (principal ligante de Ca^{2+} no RS; Bers, 2001). Os valores dos parâmetros utilizados (Tabela 3.3) foram ajustados por tentativa e erro a partir dos valores de K_d e B_{max} sugeridos por Shannon *et al.* (2004). A função referente ao *buffer* citosólico foi, então, introduzida ao modelo, e os parâmetros escolhidos foram os que melhor se ajustaram (Tabela 3.3), partindo dos valores relatados por Bassani *et al.* (1998) para miócitos ventriculares de ratos adultos.

Tabela 3.3: Valores dos parâmetros das formulações dos *buffers* intrarreticular e citosólico utilizados

Buffer	K_{on} ($\mu M^{-1}.s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	B_{max} (μM)
Intrarreticular	0,55	650	1800
Citosólico	1	0,8	3

Com a introdução das formulações dos *buffers* ao modelo matemático, as concentrações de Ca^{2+} livre no RS (x_5) e no citoplasma (x_4) variaram não só com os fluxos preditos no modelo para simulação do MRSFI, mas também com as variações temporais de Ca^{2+} ligado aos *buffers* intrarreticular (x_6) e citosólico (x_7), respectivamente, conforme descrito a seguir:

$$\frac{dx_4}{dt} = v_r.J_{Lrs} + v_r.(J_{Ch} - J_{prs}) - \frac{dx_7}{dt} \tag{3.12}$$

$$\frac{dx_5}{dt} = (-J_{Lrs} + J_{prs} - J_{Ch}) - \frac{dx_6}{dt} \tag{3.13}$$

3.10.3. Liberação fracional versus conteúdo de Ca^{2+} do RS *in silico*

Na simulação do MRSFI, com o modelo matemático acrescido das equações dos *buffers*, a FR foi estimada segundo a expressão:

$$FR = \frac{[Ca]_{RS_repouso} - [Ca]_{RS_caf}}{[Ca]_{RS_repouso}} \times 100 \tag{3.14}$$

onde $[Ca]_{RS_repouso}$ é a concentração intrarreticular total de Ca^{2+} no repouso e $[Ca]_{RS_caf}$ corresponde ao valor mínimo dessa concentração durante a simulação do pulso de cafeína (i.e., após indução de liberação de Ca^{2+}). Ou seja, FR (dada em porcentagem) é a razão entre a redução máxima do conteúdo de Ca^{2+} do RS causada pela simulação do pulso de cafeína e o conteúdo de Ca^{2+} do RS no repouso. Este conteúdo corresponde à soma da concentração do íon livre (x_5) e concentração do íon ligado (x_6) a *buffer* na organela.

As diferentes cargas de Ca^{2+} do RS foram obtidas pela alteração da concentração inicial de Ca^{2+} livre na organela, dada como condição inicial para integração numérica do conjunto de equações que descrevem o modelo. O valor de FR foi estimado para cada carga.

3.10.4. Integração, *software* e microcomputador

O conjunto de equações que descrevem o modelo matemático que simula o MRSFI, acrescido das descrições dos *buffers* citosólico e intrarreticulares, foi integrado numericamente por meio do método de Runge-Kutta de quarta ordem. O algoritmo foi desenvolvido no *software* Matlab, versão 7.1 e a simulação foi implementada em um microprocessador Pentium Dual-Core, 3 GHz.

4. Resultados

4.1. Relação entre liberação fracional de Ca^{2+} e conteúdo de Ca^{2+} do RS

Na Figura 4.1, é mostrado o traçado de $[Ca^{2+}]_i$ durante o procedimento experimental descrito na seção 3.8.1, para estudo da relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$. São mostrados os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados pela aplicação dos estímulos elétricos (neste caso, 20 estímulos), após depleção de Ca^{2+} do RS, seguidos dos transientes gerados pela aplicação prolongada (Figura 4.1A) ou por pulsos (Figura 4.1B) de cafeína em meio sem Na^+ e sem Ca^{2+}.

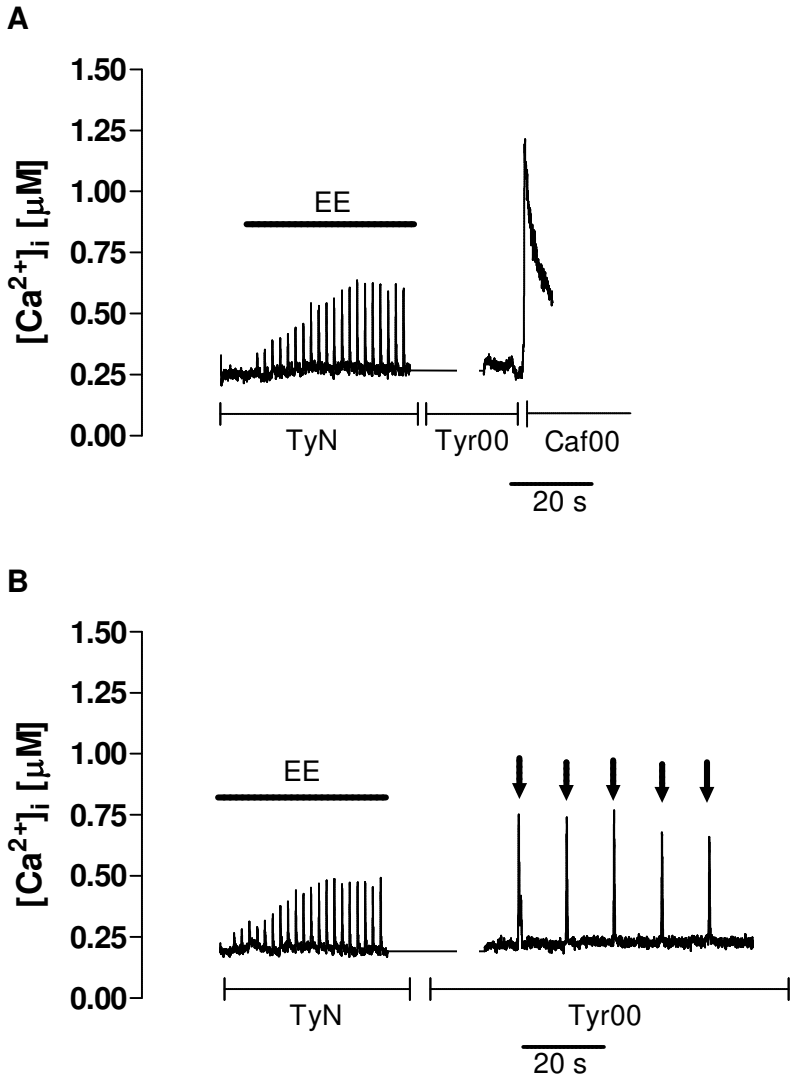

Figura 4.1: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por estimulação elétrica (EE; 20 estímulos) em TyN, seguidos por: (A) transiente gerado por aplicação prolongada de cafeína ou (B) transientes evocados por pulsos de cafeína (setas) em Tyr00.

O procedimento foi realizado aplicando-se 2, 5, 7, 15 ou 20 estímulos elétricos aos miócitos. De acordo com o número de estímulos, foram obtidos diferentes valores de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Tabela 4.1 e Figura 4.2). O conteúdo de Ca^{2+} do RS obtido após 2 estímulos elétricos correspondeu a aproximadamente metade do conteúdo máximo (obtido com 20 estímulos), observação similar à de Bassani *et al.* (2004). Além disso, os valores de $[Ca^{2+}]_{RS}$ após a aplicação de 5 ou mais estímulos elétricos, apesar de apresentarem uma tendência de aumento com o número de estímulos, não foram significativamente diferentes do valor após 20 estímulos ($p > 0,05$). Este comportamento também foi observado em outros trabalhos em miócitos de coelho (Bassani *et al.*, 1993; Shannon *et al.*, 2000b) e rato (Bassani et al., 2004).

Tabela 4.1: Média ± erro padrão da média dos conteúdos de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$; em µM) estimados como função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. n: número de células usadas; p: obtido por análise de variância monofatorial.

NEE	**2**	**5**	**7**	**15**	**20**	**p**
$[Ca^{2+}]_{RS}$	55,3 ± 10,0*	92,9 ± 11,7	107 ± 9,5	108 ± 13,6	123 ± 10,3	<0,05
n	9	10	14	6	8	

Teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ vs. aplicação de 20 estímulos elétricos.

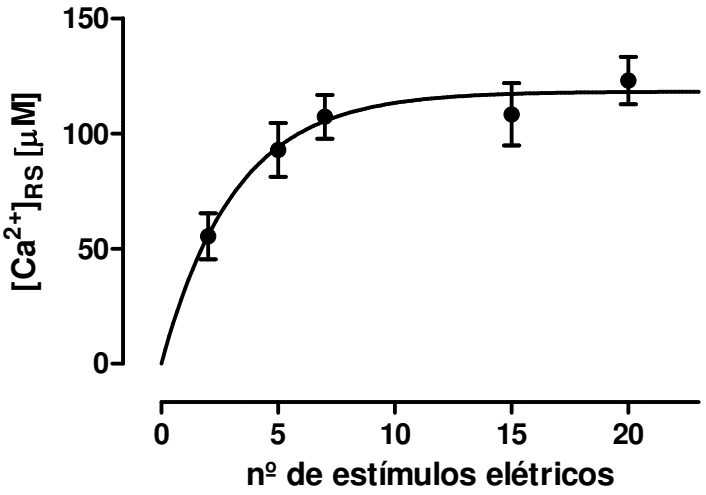

Figura 4.2: Média ± erro padrão da média dos conteúdos de Ca^{2+}do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) estimados como função do número de estímulos elétricos aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Uma função exponencial foi ajustada aos pontos com k = 0,318 ± 0,078 e platô = 118 ± 8,54 µM.

Na Figura 4.3, é mostrado o traçado de $[Ca^{2+}]_i$ durante a aplicação de pulsos de cafeína após carregamento do RS com 7 estímulos elétricos. Pode ser visto neste exemplo que nem todos os 5 pulsos de cafeína aplicados geraram transientes de $[Ca^{2+}]_i$. Na Tabela 4.2 e Figura

4.4, é mostrada a relação entre o número de estímulos elétricos aplicados e o número de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados pelos 5 pulsos de cafeína. Foi visto que a ocorrência destes transientes aumenta com o número de estímulos elétricos ($p < 0,05$). É intrigante o fato de que essa ocorrência é menor quando é feita aplicação de 5 ou 7 estímulos elétricos em comparação à situação em que o miócito foi estimulado 15 ou 20 vezes, pois as cargas de Ca^{2+} do RS obtidas em cada uma dessas situações não foram diferentes significativamente (Tabela 4.1). Na Figura 4.4, pode ser observado que, após 5-15 estímulos elétricos, mesmo para valores de $[Ca^{2+}]_{RS}$ próximos do máximo, a efetividade dos pulsos de cafeína em gerar transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foi submáxima.

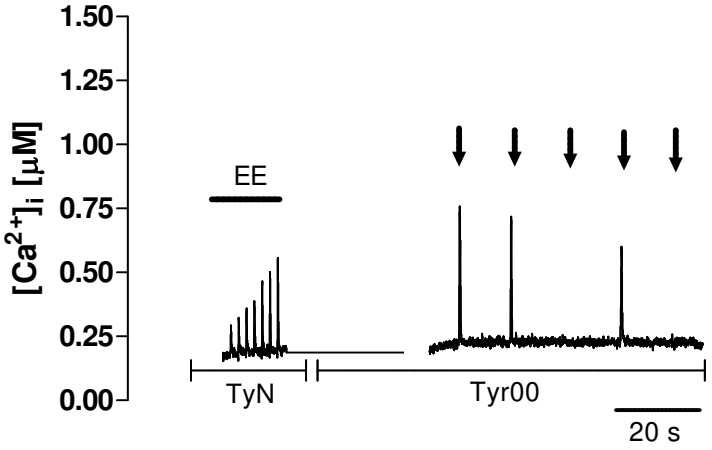

Figura 4.3: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por estimulação elétrica (EE) com 7 estímulos durante perfusão com TyN seguidos por 3 transientes gerados pela aplicação de 5 pulsos de cafeína (setas) em Tyr00.

Tabela 4.2: Média ± erro padrão da média do número de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (NTr) evocados por 5 pulsos de cafeína de acordo com o número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. p: obtido por análise de variância monofatorial. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1.

NEE	**2**	**5**	**7**	**15**	**20**	**p**
NTr	0,33 ± 0,33*	1,5 ± 0,6*	2,4 ± 0,44*	3,8 ± 0,48	4,4 ± 0,26	<0,05

Teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ vs. aplicação de 20 estímulos elétricos.

