

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
TESE DE DOUTORADO

TRANSPORTE DE CÁLCIO
EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATO NA INSTALAÇÃO DA
HIPERTROFIA POR SOBRECARGA DE PRESSÃO ARTERIAL

Autora
Beatriz Maria Romano Carvalho

Campinas - SP - Brasil
Fevereiro de 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
TESE DE DOUTORADO

TRANSPORTE DE CÁLCIO
EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATO NA INSTALAÇÃO DA
HIPERTROFIA POR SOBRECARGA DE PRESSÃO ARTERIAL

Autora: Beatriz Maria Romano Carvalho
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção
do Título de DOUTOR EM ENGENHARIA ELÉTRICA.
Campinas - SP - Brasil
Fevereiro de 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
TESE DE DOUTORADO

TRANSPORTE DE CÁLCIO
EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATO NA INSTALAÇÃO DA
HIPERTROFIA POR SOBRECARGA DE PRESSÃO ARTERIAL

Autora: Beatriz Maria Romano Carvalho
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

Membros da Banca Examinadora:
Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
DEB, FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa
DEB, FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
DCM, FCM, UNICAMP

Prof. Dra. Regina Célia Spadari Bratfisch
IB, Depto de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button
DEB, FEEC, UNICAMP

Campinas - SP - Brasil
Fevereiro de 2004

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

C253T	Carvalho, Beatriz Maria Romano Transporte de cálcio em miócitos ventriculares de rato na instalação da hipertrofia por sobrecarga de pressão arterial / Beatriz Maria Romano Carvalho.--Campinas, SP: [s.n.], 2004. Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. 1. Membranas permeáveis a íons. 2. Troca Iônica. 3. Canais Iônicos. 4. Transporte biológico. 5. Coração – Hipertrofia. 6. Cálcio. 7. Coração Ventrículo esquerdo. 8. Pressão arterial. Coração - Contração. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.
-------	--

Ao Marc, pelo incansável apoio,
e ao meu pai...

**Os caminhos surgem
na medida em que os percorremos.**
Werner Sprenger

Esta tese é o resultado de trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de muitas pessoas. Por isto, muitíssimo obrigada a todos aqueles cujo apoio e amizade fizeram a diferença.

O trabalho foi grande, mas permeado de alegrias, diversão e risadas.
Obrigada aos amigos e colegas.

Aos colegas, Nivaldo, Gentil, Sandro, Rafael, Pedro, Denile, Valéria, Suzy, Gláucia, Gustavo, Ricardo, Diego, Maurício, Hayram, Joaquim, José Eduardo, o meu muito obrigada.

Aos funcionários e amigos do DEB/FEEC – Marlene, Eugênio, Mauro, Sérgio, Sr. Ademir, Nirlei, Val, Mirian, Elizângela, Carol, Tadeu, Éder, Leandro, Wilson, Carol, Ana, e a todos aqueles que por acaso eu tenha esquecido, o meu muito obrigada.

Vou sentir muita falta de todos vocês...

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. *José Wilson Magalhães Bassani*, pela oportunidade de aprendizado e pelo rigor.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. *Rosana Alamada Bassani*, pela sua dedicação e orientação e toda a ajuda com as correções da tese.

Ao Prof. *Kleber Franchini*, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, meu muito obrigada pela oportunidade de contato com Biologia Molecular, pela disponibilização de seu laboratório, recursos, equipamentos, fornecimento de animais e pelo seu apoio; Agradeço a *Thais Holtz Theizen*, pela preparação dos modelos experimentais e medição da pressão arterial; ao *Marcus Corat e Sabata Constâncio* pela ajuda com os experimentos de Biologia Molecular; e a todos os demais colegas e funcionários daquele laboratório – Antônio, Walquer, Carol, Adriana, e todos os demais colegas que fizeram de minha passagem por lá uma alegre oportunidade de aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular: *Nivaldo, Gentil, Sandro, Pedro, Rafael, Letícia, Denile*, por contribuírem para que as horas de trabalho no laboratório fossem mais produtivas e alegres.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Biomédica (DEB): *Gustavo, Gláucia, Suzy, Diego, Hayram, Daniela, Ricardo, Maurício, Ana, José Paulo, Eduardo Jorge, Fortal (Jorge)*, e especialmente à *Valéria* por sua grande ajuda em muitas situações.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Apoio a Pesquisa: *Elizangela Souto de Oliveira, Luciana Alves e Ana Carolina Fantin* e *Gilson Barbosa Maia Jr.*

Aos funcionários do DEB e Centro de Engenharia Biomédica, em especial ao engenheiro Sr. *Sérgio Paulo Moura* pela ajuda com a manutenção do equipamento e aos Srs. *Eugênio Carlos Carraro e Ademir Luiz Xavier*, também pela ajuda técnica com a manutenção do equipamento.

Ao Sr. *Mauro Sérgio Martinazo*, pelo apoio com a confecção de gráficos e material de congressos.

Um agradecimento carinhoso e especial as secretárias *Eloisa Helena da Silva Quitério, Nirlei Vitarelli de Souza e Marlene Caumo dos Santos*, pela competência e principalmente a amizade. Ao atual secretário do DEB/FEEC Sr. *Carlos Eduardo Santos*.

Aos professores do departamento DEB/FEEC Prof^a. *Vera*, Prof. *Eduardo Costa Tavares*, Prof. *Sérgio Santos Mühlen*.

Às funcionárias do CREB, *Valdinéia Sônia Petinari, Mirian Clavico Alves, Sílvia e Iris* pela sua ajuda e amizade.

Aos funcionários do DEB/CEB, *Márcia de Almeida Queiroz*, pela manutenção da parte ótica do equipamento empregado nos experimentos.

Aos funcionários do DEB/CEB, *Wilson José Bizinotto, Éder Trevisolli da Silva, Leandro Donizete Alves e Tadeu Marcos Ferreira Filho* do Laboratório de