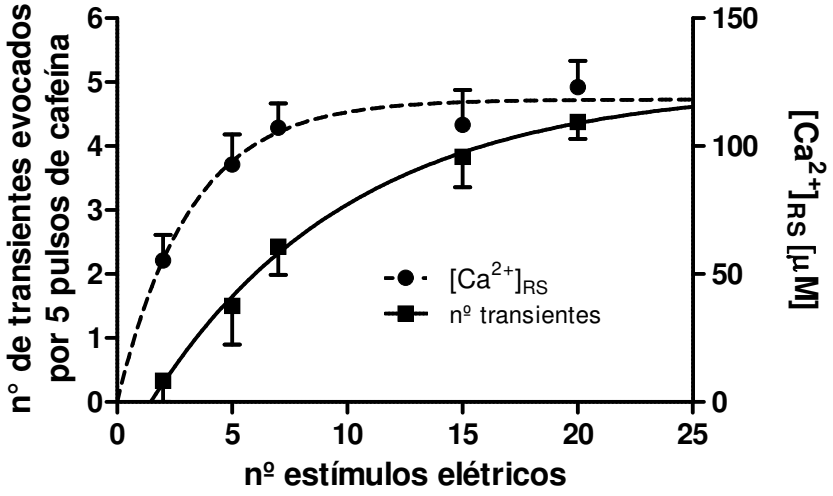

Figura 4.4: Média ± erro padrão da média do número de transientes gerados pelos 5 pulsos de cafeína e do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$), seguindo a aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após depleção de Ca^{2+} do RS. A função exponencial ajustada ao número de transientes gerados apresentou: k = 0,115 ± 0,061 e platô = 4,95 ± 1,09

Também a amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) gerados pelos pulsos de cafeína (Figura 4.1B) variou com o número de estímulos elétricos aplicados e apresentou um crescimento ($p< 0,05$), cujo comportamento foi diferente daquele de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Figura 4.5, Tabela 4.3). De modo semelhante, a amplitude dos transientes evocados pela estimulação elétrica aumentou ($p< 0,05$) à medida que mais estímulos elétricos foram aplicados (Figuras 4.1 e 4.5, Tabela 4.4), porém de modo não paralelo ao aumento de $[Ca^{2+}]_{RS}$, como também observado por Bassani *et al.* (2004).

Tabela 4.3: Média ± erro padrão da média da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$; em µM) gerados pelos pulsos de cafeína em função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1.

NEE	2	5	7	15	20	P
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	0,03 ± 0,03*	0,24 ± 0,11*	0,40 ± 0,09	0,42 ± 0,11	0,74 ± 0,15	<0,05

Teste posterior de Bonferroni: * $p < 0,05$ vs. aplicação de 20 estímulos elétricos.

Tabela 4.4: Média ± erro padrão da média da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$; em µM) gerados pela aplicação de diferentes números de estímulos elétricos (NEE) após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1.

NEE	2	5	7	15	20	P
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	0,15 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,27 ± 0,08	0,43 ± 0,09	0,47 ± 0,11	< 0,05

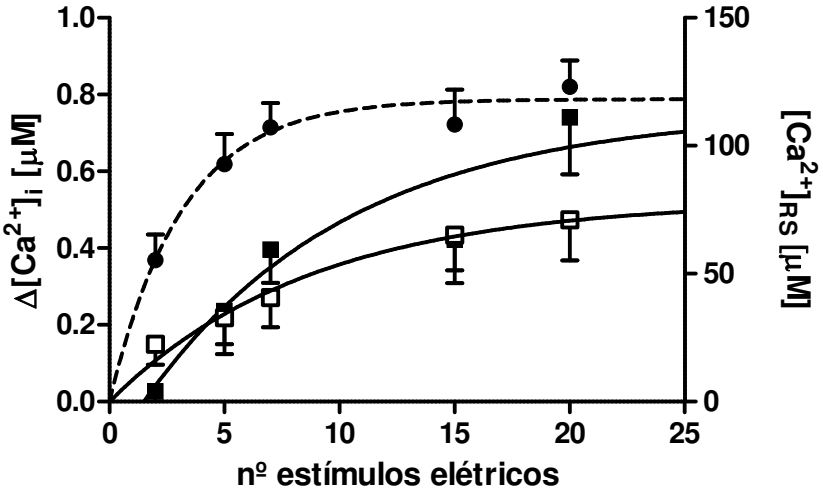

Figura 4.5: Média ± erro padrão da média das amplitudes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) gerados por estimulação elétrica (quadrados brancos) e por pulsos de cafeína (quadrados pretos) em função dos números de estímulos elétricos aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Círculos pretos: conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$). Exponenciais foram ajustadas às $\Delta[Ca^{2+}]_i$ obtidos pela estimulação elétrica (k = 0,114 ± 0,066 e platô = 0,525 ± 0,14 μM) e pelos pulsos de cafeína (k = 0,113 ± 0,090 e platô = 0,757 ± 0,252 μM).

Caso a aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após a depleção de Ca^{2+} do RS altere a concentração diastólica de Ca^{2+} no citosol, poderia ocorrer redução da sensibilidade dos RyR à cafeína, resultando em menor liberação de Ca^{2+} pelo RS. Isto poderia justificar as diferenças encontradas entre os comportamentos dos transientes evocados pelos pulsos de cafeína e de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Figura 4.2). Assim, foram realizados experimentos para medição de $[Ca^{2+}]_i$ diastólica, após estimulação elétrica dos miócitos com mesmos números de estímulos usados no procedimento descrito na seção 3.8.1. Para medição da $[Ca^{2+}]_i$ diastólica, foi usado o indicador de Ca^{2+} indo-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), que apresenta maior afinidade por Ca^{2+} do que o fluo-3 e permite a determinação confiável dos valores diastólico. O indicador indo-1 é excitado em 365 nm e emite em dois comprimentos distintos: 410 e 485 nm, o que exigiu o uso de um sistema de medição de fluorescência contendo dois tubos fotomultiplicadores (modelo RatioMaster, Photon Technology International, Monmouth Junction, New Jersey, EUA), disponível em nosso laboratório. Após a subtração da fluorescência de fundo (i.e., fluorescência medida em campo sem célula) em cada comprimento de onda, a razão entre os dois comprimentos de emissão foi calculada e convertida em $[Ca^{2+}]_i$, com o valor de k_d de 0,844 μM e outros valores dos parâmetros de calibração determinados com a própria instrumentação usada. Na Figura 4.6 e na Tabela 4.5, pode ser observado que não houve diferença entre $[Ca^{2+}]_i$ diastólica medidas após aplicação de 2, 5, 7, 15 e 20

estímulos elétricos (p = 0,66). Este resultado descarta a possibilidade de que $[Ca^{2+}]_i$ diastólica possa ser a causa da divergência entre o comportamento dos transientes e de $[Ca^{2+}]_{RS}$.

Tabela 4.5: Média ± erro padrão da média da concentração diastólica de Ca^{2+} no citosol ($[Ca^{2+}]_d$; em µM) medida após aplicação de diferentes números de estímulos elétricos (NEE) posteriores à depleção de Ca^{2+} do RS. p: obtido por análise de variância monofatorial para amostras pareadas (n = 10).

NEE	**2**	**5**	**7**	**15**	**20**	**p**
$[Ca^{2+}]_d$	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,66

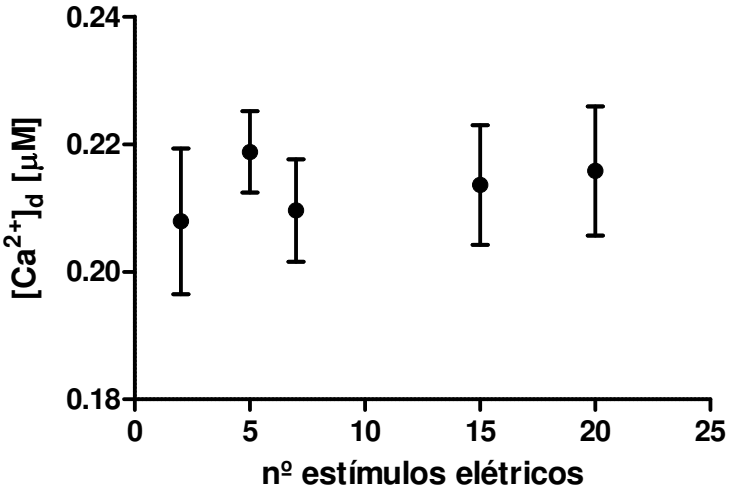

Figura 4.6: Média ± erro padrão da média da concentração diastólica de Ca^{2+} no citosol ($[Ca^{2+}]_d$) em resposta à aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após depleção do RS.

Na Tabela 4.6, são mostrados os valores de FR estimados como a razão entre a variação de $[Ca^{2+}]_T$ decorrente da aplicação dos pulsos de cafeína e $[Ca^{2+}]_{RS}$. Em seguida, na Figura 4.7, é mostrada a relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$. Pode ser visto um aumento não-linear da FR com o aumento de $[Ca^{2+}]_{RS}$. Para cargas do RS próximas a 50 µM (obtidas por aplicação de 2 estímulos), a FR estimada foi quase nula e, em cargas próximas a 100 µM (obtidas por aplicação de 5 a 20 estímulos), pequenos incrementos de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (de 93 a cerca de 123 µM) resultaram em grandes aumentos da FR (de 37 para 83%). É importante observar que, em outros trabalhos, nos quais o gatilho para liberação de Ca^{2+} foi $I_{Ca,L}$, e não cafeína (Figura 4.7; Bassani *et al*., 1995; Shannon *et al*., 2000a), foi observado um comportamento não-linear da relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ muito semelhante ao encontrado neste trabalho.

Tabela 4.6: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} pelo RS (FR) em função do número de estímulos elétricos (NEE) aplicados após depleção de Ca^{2+} do RS. Foram usadas mesmas células da Tabela 4.1.

NEE	2	5	7	15	20	p
FR (%)	5,44 ± 5,44*	36,8 ± 14,5*	56,1 ± 9,11	66,3 ± 6,00	82,8 ± 7,24	< 0,05

Teste posterior de Bonferroni: * p < 0,05 vs. aplicação de 20 estímulos elétricos.

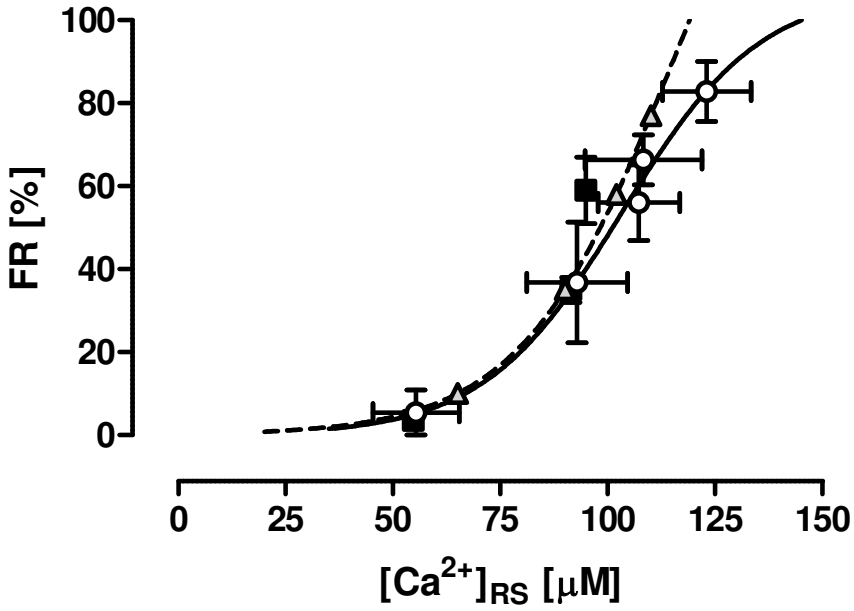

Figura 4.7: Média ± erro padrão da liberação fracional de Ca^{2+} (FR) *versus* média ± erro padrão do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) calculados neste trabalho (círculos brancos). Mostrados também FR ativada por corrente de Ca^{2+} tipo-L encontradas por Bassani *et al*. (1995; quadrados pretos) e por Shannon *et al.* (2000a; triângulos cinzas). Funções sigmóides foram ajustadas aos pontos obtidos neste trabalho (linha contínua; EC50 = 103 ± 7,8 μM e Hill slope = 0,027) e por Shannon *et al.* (2000a; linha tracejada; EC50 = 105,3 ± 0,05 μM e Hill slope = 0,025).

4.2. Efeitos da tetracaína sobre FR

O efeito inibitório da tetracaína sobre os RyR expressos em músculo estriado esquelético e cardíaco já foi observado em diversos trabalhos (Antoniu *et* al.,1985; Palade, 1987; Overend *et al.*, 1998; Laver & Helden, 2011). No entanto, é difícil estudar seu efeito sobre os RyR em miócitos intactos, sob estimulação elétrica, uma vez que a droga age também sobre correntes de membrana e inibe a geração do potencial de ação, impedindo a ativação da liberação de Ca^{2+} do RS por $I_{Ca,L}$. Na Figura 4.8, é mostrado o traçado de $[Ca^{2+}]_i$ durante execução do procedimento experimental para estudo do efeito da tetracaína sobre a FR em células intactas, com o uso do MRSFI, como descrito na seção 3.8.2. São mostrados os

transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados pela estimulação elétrica dos miócitos em TyN, seguidos pelos transientes gerados pelos 5 pulsos de cafeína em Tyr00 (controle; Figura 4.8A) ou em Tyr00 contendo 20 µM de tetracaína (Figura 4.8B). Na sequência, é mostrado o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ evocado pela aplicação prolongada de cafeína, usado para estimativa de $[Ca^{2+}]_{RS}$.

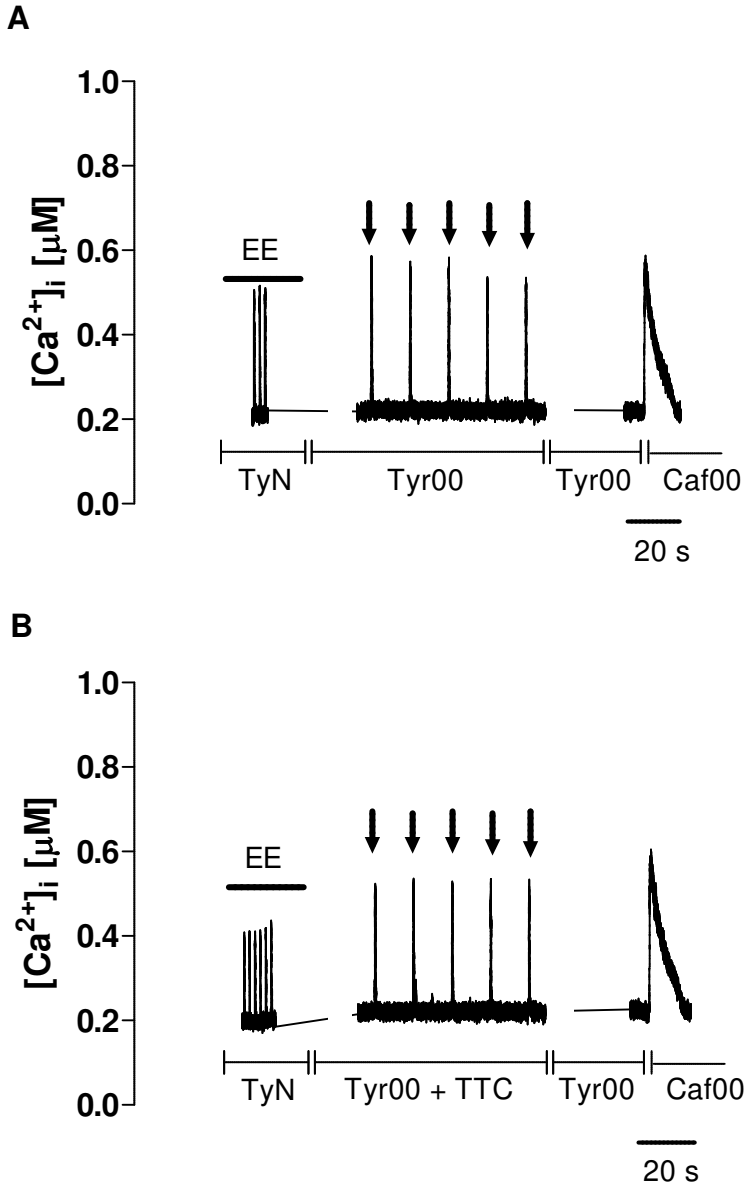

Figura 4.8: Transientes de Ca^{2+} gerados por estimulação elétrica (EE) seguidos por transientes evocados por pulsos de cafeína (setas) alternados com: (A) Tyr00 ou (B) Tyr00 contendo 20 µM de tetracaína (TTC). Em seguida, é mostrado transiente de $[Ca^{2+}]_i$ gerado pela aplicação prolongada de cafeína em meio sem tetracaína.

De acordo com o protocolo experimental, os miócitos foram perfundidos também com 50 e 100 µM de tetracaína diluída em Tyr00. Inicialmente, estimou-se FR, calculada como descrito anteriormente, em cada um dos 5 pulsos de cafeína para cada concentração da droga, sendo a situação controle aquela na ausência de tetracaína (Tabela 4.7). A análise de variância bifatorial indicou que esses valores de FR variaram não apenas com a concentração de tetracaína, mas também com o número de pulsos aplicados ($p< 0,05$), com progressiva redução à medida que os pulsos se sucediam. O teste de Bonferroni indicou que esta redução foi significativa apenas na presença de tetracaína, sugerindo um efeito dependente do uso do canal (i.e., que requer ativação prévia do RyR para se desenvolver). Na concentração de 20 µM de tetracaína, a estabilização de FR ocorreu no quarto pulso de cafeína, enquanto, nas concentrações de 50 e 100 µM, esta estabilização ocorreu no terceiro e no segundo pulsos de cafeína, respectivamente. Por isso, o valor de FR durante o quinto pulso de cafeína, no qual FR já se estabilizara, foi usado para analisar o efeito que a droga exerce sobre a liberação de Ca^{2+} pelo RS. Na Figura 4.9, é ilustrada a inibição da FR dependente da concentração de tetracaína.

Tabela 4.7: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} em cada pulso de cafeína (FR $_{1º\ pulso}$ a FR $_{5º\ pulso}$; em %) em diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). n: número de células usadas

[TTC] (µM)	**0**	**20**	**50**	**100**
FR $_{1º\ pulso}$	99,3 ± 3,2	105,2 ± 8,7	101,2 ± 4,0	43,7 ± 25,6
FR $_{2º\ pulso}$	91,2 ± 4,0	101,4 ± 6,4	91,7 ± 3,2	17,4 ± 17,4$^{\#}$
FR $_{3º\ pulso}$	90,5 ± 4,4	91,3 ± 7,6	61,4 ± 15,9$^{\#}$	0$^{\#}$
FR $_{4º\ pulso}$	83,9 ± 3,8	78,0 ± 13,7$^{\#}$	59,6 ± 15,6$^{\#}$	0$^{\#}$
FR $_{5º\ pulso}$	80,0 ± 4,4	78,3 ± 10,7$^{\#}$	44,1 ± 16,1$^{\#}$	0$^{\#}$
n	10	9	7	4

Teste de Bonferroni: $^{\#}$ $p < 0,05$ vs. 1º pulso.

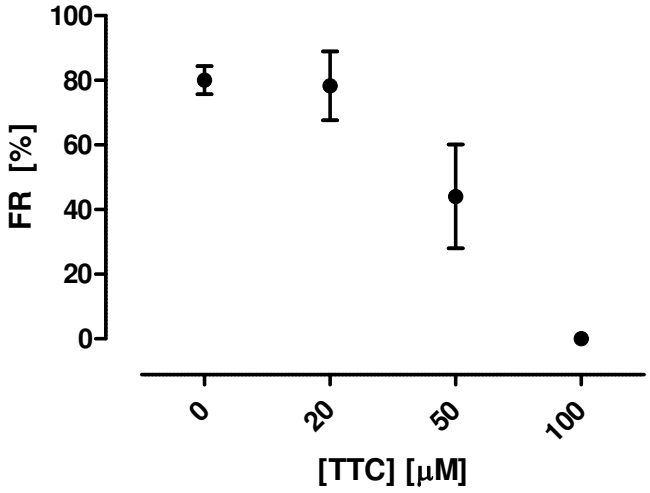

Figura 4.9: Média ± erro padrão da média da liberação fracional de Ca^{2+} (FR) durante a aplicação do 5º pulso de cafeína na presença de diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]).

No entanto, como mostrado na seção 4.1, FR é modulada por $[Ca^{2+}]_{RS}$. Diante disso, foi investigada a possibilidade de que as alterações de FR encontradas estivessem relacionadas com mudanças de $[Ca^{2+}]_{RS}$. Na Tabela 4.8 e Figura 4.10, pode ser observado que $[Ca^{2+}]_{RS}$, medido após aplicação dos pulsos de cafeína, não variou com a concentração de tetracaína (p= 0,998).

Tabela 4.8: Média ± erro padrão da média do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) após pulsos de cafeína alternados com soluções contendo diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). Foram usadas mesmas células da Tabela 4.7.

[TTC] [μM]	**0**	**20**	**50**	**100**	**p**
$[Ca^{2+}]_{RS}$ [μM]	81,8 ± 10,5	81,6 ± 8,6	79,1 ± 9,4	81,3 ± 23,8	0,998

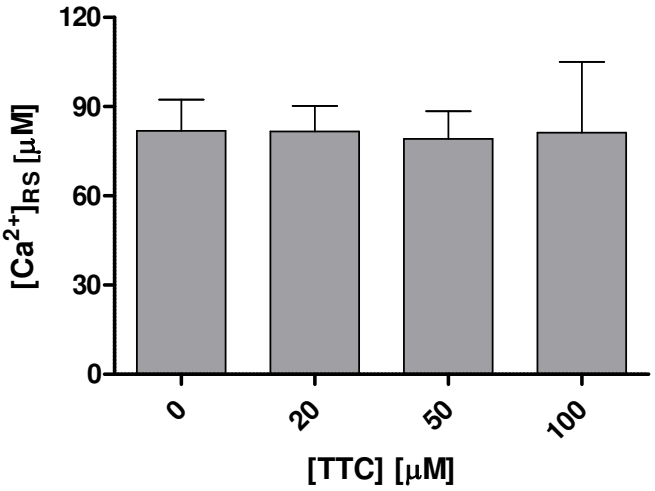

Figura 4.10: Média ± erro padrão da média do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) após pulsos de cafeína em diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]).

A redução de FR, calculada como a diferença entre FR na situação controle e na presença de tetracaína, foi expressa como porcentagem de FR controle para estimativa da inibição relativa causada pela droga (Tabela 4.9 e Figura 4.11). De acordo com a análise de variância, houve uma inibição parcial de FR pela perfusão dos miócitos com 50 µM de tetracaína ($p < 0,05$) e inibição total com 100 µM da droga ($p < 0,05$). A perfusão com 20 µM de tetracaína provocou pequena inibição de FR, porém, não significativa. Com o ajuste de uma função sigmóide aos pontos, pode ser estimado que a concentração da droga que causa 50 % da inibição máxima (IC_{50}) foi de 51,83 ± 0,13 µM.

Tabela 4.9: Média ± erro padrão da média da inibição da liberação fracional de Ca^{2+} causada pela perfusão dos miócitos com diferentes concentrações de tetracaína ([TTC]). p: obtido por análise de variância monofatorial.

[TTC] [µM]	**0**	**20**	**50**	**100**	**p**
Inibição [%]	0,0 ± 0,0	2,6 ± 13,6	44,5 ± 20,2*	100,0 ± 0,0*	< 0,05

Teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ vs. 0 µM de tetracaína

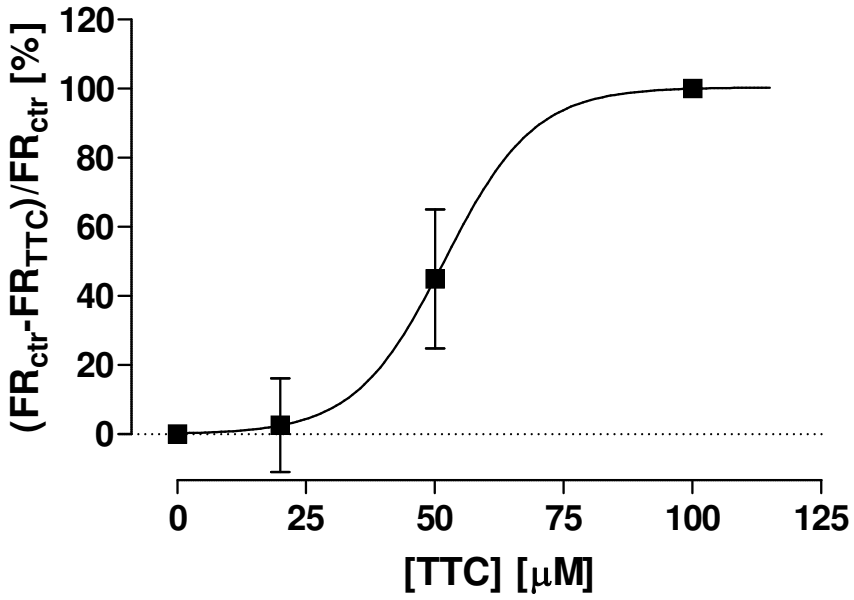

Figura 4.11: Média ± erro padrão da média da inibição da liberação fracional de Ca^{2+}, calculada como a diferença entre liberação fracional na situação controle (FR_{ctr}) e liberação fracional na presença de tetracaína (FR_{TTC}) dividida por FR_{ctr}, em função da concentração de tetracaína ([TTC]). Função sigmóide ajustada aos pontos: coeficiente de Hill = 0,05 e IC_{50} = 51,83 ± 013 μM

4.3. Simulação do MRSFI

O modelamento matemático tem sido explorado como forma de ampliar o entendimento da regulação e transporte de Ca^{2+} intracelular (Tang & Othmer, 1994; Shannon *et al.*, 2004; Lee & Keener, 2008). Seguindo as adaptações feitas por Soriano *et al.* (2007a), neste trabalho, o modelo matemático da dinâmica do Ca^{2+} intracelular de Tang & Othmer (1994) foi modificado para simulação do MRSFI. Como descrito na seção 3.10, os valores das taxas de associação e dissociação de Ca^{2+} dos RyR foram alterados, de modo a favorecer a permanência dos RyR no estado aberto, simulando o efeito dos pulsos de cafeína. Além disso, assim como o vazamento transarcolema, a extrusão celular de Ca^{2+} foi inibida ao tornar os transportadores de Ca^{2+} de membrana inoperantes. Dessa maneira, o MRSFI foi simulado e, de fato, foram gerados transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4.12A) com comportamento semelhante ao transiente experimental (Figura 4.12B). Contudo, algumas diferenças podem ser notadas, como a subida mais abrupta e queda mais lenta do transiente simulado em relação ao experimental.

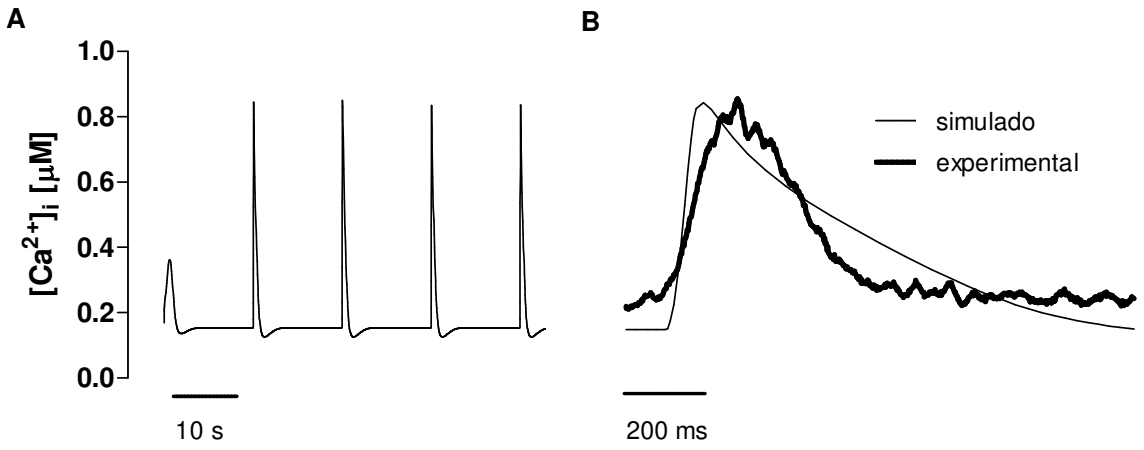

Figura 4.12: A) Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ gerados por simulação de MRSFI de acordo com modificações de modelo matemático de Tang & Othmer (1994) sugeridas por Soriano *et al.* (2007a); B) Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ simulado em escala temporal ampliada sobreposto ao transiente obtido por MRSFI experimental.

4.4. Simulação do MRSFI com buffers de Ca^{2+}

O modelo de Tang & Othmer (1994) é um modelo simplificado da dinâmica do Ca^{2+} intracelular, no qual elementos importantes que participam da regulação dessa dinâmica não foram considerados. No presente trabalho, ao modelo matemático adaptado por Soriano *et al.* (2007a) para simulação do MRSFI, foram acrescentadas formulações referentes a ligantes passivos de Ca^{2+} intrarreticulares e citosólicos, na tentativa de otimizar este modelo.

Como descrito na seção 3.10.2, o primeiro passo desta fase do trabalho foi adicionar a formulação referente ao *buffer* de Ca^{2+} intrarreticular. Ajustes dos parâmetros dessa equação foram feitos a partir de valores sugeridos por Shannon *et al*. (2004) para o principal *buffer* intrarreticular de Ca^{2+}, a calsequestrina. Na Figura 4.13, são mostrados transientes obtidos pela simulação do modelo matemático, sobrepostos ao transiente obtido experimentalmente. Na Figura 4.13A, pode ser observado principalmente que o acréscimo do *buffer* de Ca^{2+} intrarreticular aumentou muito a amplitude do transiente. Além disso, na Figura 4.13B, onde são mostrados os transientes sobrepostos e normalizados por seus valores de pico, nota-se que este transiente apresentou variações menos abruptas, com tempo de subida até o pico do transiente (t_s) maior do que no modelo sem adição de *buffers*. Contudo, o tempo de queda do pico até metade da amplitude do transiente ($t_{1/2}$) foi consideravelmente maior do que encontrado no transiente experimental (Tabela 4.10 e Figura 4.13B).

Tabela 4.10: Valores de amplitude, tempo de queda do pico até metade da amplitude ($t_{1/2}$) e tempo de subida (t_s) do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulado por modelo sem *buffers*, somente com *buffer* de Ca^{2+} do RS e com os dois *buffers* (RS e citosólico)

	Amplitude [µM]	**$t_{1/2}$ [s]**	**t_s [s]**
Experimental (n = 6)	0,537 ± 0,06	0,129 ± 0,01	0,326 ± 0,02
Sem *buffers*	0,679	0,247	0,083
***Buffer* RS**	1,42	0,304	0,198
***Buffers* RS + citosólico**	1,01	0,163	0,136

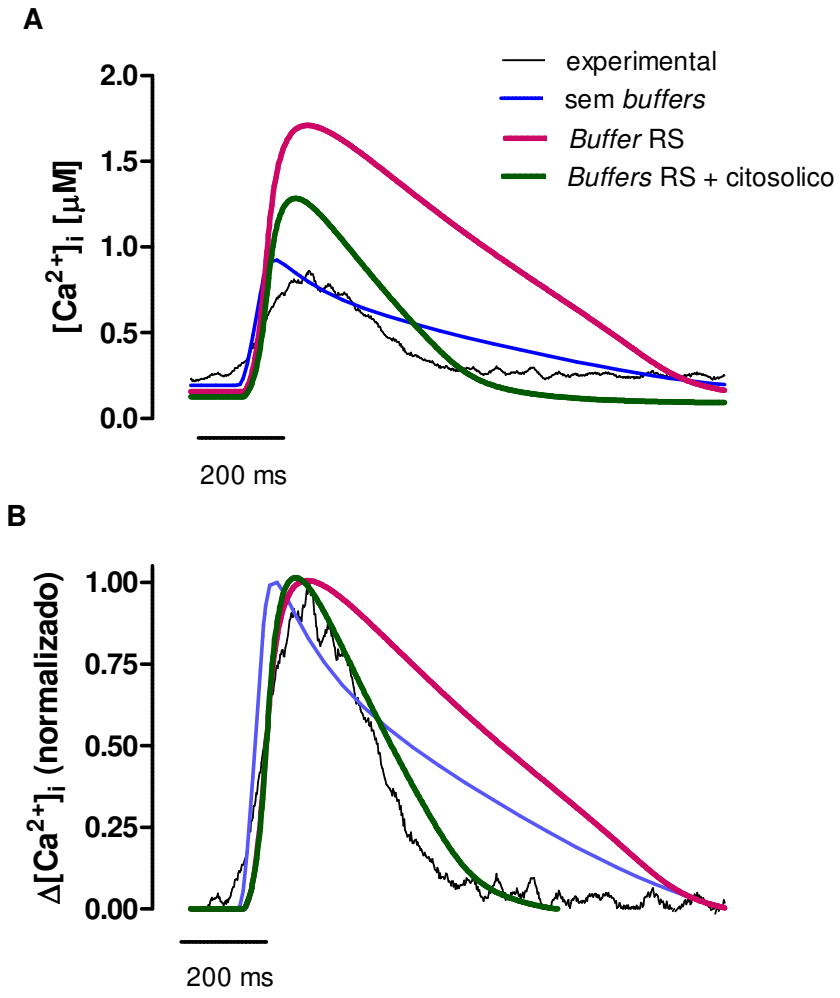

Figura 4.13: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulados foram sobrepostos (A e B) e normalizados para comparação temporal (B).

A descrição do *buffer* de Ca^{2+} citosólico, cujos parâmetros foram ajustados a partir de valores sugeridos por Bassani *et al.* (1998), foi adicionada em seguida. O aumento do transiente

de $[Ca^{2+}]_i$ causado pela introdução do *buffer* intrarreticular foi amortecido, reduzindo, dessa maneira, a amplitude do transiente simulado para um valor mais próximo ao do transiente experimental (Tabela 4.10 e Figura 4.13A). Somado a isso, a adição do *buffer* citosólico reduziu o $t_{1/2}$ quando comparado aos transientes gerados pelo modelo sem *buffers* e acrescido apenas da formulação do *buffer* intrarreticular. Entretanto, seu t_s foi reduzido, apesar de ainda ser mais semelhante ao experimental do que o transiente resultante do modelo sem *buffers* (Tabela 4.10 e Figura 4.13B).

4.5. Relação entre liberação fracional e conteúdo de Ca^{2+} do RS *in silico*

No presente trabalho, foi analisada a regulação da liberação de Ca^{2+} do RS exercida pela organela no MRSFI simulado. Para isso, FR foi calculada em diferentes conteúdos de Ca^{2+} do RS. Para alterar este conteúdo, foram assumidos diferentes valores da concentração inicial de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$), que, no modelo sem *buffers*, corresponde ao próprio conteúdo inicial de Ca^{2+} da organela. Estes valores foram dados como uma das condições iniciais antes da integração do conjunto de equações que descrevem o modelo. Na Tabela 4.11 e Figura 4.14, são mostrados $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtidos pelos modelos contendo ou não as formulações referentes aos *buffers* de Ca^{2+} intrarreticular e citosólico. No modelo sem *buffers*, $[Ca^{2+}]_{RS}$ cresceu com $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ até saturação em torno de 40 µM. Com o acréscimo dos *buffers*, $[Ca^{2+}]_{RS}$ não só partiu de valores cerca de 6 vezes maiores do que no modelo sem *buffers*, como também atingiu valores próximos a 100 µM, que se situam na faixa de $[Ca^{2+}]_{RS}$ tipicamente encontrada em miócitos ventriculares isolados (Bers, 2001).

Tabela 4.11: Conteúdos de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no modelo matemático contendo ou não as descrições dos *buffers* de Ca^{2+} para diferentes concentrações iniciais de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$). No modelo contendo os *buffers*, foram testados 3 valores de $B_{max\text{-}RS}$: 1400, 1800 e 2000 μM.

$[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ [μM]	Sem *buffers* de Ca^{2+}	Com *buffers* de Ca^{2+}		
		$B_{max\text{-}RS}$=1400 μM	$B_{max\text{-}RS}$=1800 μM	$B_{max\text{-}RS}$=2000 μM
	$[Ca^{2+}]_{RS}$ [μM]			
4	8,3	49,3	50,1	50,4
10	13,9	54,5	55,5	55,8
20	23,3	63	64,3	64,8
40	40,4	78,9	81,3	82,2
50	37,1	85,4	89,3	90,5
60	38,3	91,7	96,5	98,3
70	40,41	-	101,1	105,1

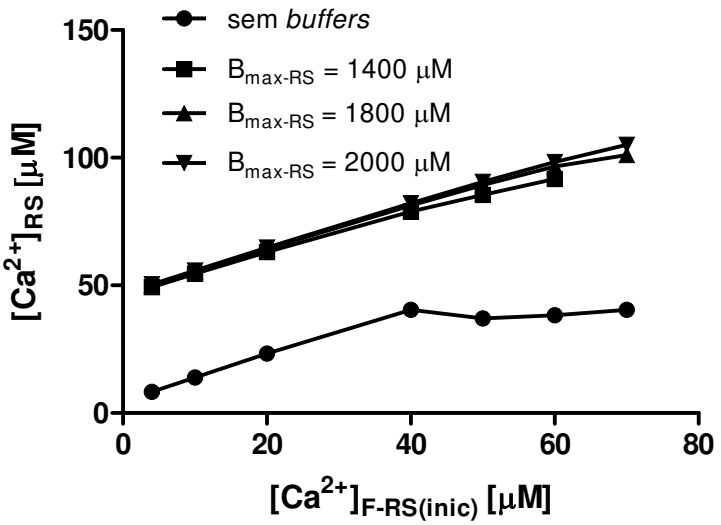

Figura 4.14: Conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) em função da concentração inicial de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$) no modelo sem e com as descrições dos *buffers* de Ca^{2+} para diferentes valores de $B_{max\text{-}RS}$.

O contínuo aumento de $[Ca^{2+}]_{RS}$ por meio da alteração de $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ para valores além dessa faixa tornou instável o modelo acrescido dos *buffers*, com o surgimento de oscilações de $[Ca^{2+}]_i$, como mostrado na Figura 4.15. A concentração da CSQ no RS foi aumentada por meio da alteração dos valores de $B_{max\text{-}RS}$, na tentativa de aumentar o armazenamento de Ca^{2+} na organela sem que houvesse a instabilidade do modelo. Apesar de $[Ca^{2+}]_{RS}$ não ter aumentado de maneira significativa, com seu valor mínimo mantido em valores

próximos a 50 µM para qualquer concentração do *buffer* (Tabela 4.11 e Figura 4.14), o limiar de instabilidade do modelo apresentou pequenas alterações. Para uma menor concentração de CSQ ($B_{max\text{-}RS}$ = 1400 µM), o modelo tornou-se muito instável para valores de $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ maiores que 60 µM, enquanto, para maiores concentrações do *buffer* (1800 e 2000 µM), esta instabilidade ocorreu em valores de $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ um pouco maiores (75 e 80 µM, respectivamente).

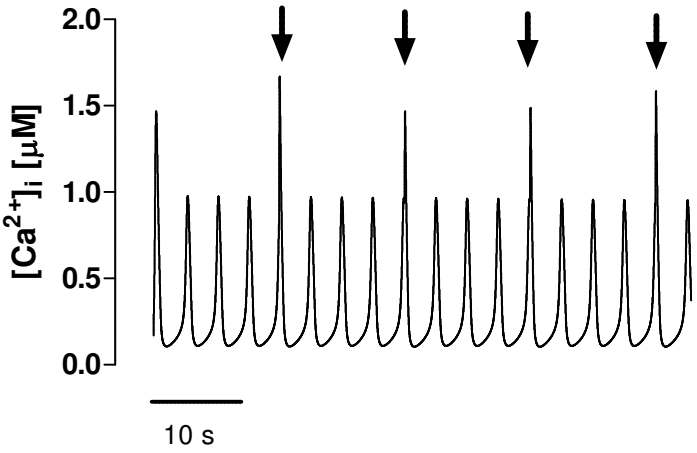

Figura 4.15: Transientes evocados pelos pulsos de cafeína (setas) e oscilações espontâneas de $[Ca^{2+}]_i$ em modelo contendo *buffers* para $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ = 75 µM ($B_{max\text{-}RS}$ = 1800 µM).

No modelo matemático, a liberação fracional de Ca^{2+} pelo RS foi estimada como a razão entre a redução do $[Ca^{2+}]_{RS}$ durante simulação do pulso de cafeína e $[Ca^{2+}]_{RS}$ em repouso (Figura 4.16), em cada $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$.

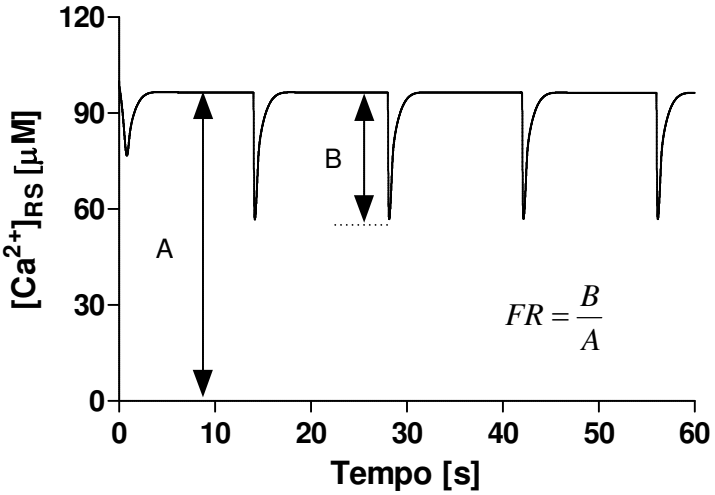

Figura 4.16: Simulação do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no modelo contendo *buffers* de Ca^{2+} no interior do RS e no citoplasma (parâmetros do *buffer* intrarreticular: B_{max} = 1800 µM; k_{on} = 0,55 $\mu M^{-1}s^{-1}$; k_{off} = 650 s^{-1}; parâmetros do *buffer* citosólico: B_{max} = 3 µM; k_{on} = 1 $\mu M^{-1}s^{-1}$; k_{off} = 0,8 s^{-1}; $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ = 60 µM. Liberação fracional de Ca^{2+} (FR) foi equivalente à razão entre redução máxima de $[Ca^{2+}]_{RS}$ durante pulso de cafeína (B) e $[Ca^{2+}]_{RS}$ no repouso (A).

Na Tabela 4.12 e Figura 4.17, são mostradas as relações entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtidas *in silico*. Como já descrito (Figura 4.14), no modelo sem *buffers*, os valores de $[Ca^{2+}]_{RS}$ estão abaixo da faixa encontrada em miócitos isolados. A tentativa (sem êxito) de aumentar este conteúdo pelo aumento de $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ não provocou oscilações de $[Ca^{2+}]_i$, mas gerou um comportamento instável da regulação exercida pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS sobre o processo de liberação de Ca^{2+}. FR, que foi nula apenas na condição em que RS estava vazio, cresceu subitamente a partir de cargas próximas a 25 µM até atingir seu valor máximo (48 %) em 40,4 µM. Contudo, nesta carga de Ca^{2+} do RS, FR assumiu mais de um valor, que dependeu apenas do valor de $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ usado (40 ou 70 µM). Além disso, aumentando-se $[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ de 50 para 60 µM, observou-se um aumento muito pequeno da carga do RS (de 37,1 para 38,3 µM), no entanto, acompanhado por redução de FR (de cerca de 41 para 35 %, respectivamente), um comportamento bem diferente daquele encontrado *in vitro*.

A adição dos *buffers* de Ca^{2+}, além de aumentar $[Ca^{2+}]_{RS}$ para valores mais próximos daqueles encontrados experimentalmente, estabilizou a relação FR-$[Ca^{2+}]_{RS}$ (Tabela 4.12 e Figura 4.17). O aumento da carga de Ca^{2+} do RS foi acompanhado por um aumento não linear de FR, sem dependência dos valores iniciais da carga. A sensibilidade de FR a $[Ca^{2+}]_{RS}$ foi testada em diferentes concentrações de CSQ no RS. Na Tabela 4.12 e Figura 4.17, pode ser visto que o aumento do *buffer* ($B_{max\text{-}RS}$ de 1400 a 2000 µM) reduziu o valor de FR em um mesmo $[Ca^{2+}]_{RS}$, reduzindo, assim, a sensibilidade de FR à carga de Ca^{2+} do RS.

Tabela 4.12: Conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$, em µM) e liberação fracional de Ca^{2+} (FR, em %) em função da concentração de Ca^{2+} livre no RS ($[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$) obtidos pelo modelo sem e com os *buffers* de Ca^{2+}. Neste caso, foram testados 3 valores de $B_{max\text{-}Rs}$: 1400, 1800 e 2000 µM.

$[Ca^{2+}]_{F\text{-}RS(inic)}$ [µM]	Sem *buffers* de Ca^{2+}		Com *buffers* de Ca^{2+}					
			$B_{max\text{-}RS}$ 1400 µM		$B_{max\text{-}RS}$ 1800 µM		$B_{max\text{-}RS}$ 2000 µM	
	$[Ca^{2+}]_{RS}$	FR	$[Ca^{2+}]_{RS}$	FR	$[Ca^{2+}]_{RS}$	FR	$[Ca^{2+}]_{RS}$	FR
4	8,3	5	49,3	4,7	50,1	3,6	50,4	3
10	13,9	5,9	54,5	5,8	55,5	4,1	55,8	3
20	23,3	8,9	63	9,4	64,3	5,4	64,8	4
40	40,4	48	78,9	33,3	81,3	18,9	82,2	11
50	37,1	40,7	85,4	42,1	89,3	33,0	90,5	24
60	38,3	35,5	91,7	48,6	96,5	41,1	98,3	35
70	40,41	33,2	-	-	101,1	45	105,1	41

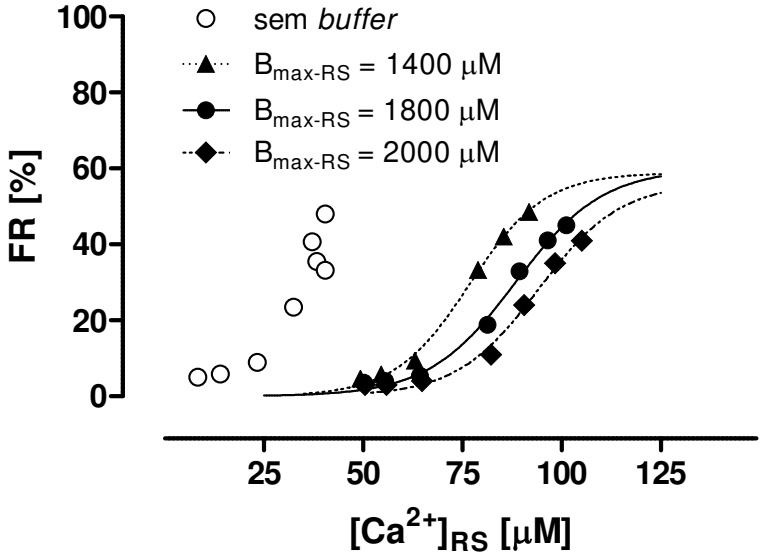

Figura 4.17: Liberação fracional de Ca^{2+} (FR) em função do conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) no MRSFI simulado pelo modelo sem e com os *buffers* de Ca^{2+}, para 3 valores de $B_{max\text{-}RS}$: 1400, 1800 e 2000 µM. Sigmóides ajustada aos pontos obtidos pelo modelo com *buffers* de Ca^{2+} para valores de $B_{max\text{-}RS}$ de 1400, 1800 e 2000 µM apresentaram Hill slope de 0,046, 0,040 e 0,042, respectivamente, e nível de estabilização de FR de 58,7, 60,0 e 56,2 %, respectivamente.

O ajuste de uma função sigmóide aos pontos obtidos com as 3 concentrações de CSQ indicou que há uma saturação de FR em níveis que dependeram do valor de $B_{max\text{-}RS}$ (Tabela 4.13), mas que, em todos os casos, ocorreu num valor abaixo do valor máximo de FR obtido

experimentalmente (83 %, com 20 estímulos, Tabela 4.6). A relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtida *in silico* para o valor de B_{max-RS} de 1800 µM é mostrada na Figura 4.18, juntamente com a relação obtida *in vitro*. Pode ser observado que no MRSFI simulado, assim como *in vitro*, a liberação de Ca^{2+} foi interrompida em $[Ca^{2+}]_{RS}$ próxima a 50 µM. Além disso, FR variou de modo não linear com o conteúdo de Ca^{2+} do RS. Assim, o modelo contendo as descrições dos *buffers* de Ca^{2+} mostrou-se capaz de simular a regulação intrínseca da FR (i.e., dependente da $[Ca^{2+}]_{RS}$) muito semelhante à determinada experimentalmente.

Tabela 4.13: Valores de níveis de saturação da liberação fracional de Ca^{2+} (FR, em %) para diferentes B_{max-RS}.

B_{max-RS} [µM]	**1400**	**1800**	**2000**
Saturação de FR [%]	58,9	60,0	56,2

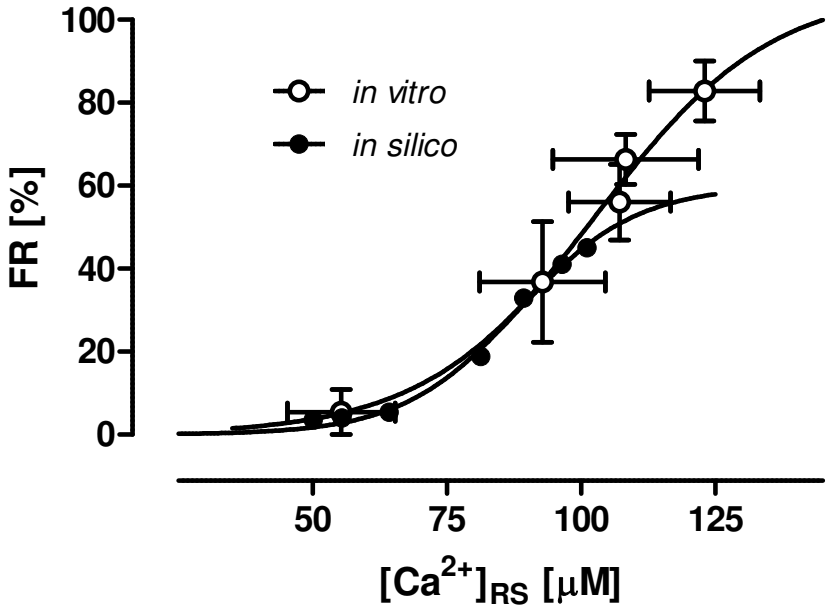

Figura 4.18: Comparação das relações entre liberação fracional de Ca^{2+} (FR) e conteúdo de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) *in vitro* e *in silico* (B_{max-RS} = 1800 µM). As funções sigmóides ajustadas aos pontos *in vitro* e *in silico* apresentaram Hill slope de 0,027 e 0,040, respectivamente, e nível de saturação de FR de 107,4 % e 60,0 %, respectivamente.

5. Discussão

O modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado foi inicialmente desenvolvido neste laboratório para o estudo da captação de Ca^{2+} pelo RS (Soriano, 2007). Neste trabalho, de maneira complementar, este modelo experimental foi aplicado à análise da liberação de Ca^{2+} por esta organela, buscando melhorar o entendimento da função e regulação do RS em miócitos cardíacos.

5.1. Regulação da liberação fracional pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS

No estudo da regulação exercida pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS sobre a liberação fracional, diferentes cargas de Ca^{2+} da organela foram obtidas variando-se o número de estímulos elétricos aplicados após depleção do estoque de Ca^{2+} do RS. Assim como encontrado em trabalho anterior (Bassani *et al*., 2004), a aplicação de apenas 2 estímulos elétricos resultou em preenchimento do RS com uma carga de Ca^{2+} de cerca de 50 % daquela obtida em regime permanente (após 20 estímulos). O RS foi completamente recarregado com aplicação de 5 estímulos, dado semelhante ao encontrado por Bassani *et al.* (1993) e Shannon *et al.* (2000b), em miócitos de coelho, e por Bassani *et al.* (2004), em ratos. Apesar de terem usado uma técnica diferente, mantendo os miócitos em *voltage-clamp* na ausência de Na^{+}, Shannon *et al.* (2000b) também viram que a aplicação de mais estímulos (até 20 pulsos de tensão) não resultou em aumento da carga do RS.

Sabe-se que a taxa de captação de Ca^{2+} pela SERCA depende não apenas da concentração citosólica de Ca^{2+} (seu substrato), mas também do gradiente da concentração de Ca^{2+} livre entre citosol e RS, que estabelece a barreira energética para a enzima (Ginsburg *et al*., 1998). Assim, quando a concentração de Ca^{2+} livre no RS é baixa, esta barreira é menor e a enzima capta eficientemente o Ca^{2+} que adentra a célula via $I_{Ca,L}$ e o estoque de Ca^{2+} da organela é refeito após aplicação de apenas 5 estímulos elétricos. Nesta condição, à medida que mais Ca^{2+} é recaptado para o RS, a contínua interação do íon com a calsequestrina, principal *buffer* de Ca^{2+} do RS (Jorgensen *et al*., 1985; Scott *et al*., 1988), leva provavelmente ao início da saturação deste *buffer*. Dessa maneira, como há uma redução da ligação de Ca^{2+} à CSQ, a concentração de Ca^{2+} livre no RS tende a aumentar. Isto provoca não só a redução da captação de Ca^{2+} pela SERCA, como também o aumento do vazamento de Ca^{2+} pelos RyR, que também são estimulados pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intra-reticular (Shannon *et al*., 2002). Esses dois efeitos limitariam a carga de Ca^{2+} do RS, dificultando seu aumento, como

pode ser inferido neste trabalho, da observação que a aplicação de mais de 5 estímulos elétricos não causa aumento significativo da carga do RS.

No presente trabalho, foi visto que o número de estímulos elétricos aplicados aos miócitos após o esvaziamento do RS afetou não só a $[Ca^{2+}]_{RS}$, mas também a ocorrência e amplitude de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados pelos pulsos de cafeína, e a amplitude de transientes evocados por estímulos elétricos. No entanto, a recuperação da amplitude desses transientes mostrou-se incompleta após um número de estímulos elétricos suficiente para restaurar a $[Ca^{2+}]_{RS}$. Buscou-se investigar algum fator que pudesse explicar este comportamento. Um possível candidato foi a concentração diastólica de Ca^{2+} no citoplasma, que poderia modificar a atividade dos RyR, porém não foi encontrada alteração em seu valor depois da aplicação de diferentes números de estímulos elétricos após esvaziamento do RS. Shannon *et al.* (2000b) observaram um aumento desta concentração à medida que mais estímulos foram aplicados. Contudo, diferentemente do presente trabalho, no qual as células foram estimuladas durante perfusão com TyN, a estimulação dos miócitos ocorreu em meio sem Na^+. Isto provavelmente favoreceu a entrada de Ca^{2+} na célula via NCX operando em seu modo reverso e provocou o acúmulo do íon no citoplasma após os consecutivos estímulos elétricos observado por Shannon *et al.* (2000b). Na ausência de variação da $[Ca^{2+}]_i$ diastólica, uma possibilidade para explicar o fenômeno seria a baixa concentração de Ca^{2+} livre no RS após a aplicação de um pequeno número de estímulos. Isto não poderia ser detectado pela estimativa de $[Ca^{2+}]_{RS}$, pois esta inclui as concentrações de Ca^{2+} livre + ligado, e esta última seria muito maior que a primeira, em virtude da grande capacidade de ligação de Ca^{2+} à CSQ (MacLennan & Wong, 1971). No entanto, é a concentração de Ca^{2+} livre intra-reticular, e não a ligada, que é detectada pelos RyR, e modula sua sensibilidade ao efeito estimulatório do Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a), e da cafeína (Porta *et al.*, 2011). Assim, enquanto a concentração de Ca^{2+} livre dentro do RS estivesse baixa, a liberação seria subnormal, mas, após muitos estímulos, ocorreria saturação parcial da CSQ, esta concentração se elevaria e facilitaria o processo de liberação induzida.

Neste trabalho, buscou-se estudar a regulação da concentração intrarreticular de Ca^{2+} sobre FR sem que houvesse ativação dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ pela $I_{Ca,L}$. Até onde sabemos, trata-se de um estudo inédito, realizado em células vivas e intactas. Foi observado que existe uma relação não-linear entre FR e o conteúdo de Ca^{2+} do RS. Este comportamento da FR foi muito semelhante ao encontrado em trabalhos anteriores (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a). Nestes trabalhos, $I_{Ca\text{-}L}$ foi o gatilho da liberação do íon, enquanto no presente trabalho, as liberações foram evocadas pela aplicação de pulsos de cafeína. Sabe-se que este composto

aumenta a probabilidade de abertura dos RyR, podendo causar não só arritmias, em concentrações baixas (como encontradas no plasma sanguíneo após ingestão de algumas xícaras de café; O'Connell & Zurzola, 1984), como também a liberação massiva de Ca^{2+} do RS, em altas concentrações (O'Neill *et al.*, 1990). Os mecanismos envolvidos na sensibilização dos RyR pela cafeína ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a cafeína aumenta a sensibilidade dos RyR ao Ca^{2+} citosólico (Sitsapesan & Williams, 1990) e, ao atingir uma concentração citoplasmática de 1 mM, reduz o limiar de ativação dos canais pelo Ca^{2+} citosólico para níveis diastólicos (O'Neill *et al.*, 1990). Por outro lado, Kong *et al.* (2008) sugerem que a cafeína modula a função do RyR por meio da redução do limiar de ativação dos canais pelo Ca^{2+} intrarreticular, enquanto Porta *et al.* (2011) sugerem que a ação do composto sobre os RyR depende da concentração de Ca^{2+} livre tanto no citoplasma quanto no interior do RS. Domeier *et al.* (2009) afirmaram que a presença da cafeína reduziu o nível da carga de Ca^{2+} de RS no qual a liberação, espontânea ou ativada por $I_{Ca,L}$, é interrompida. Observaram também que houve um aumento de FR na presença de cafeína (250 µM) e concluíram que este efeito seria causado pela redução, pela cafeína, do nível da carga de Ca^{2+} de RS no qual a liberação é cessada.

No presente trabalho, cujo gatilho para liberação de Ca^{2+} do RS foram pulsos de cafeína em alta concentração (10 mM), o valor de FR variou com a carga de Ca^{2+} do RS de modo muito similar ao observado quando a ativação da liberação se deu pela I_{Ca-L} (Bassani *et al.*, 1995 e Shannon *et al.*, 2000a). Diante desses resultados, a redução do nível da carga do RS que cessa a liberação de Ca^{2+} não deve ser o único mecanismo causador do aumento de FR observado por Domeier *et al.* (2009). Caso este mecanismo fosse o único, se esperaria que, numa dada carga, o valor de FR seria maior em resposta aos pulsos de cafeína do que quando a liberação fosse induzida por I_{Ca-L} , o que não ocorreu.

Rousseau *et al.* (1989) mostraram que o aumento da concentração de Ca^{2+} (de 0,06 para 2,5 µM) e a presença de cafeína (6 mM) no compartimento "citsólico" provocam efeitos muito parecidos sobre a atividade de RyR isolado em bicamada lipídica: um aumento semelhante tanto da freqüência, como da duração dos eventos de abertura do canal. Este resultado, associado com o comportamento muito similar da relação entre FR e conteúdo de Ca^{2+} do RS para pulsos de cafeína (como feito neste trabalho) e para I_{Ca-L} (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a) reforçam a idéia de que a cafeína modula a sensibilidade dos RyR ao Ca^{2+} citosólico, simulando o efeito do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ citosólica.

Apesar de intensivos estudos (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a; Györke *et al.*, 2004; Qín *et al.*, 2008; Qín *et al.*, 2009), os mecanismos envolvidos na regulação exercida pelo

conteúdo de Ca^{2+} do RS sobre a liberação do íon pelos RyR ainda não foram totalmente elucidados. Neste trabalho, juntamente com trabalhos em que $I_{Ca,L}$ foi o gatilho para a liberação de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a), foi visto que há interrupção desta liberação (FR = 0 %) em cargas do RS maiores que zero (50 µM). Zima *et al.* (2008) encontraram que, durante um *spark* de Ca^{2+} (eventos elementares de liberação de Ca^{2+} pelos RyR), há liberação do íon até que a concentração de Ca^{2+} livre no RS atinja cerca de 60 % desta concentração no repouso, em miócitos cardíacos de coelhos. Assim, esses resultados indicam haver um mecanismo intra-luminal que interrompe a liberação de Ca^{2+} pelos canais mesmo quando o RS ainda contém uma carga de Ca^{2+} considerável. Além disso, no presente trabalho foi observado que FR aumenta com o conteúdo de Ca^{2+} do RS, indicando que este mecanismo deva depender da concentração intrarreticular de Ca^{2+}. Qin *et al.* (2008) observaram que RyR isolados possuem sensibilidade ao Ca^{2+} intrarreticular somente quando associados a CSQ. Curiosamente, a modulação positiva dos RyR ocorreu apenas em concentração de Ca^{2+} luminal maiores que 50 µM.

Como visto no presente trabalho, em altas cargas de Ca^{2+} do RS, pequenas variações deste conteúdo são acompanhadas por grandes alterações nos valores de FR. Segundo Györke & Terentyev (2008), a CSQ, associada a outras proteínas (triadina e junctina), inibe os RyR em baixas cargas de Ca^{2+} do RS e esta inibição é reduzida à medida que o estoque de Ca^{2+} do RS aumenta. Além desta modulação pela CSQ, Laver (2007) sugere que a ativação dos RyR pelo Ca^{2+} intrarreticular se dá direta e indiretamente, ou seja, pela interação do Ca^{2+} luminal com sítios não só intrarreticulares, mas também citosólicos dos canais. Assim, em altas cargas do RS, a maior concentração de Ca^{2+} livre na organela provocaria tanto a redução da inibição provocada pela CSQ (associada a triadina e junctina), quanto o aumento do fluxo de Ca^{2+} para o citoplasma, onde haveria a ativação pela face citosólica dos RyR. Dessa maneira, a modulação da função dos RyR pelo Ca^{2+} luminal via CSQ e ativação citosólica poderiam explicar o comportamento não-linear da relação de dependência de FR em relação ao conteúdo de Ca^{2+} do RS, encontrado neste e em outros trabalhos anteriores (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a). No entanto, mais estudos ainda são necessários para que a regulação dos RyR pelo Ca^{2+} intrarreticular possa ser completamente compreendida.

5.2. Modulação da liberação de Ca^{2+} do RS pela tetracaína no MRSFI

No MRSFI, a liberação de Ca^{2+} pelo RS independe da excitação elétrica da célula. Nestas condições, torna-se possível estudar na célula intacta, por exemplo, a ação de fármacos

que atuam diretamente sobre outros canais, além dos RyR, sem a interferência dos efeitos desses agentes sobre correntes iônicas de sarcolema. Neste trabalho, a ação da tetracaína (inibidor de correntes de membrana; Hille, 1977; Carmeliet *et al.*, 1986) sobre a FR foi estudada para estimativa da potência inibitória sobre os RyR em miócitos intactos. Foi observado que o aumento da concentração do fármaco reduziu a liberação fracional de Ca^{2+} do RS. Overend *et al.* (1998), no entanto, observaram que a tetracaína provocou apenas uma redução transitória da amplitude das liberações de Ca^{2+} pelo RS induzidas por $I_{Ca,L}$, seguida de seu restabelecimento ainda na presença do fármaco, em miócitos de ratos submetidos à técnica de *voltage-clamp*. Esta recuperação da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foi atribuída ao aumento da carga de Ca^{2+} do RS durante ação da tetracaína, observado nestes trabalhos. Este aumento, contudo, não foi encontrado no MRSFI. No trabalho anterior, diferentemente do presente trabalho, a aplicação da tetracaína foi feita na presença de Ca^{2+} no meio extracelular e foi observado que a redução instantânea da amplitude dos transientes causada pela tetracaína foi acompanhada pela redução da extrusão de Ca^{2+} via NCX. Assim, na presença de Ca^{2+} extracelular, isto causa um desbalanceamento entre os fluxos de entrada e saída de Ca^{2+} através do sarcolema, favorecendo a entrada de Ca^{2+}, o que gerou, provavelmente, o acúmulo do íon na célula e, consequentemente, o aumento da carga do RS. Isto pode justificar as ausências de alteração da carga de Ca^{2+} do RS e, portanto, do restabelecimento das amplitudes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados pelos pulsos de cafeína na presença da tetracaína no MRSFI, já que os experimentos foram realizados em meio sem Ca^{2+}. Sem alterações da carga de Ca^{2+} do RS, moduladora da FR (como já mostrado), no MRSFI, as alterações observadas na liberação de Ca^{2+} parecem ter sido causadas apenas pela ação do fármaco sobre os RyR durante a aplicação dos pulsos de cafeína.

Pela função sigmóide ajustada aos dados obtidos, a IC_{50} da tetracaína sobre a liberação de Ca^{2+} foi estimada em 52 µM. Segundo Bers (2001), a faixa da concentração efetiva para ação da tetracaína sobre os RyR é de 0,1 a 1 mM, portanto maior do que a IC_{50} obtida no presente trabalho. Esta divergência pode estar relacionada com as diferentes técnicas utilizadas. Sabe-se que a tetracaína inibe principalmente a corrente de Na^+ de membrana (IC_{50} de 0,7-12,5 µM; Bräu *et al.*, 1998; John *et al.*, 2004) e com menor potência a $I_{Ca,L}$ (80 µM; Carmeliet *et al.*, 1986) e, assim, reduz a excitabilidade celular. Dessa maneira, em alguns estudos (Györke *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Laver & Helden, 2011), escolheu-se como preparação RyR isolados e incorporados à bicamadas lipídicas. A tetracaína, assim como outros anestésicos locais da mesma classe, parece interagir com a matriz lipídica da membrana, o que poderia contribuir para seu efeito final sobre a atividade de canais iônicos

(Roth, 1980). Foi observado que o efeito do fármaco pode ser alterado por modificações da composição da membrana na qual o canal está inserido (Shibata *et al.*, 1995). Assim, o uso de bicamadas lipídicas com diferentes composições daquela encontrada na membrana do RS, poderia contribuir para modificar a sensibilidade dos RyR ao fármaco e, portanto, resultar em valores de IC_{50} mais altos (0,2-2 mM; Xu *et al.*, 1998; Laver & Helden, 2011) do que aqueles obtidos no presente trabalho (52 µM).

A técnica de *voltage-clamp* tem sido bastante usada para estudo do efeito da tetracaína sobre RyR. Neste caso, $I_{Ca,L}$ atua como o gatilho da liberação de Ca^{2+} pelo RS. Mas sabe-se que a amplitude desta corrente é reduzida na presença de tetracaína, em concentrações do fármaco inferiores à faixa efetiva para inibição dos RyR (80 µM; Carmeliet *et al.*, 1986). Redução do pico de $I_{Ca,L}$ implica em redução da quantidade e fração do conteúdo de Ca^{2+} liberada pelo RS (Bassani *et al.*, 1995), independentemente da ação da tetracaína sobre os RyR. Além disso, em preparações com o uso desta técnica, a aplicação de tetracaína na presença de Ca^{2+} no meio extracelular provocou o aumento da carga de Ca^{2+} do RS (Györke *et al.*, 1997; Overend *et al.*, 1997; Overend *et al.*, 1998). Sabe-se que este aumento causa, por sua vez, o aumento da liberação fracional de Ca^{2+}, como mostrado neste e em outros trabalhos (Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2000a). Assim, o estudo da ação direta do fármaco sobre a liberação de Ca^{2+} do RS é dificultado pelas alterações da função dos canais decorrentes da ação da tetracaína sobre outros moduladores dos RyR ($I_{Ca,L}$ e $[Ca^{2+}]_{RS}$). Estas interferências podem estar relacionadas com o uso de maiores concentrações da tetracaína neste tipo de preparação (0,1-1,5 mM; Györke *et al.*, 1997; Overend *et al.*, 1998) do que no MRSFI (20-100 µM).

Sabe-se que a tetracaína e a cafeína causam efeitos opostos sobre o RyR (Eisner *et al.*, 1998; Eisner *et al.*, 2000). No entanto, não há informações sobre a localização e identidade dos sítios de interação de cada um desses compostos com o RyR. No MRSFI estes dois fármacos foram usados concomitantemente. Caso a cafeína e a tetracaína ajam sobre o mesmo sítio nos RyRs, ou um destes compostos afete a sensibilidade dos RyRs ao outro fármaco, poderia haver interferência na capacidade da cafeína produzir liberação de Ca^{2+} e/ou modificação da afinidade dos RyR pela tetracaína.

5.3. Implementação de *buffers* de Ca^{2+} no MRSFI *in silico*

O modelamento matemático, com base em evidências experimentais, tem contribuído para o entendimento de mecanismos envolvidos no transporte e regulação do Ca^{2+} intracelular

em miócitos cardíacos (Luo & Rudy, 1994; Shannon *et al.*, 2004; Laver, 2007; Lee & Keener, 2008). No presente trabalho, a simulação do modelo experimental do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado, por meio das alterações do modelo de Tang & Othmer (1994) sugeridas por Soriano *et al.* (2007a), gerou transientes de $[Ca^{2+}]_i$, porém, com características ainda diferentes dos transientes obtidos experimentalmente. A introdução de *buffers* de Ca^{2+} no modelo proposto por Soriano *et al.* (2007a) buscou levar o modelo para uma condição mais próxima da fisiológica, considerando-se a presença de sítios que ligam Ca^{2+} passivamente no interior de um miócito cardíaco (Bassani *et al.*, 1998; Bers, 2001).

É sabido que a presença de calsequestrina na luz do RS, proteína com capacidade de ligar até 35 íons Ca^{2+} por molécula (Mitchell *et al.*, 1988) e assim amortecer as variações intrarreticulares do íon (Kubalova *et al.*, 2004), está diretamente relacionada com a capacidade da organela de armazenar Ca^{2+} (Jones *et al.*, 1998; Györke *et al.*, 2009). No presente trabalho, a introdução da calsequestrina produziu um aumento da carga de Ca^{2+} do RS de 40 para até 100 µM, ou seja, mais próxima da encontrada em miócitos cardíacos *in vitro* (Bassani & Bers, 1995; Trafford *et al.*, 1997; Bers, 2001). Além disso, a introdução do *buffer* intrarreticular implicou em maior liberação de Ca^{2+}, comportamento aparentemente compatível com o aumento da carga do RS.

O acréscimo do *buffer* citosólico, por sua vez, atenuou o aumento da variação da $[Ca^{2+}]_i$ decorrente da maior liberação do íon, de acordo com a ação de ligantes passivos em células (Bers, 2001). Quanto ao curso temporal do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a introdução do *buffer* do RS aumentou o tempo de subida do transiente. Isto se deve ao fato de que, com o acréscimo deste *buffer*, a velocidade da liberação de Ca^{2+} passa a depender da gradual dissociação entre o íon e o *buffer* intrarreticular em resposta à redução da concentração de Ca^{2+} livre na organela à medida que Ca^{2+} é liberado, o que tornaria o processo de liberação mais lento. O tempo de queda deste transiente também foi prolongado e se tornou muito maior do que observado no transiente experimental. Com a introdução do *buffer* citosólico, esta queda foi acelerada, já que parte do Ca^{2+} liberado pelo RS se ligaria aos sítios de *buffer*. Desse modo, o transiente obtido *in silico* tornou-se mais semelhante àquele obtido experimentalmente. Entretanto, no modelo matemático, a adição de uma provável modulação da calsequestrina sobre os RyR poderia tornar os transientes ainda mais realistas.

No MRSFI simulado, foi estudada também a relação entre FR e conteúdo de Ca^{2+} do RS. Variou-se a concentração inicial de Ca^{2+} livre na organela para obtenção de diferentes cargas de Ca^{2+} do RS e, como feito experimentalmente, FR foi calculada em cada uma dessas cargas. No modelo sem as descrições dos *buffers* de Ca^{2+}, a carga máxima obtida foi de 40 µM.

Com o acréscimo dos *buffers*, a carga atingiu valores próximos a 100 µM, acima dos quais o modelo tornou-se instável, apresentando oscilações espontâneas de $[Ca^{2+}]_i$. Foi observado que, em condições de sobrecarga de Ca^{2+} no RS, são geradas liberações espontâneas de Ca^{2+} pela organela (Wier & Blatter, 1991; Williams *et al.*, 1992), as quais podem estar relacionadas com o surgimento das oscilações obtidas no modelo. O aumento da concentração do *buffer* intrarreticular aumentou o limiar da carga no qual essas oscilações ocorrem e possibilitou que cargas de Ca^{2+} do RS um pouco maiores fossem atingidas sem que houvesse a instabilidade do modelo. Este comportamento foi semelhante ao encontrado por Kubalova *et al.* (2004), que viram que a redução da expressão de CSQ em miócitos cardíacos de rato facilitou o surgimento de oscilações da concentração citosólica de Ca^{2+}. No modelo sem os *buffers* de Ca^{2+}, contudo, este comportamento oscilatório não foi observado. Assim, deve-se considerar que as simplificações adotadas neste modelo para descrever a dinâmica do Ca^{2+} intracelular, fenômeno de grande complexidade, requerem cautela na interpretação dessas instabilidades, apesar da semelhança com resultados obtidos *in vitro*.

Na simulação do MRSFI, FR variou de modo não-linear com o conteúdo de Ca^{2+} do RS, como observado experimentalmente. No entanto, no modelo sem *buffers*, além da faixa deste conteúdo estar bem abaixo daquela encontrada experimentalmente, ocorreram instabilidades na regulação da carga de Ca^{2+} do RS sobre sua liberação. Para valores da concentração inicial de Ca^{2+} livre no RS maiores do que a carga máxima obtida (40 µM), os valores de FR foram reduzidos, apesar de haver pouca ou nenhuma alteração do conteúdo do RS. Com o acréscimo das descrições dos *buffers* de Ca^{2+}, esta regulação foi normalizada, ou seja, as condições iniciais do modelo não mais influenciaram como o valor de FR respondeu a uma dada carga de Ca^{2+} do RS. As alterações das concentrações do *buffer* intrarreticular provocaram mudanças na sensibilidade de FR ao conteúdo de Ca^{2+} da organela. Em maiores concentrações do *buffer*, houve redução dos valores de FR. Isso pode ser explicado pela diminuição do Ca^{2+} disponível para liberação (e/ou modulação positiva dos RyR), já que mais Ca^{2+} estaria ligado ao *buffer* na organela, indicando haver um controle da FR pelo Ca^{2+} livre no RS.

Embora FR tenha mostrado saturação em níveis abaixo daquele encontrado *in vitro*, a relação de FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ *in silico* teve comportamento muito semelhante ao observado experimentalmente. Similar ao dado obtido *in vitro*, FR tornou-se muito sensível às variações do Ca^{2+} intrarreticular em altas cargas do RS (entre 80 e 100 µM). Além disso, é interessante notar que no MRSFI simulado a liberação de Ca^{2+} foi interrompida em cargas próximas a 50 µM, como encontrado no modelo experimental.

A semelhança tanto do comportamento dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ quanto da relação FR-$[Ca^{2+}]_{RS}$ obtidos na simulação do MRSFI, em comparação ao dado obtido experimentalmente, é um relativo sucesso quando se considera a simplicidade do modelo matemático utilizado. Há, contudo, diferenças, principalmente, do ponto de vista quantitativo, como os valores dos parâmetros de *buffers* usados, que foram discrepantes dos valores encontrados em células (Bassani *et al.*, 1998; Shannon *et al.*, 2000b). Provavelmente relacionado a essas divergências, neste modelo, o surgimento das instabilidades impediu que FR fosse calculada em altas cargas de Ca^{2+} do RS. Isto dificultou a análise da regulação da liberação de Ca^{2+} pelo RS em cargas próximas ou maiores do que aquelas encontradas em regime permanente (maiores que 100 µM). Talvez estas diferenças possam ser reduzidas pela alteração dos valores dos parâmetros dos fluxos de Ca^{2+} originalmente estabelecidos por Tang & Othmer (1994), divergentes dos valores encontrados na literatura (Bassani *et al.*, 1994; Bers, 2001). Somado a isso, a introdução de uma regulação direta da CSQ sobre a liberação de Ca^{2+} poderia aproximar ainda mais os resultados simulados e experimentais.

6. Conclusões

No presente trabalho, foi realizado o estudo da relação entre a liberação fracional e o conteúdo de Ca^{2+} do RS no modelo do retículo sarcoplasmático funcionalmente isolado, no qual pulsos de cafeína, ao invés de $I_{Ca,L,}$ evocaram liberação de Ca^{2+} pela organela. Os resultados deste estudo indicam que esta relação é determinada, pelo menos parcialmente, por um mecanismo intrínseco do RS, que pode estar relacionado com a modulação da função dos RyR pela calsequestrina e pelo conteúdo de Ca^{2+} livre no interior do RS. Esta regulação foi muito semelhante àquela encontrada em condições em que a liberação é ativada pelo gatilho fisiológico ($I_{Ca,L}$).

Além da regulação pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS, foi investigada neste trabalho a modulação da liberação de Ca^{2+} pelo anestésico local tetracaína, utilizando-se o MRSFI, no qual são eliminados os efeitos do fármaco sobre correntes de membrana. Com base no presente trabalho, conclui-se que este modelo experimental mostrou-se adequado para o estudo do efeito direto de fármacos como a tetracaína sobre a liberação de Ca^{2+} pelo RS.

Para auxiliar o entendimento da dinâmica do Ca^{2+} celular, um modelo teórico simples que simula o MRSFI foi modificado por meio da introdução de descrições de *buffers* de Ca^{2+} intrarreticular e citosólico. Esta modificação foi bem-sucedida no sentido de aproximar, nos aspectos qualitativos e quantitativos, tanto os transientes de $[Ca^{2+}]_i$, quanto a relação entre FR e $[Ca^{2+}]_{RS}$ obtidos pela versão *in silico* do MRSFI aos dados experimentais, apresentando assim uma simulação mais realista dos miócitos cardíacos. Contudo, devido à simplicidade deste modelo matemático, ainda há diferenças entre estes resultados que podem ser minoradas por meio do estudo aprofundado de elementos que participam do transporte e regulação do Ca^{2+} intracelular em paralelo ao uso da experimentação com miócitos cardíacos.

7. Referências

ANTONIU, B.; KIM, D.H.; MORII, M.; IKEMOTO, N. Inhibitors of Ca^{2+} release from the isolated sarcoplasmic reticulum. I. Ca^{2+} channel blockers. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 816, p. 9-17, 1985.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, v. 265, p. c533-c540, 1993.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology*, v. 476, p. 279-293, 1994.

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. *American Journal of Physiology*, v. 268, p. 1313-1319, 1995.

BASSANI, R.A.; ALTAMIRANO, J.; PUGLISI, J.L.; BERS, D.M. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 559, p. 593-609, 2004.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M.; BERS, D.M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, v. 453, p. 591-608, 1992.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M.; BERS, D.M. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *Journal of Physiology*, v. 476, p. 295-308, 1994.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *American Journal of Physiology*, v. 282, p. H2406-H2413, 2002.

BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal* ,v. 68, p. 2015-2022, 1995.

BASSANI, R.A.; SHANNON, T.R.; BERS, D.M. Passive Ca^{2+} binding in ventricular myocardium of neonatal and adult rats. *Cell Calcium*, v. 23, p. 433-442, 1998.

BERLIN, J.R.; BASSANI, J.W.M.; BER, D.M. Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes. *Biophysical Journal*, v. 67, p. 1775-1787, 1994.

BERS, D.M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* 2. ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. 427 p.

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

BRÄU, M.E.; VOGEL, W.; HEMPELMANN, G. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na^+ and K^+ channels in peripheral nerve. *Anesthesia & Analgesia*, v. 87, p. 885-889, 1998.

CARMELIET, E.; MORAD, M.; VAN der HEYDEN, G.; VEREECKE, J. Electrophysiological effects of tetracaine in single guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 376, p. 143-161, 1986.

DOMEIER, T.L.; BLATTER, L.A.; ZIMA, A.V. Alteration of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release termination by ryanodine receptor sensitization and in heart failure. *Journal of Physiology*, v. 587, p. 5197-5209, 2009.

EISNER, D.A.; CHOI, H.S.; DÍAZ, M.E.; O'NEILL, S.C.; TRAFFORD, A.W. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circulation Research*, v. 87, p. 1087-1094, 2000.

EISNER, D.A.; KASHIMURA, T.; VENETUCCI, L.A.; TRAFFORD, A.W. From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias. *Circulation Journal*, v. 73, p. 1561-1567, 2009.

EISNER, D.A.; TRAFFORD, A.W.; DÍAZ, M.E.; OVEREND, C.L.; O'NEILL, S.C. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovascular Research*, v. 38, p. 589-604, 1998.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology*, v. 245, p. C1-C14, 1983.

GINSBURG, K.S.; WEBER, C.R.; BERS, D.M. Control of maximum sarcoplasmic reticulum Ca load in intact ferret ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*, v. 111, p. 491-504, 1998.

GOMES, P.A. *Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de [Ca^{2+}] e limiar de estimulação*. 1997. Tese de Doutorado em Engenharia Elétrica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas.

GYÖRKE, I.; HESTER, N.; JONES, L.R.; GYÖRKE, S. The role of calsequestrin, triadin and juctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophysical Journal*, v. 86, p. 2121-2128, 2004.

GYÖRKE, S.; LUKYANENKO, V.; GYÖRKE, I. Dual effects of tetracaine on spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 500, p. 297-309, 1997.

GYÖRKE, S.; TERENTYEV, D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovascular Research*, v. 77, p. 245-255, 2008.

GYÖRKE, S.; STEVENS, S.C.W.; TERENTYEV, D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *Journal of Physiology*, v. 587, p. 3091-3094, 2009.

HARKINS, A.B.; KUREBAYASHI, N.; BAYLOR, S.M. Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophysical Journal*, v. 65, p. 865-881, 1993.

HILLE, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *Journal of General Physiology*, v. 69, p. 497-515, 1977.

JOHN, V.H.; MAIN, M.J.; POWELL, A.J.; GLADWELL, Z.M.; HICK, Z.; SIDHU, H.S.; CLARE, J.J.; TATE, S.; TREZISE, D.J. Heterologous expression and functional analysis of rat $Na_v1.8$ (SNS) voltage-gated sodium channels in the dorsal root ganglion neuroblastoma cell line ND7-23. *Neuropharmacology*, v. 46, p. 425-438, 2004.

JONES, L.R.; SUZUKI, Y.J.; WANG, W.; KOBAYASHI, Y.M.; RAMESH, V.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; CLEEMAN, L.; MORAD, M. Regulation of Ca^{2+} signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *Journal of Clinical Investigation*, v. 101, p. 1385-1393, 1998.

JORGENSEN, A.O.; SHEN, A.C.-Y.; CAMPBELL, K.P. Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *Journal of Cell Biology*, v. 101, p. 257-268, 1985.

KONG, H.; JONES, P.P.; KOOP, A.; ZHANG, L.; DUFF, H.J.; CHEN, S.R.W. Caffeine induces Ca^{2+} release by reducing the threshold for luminal Ca^{2+} activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, v. 414, p. 441-452, 2008.

KUBALOVA, Z.; GYÖRKE, I; TERENTYEVA, R.; VIATCHENKO-KARPINSKI, S.; TERENTYEV, D.; WILLIAMS, S.C.; GYÖRKE, S. Modulation of cytosolic and intra-sarcoplasmic reticulum calcium waves by calsequestrin in rat cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, v. 561, p. 515-524, 2004.

LAVER, D.R. Ca^{2+} stores regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channels via luminal and cytosolic Ca^{2+} sites. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 3541-3555, 2007.

LAVER, D.R.; VAN HELDEN, D.F. Three independent mechanisms contribute to tetracaine inhibition of cardiac calcium release channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 51, p. 357-369, 2011.

LEE, Y.S.; KEENER, J.P. A calcium-induced calcium release mechanism mediated by calsequestrin. *Journal of Theoretical Biology*, v. 253, p. 668-679, 2008.

LUKYANENKO, V.; GYÖRKE, I.; GYÖRKE, S. Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, v. 432, p. 1047-1054, 1996.

LUO, C.H.; RUDY, Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circulation Research*, v. 74, p. 1071-1096, 1994.

MacLENNAN, D.H.; WONG, P.T.S. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 68, p. 1231-1235, 1971.

MITCHELL, R.D.; SIMMERMAN, H.K.B.; JONES, L.R. Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 1376-1381, 1988.

O'CONNELL, S.E.; ZURZOLA, F.J. Rapid quantitative liquid chromatographic determination of caffeine levels in plasma after oral dosing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, p. 1009-1011, 1984.

O'NEILL, S.C.; EISNER, D.A. A mechanism for the effects of caffeine on Ca^{2+} release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 430, p. 519-536, 1990.

OVEREND, C.L.; EISNER, D.A.; O'NEILL, S.C. The effect of tetracaine on spontaneous Ca^{2+} release and sarcoplasmic reticulum calcium content in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 502, p. 471-479, 1997.

OVEREND, C.L.; O'NEILL, S.C.; EISNER, D.A. The effect of tetracaine on stimulated contractions, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and membrane current in isolated rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 507, p. 759-769, 1998.

PAGE, E.; McCALLISTER, L.P.; POWER, B. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, p. 1465-1466, 1971.

PALADE, P. Drug induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. I. Use of pyrophosphate to study caffeine-induced Ca^{2+} release. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, p. 6135-6141, 1987.

PENNA, L.B.; BASSANI, R.A. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. *Stress* , v. 13, pp. 73-82, 2010.

PIACENTINO III, V.; WEBER, C.R.; CHEN, X.; WEISSER-THOMAS J.; MARGULIES, K.B.; BERS, D.M.; HOUSER, S.R. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circulation Research*, v. 92, p. 651-658, 2003.

POGWIZD, S.M.; QI, M.; YUAN, W.; SAMAREL, A.M.; BERS, D.M. Upregulation of Na^{+}/Ca^{2+} exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circulation Research*, v. 85, p. 1009-1019., 1999.

PORTA, M.; ZIMA, A.V.; NANI, A.; DIAZ-SYLVESTER, P.L.; COPELLO, J.A.; RAMOS-FRANCO, J.; BLATTER, L.A.; FILL, M. Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca^{2+} sparks. *Biophysical Journal*, v. 100, p. 931-938, 2011.

QIN, J.; VALLE, G.; NANI, A.; NORI, A.; RIZZI, N.; PRIORI, S.G.; VOLPE, P.; FILL, M. Luminal Ca^{2+} regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *Journal of General Physiology*, v. 131, p. 325-334, 2008.

QIN, J.; VALLE, G.; NANI, A; CHEN, H.; RAMOS-FRANCO, J.; NORI, A.; VOLPE, P.; FILL, M. Ryanodine receptor luminal Ca^{2+} regulation: swapping calsequestrin and channel isoforms. *Biophysical Journal*, v. 97, p. 1961-1970, 2009.

ROTH, S.H. Mechanisms of anaesthesia: a review. *Canadian Anaesthetists' Society Journal*, v. 27, p. 433-439, 1980.

ROUSSEAU, E.; MEISSNER, G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-release channel: activation by caffeine. *American Journal of Physiology*, v. 256, p. H328-H333, 1989.

SCOTT, B.T.; SIMMERMAN, H.K.B.; COLLINS, J.H.; NADAL-GINARD B.; JONES, L.R. Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 8958-8964, 1988.

SHANNON, T.R.; GINSBURG, K.S.; BERS, D.M. Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophysical Journal*, v. 78, p. 334-343, 2000a.

SHANNON, T.R.; GINSBURG, K.S.; BERS, D.M. Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltage-clamped cardiac ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, v. 78, p. 322-333, 2000b.

SHANNON, T.R.; GINSBURG, K.S.; BERS, D.M. Quantitative assessment of the SR Ca^{2+} leak-load relationship. *Circulation Research*, v. 91, p. 594-600, 2002.

SHANNON, T.R.; WANG, F.; PUGLISI, J.; WEBER, C.; BERS, D.M. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocytes. *Biophysical Journal,* v. 87, p. 3351-3371, 2004.

SHIBATA, A.; IKAWA, K.; TERADA, H. Site of action of the local anesthetic tetracaine in a phosphatidylcoline bilayer with incorporated cardiolipin. *Biophysical Journal*, v. 69, p. 470-477, 1995.

SITSAPESAN, R.; WILLIAMS, A.J. Mechanisms of caffeine activation of single-calcium release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, v. 423, p. 425-439, 1990.

SORIANO, D.C. *Modelo Experimental e instrumentação para estudo da função do retículo sarcoplasmático no transporte de Ca2+ no coração*. 2007. 111 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas.

SORIANO, D.C.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.M. Calcium release and uptake from the cardiac sarcoplasmic reticulum: experimental and mathematical models. *IFMBE Proceedings*, v. 18, p. 992-995, 2007a.

SORIANO, D.C.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.M. Instrumentation for measurement of intracellular Ca^{2+} concentration: effects of beta-adrenergic stimulation on isolated cardiac myocytes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* , v. 23, p. 123-130. 2007b.

TANG, Y.; OTHMER, H.G. A model of calcium dynamics in cardiac myocytes based on the kinetics of ryanodine-sensitive calcium channels. *Biophysical Journal*, v. 67, p. 2223-2235, 1994.

TRAFFORD, A.W.; DÍAZ, M.E.; NEGRETTI, N.; EISNER, D.A. Enhanced Ca^{2+} current and decreased Ca^{2+} efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content after depletion. *Circulation Research*, v. 81, p. 477-484, 1997.

WIER, W.G.; BLATTER, L.A. Ca^{2+}-oscillations and Ca^{2+}-waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium*, v. 12, p. 241-254, 1991.

WILLIAMS, D.A.; DELBRIDGE, L.M.; CODY, S.H.; HARRIS, P.J.; MORGAN, T.O. Spontaneous and propagated calcium release in isolated cardiac myocytes viewed by confocal microscopy. *American Journal of Physiology*, v. 262, p. C731-C742, 1992.

XU, L.; JONES, R.; MEISSNER, G. Effects of local anesthetics on single channel behaviour of skeletal muscle calcium release channel. *Journal of General Physiology*, v. 101, p. 207-233, 1993.

XU, L.; TRIPATHY, A.; PASEK, D.A.; MEISSNER, G. Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 853, p. 130-148, 1998.

ZIMA, A.V.; PICHT, E.; BERS, D.M.; BLATTER, L.A. Termination of cardiac Ca^{2+} sparks. *Circulation Research*, v. 103, p. e105-e115, 2008.

Anexo – Certificados de aprovação para experimentação animal

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1517-1**, sobre **"Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Rosana A. Bassani / Prof. Dr. José W. M. Bassani**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **28 de abril de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1517-1**, entitled **"Isolation of myocardial preparations from adult rats"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 28, 2008**.

Campinas, 28 de abril de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1737-1**, sobre **"Isolamento de preparações miocárdicas de rato adulto"**, sob a responsabilidade de **Rosana A. Bassani / José W. M. Bassani / / Rafael A. Ricardo / Abinoam Marques / Alexandra V. S. Fonseca / Elizângela S. Oliveira / Elaine Belassiano / Marina Monteiro / Everaldo Queiroz / João Guilherme V. Frontão**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **13 de março de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1737-1**, entitled **"Isolation of myocardial preparations from adult rats"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 13, 2009**.

Campinas, 13 de março de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2088-1**, sobre "**Isolamento de preparações miocardiacas de ratos adultos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José W. M. Bassani / Dr. Eduardo T. Costa / Dra. Rosana Bassani / Rafael A. Ricardo / Elaine Belassiano / Marina C. Monteiro / Abinoam Marques / Everaldo Queiroz / Elizângela Souto Oliveira / Ana Laticia F. Moraes / Paula T. Mancilla**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **24 de fevereiro 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2088-1**, entitled "**Isolation of myocardial preparations from adult rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **February 24, 2010**.

Campinas, 24 de fevereiro 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto **"Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos: Análise da função do reticulo sarcoplasmático em miócitos ventriculares isolados de rato"** (protocolo nº **2490-1 (A)**), sob a responsabilidade de **José Wilson Magalhães Bassani / Rosana Almada Bassani / Marina Monteiro**, 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 cientifico 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

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/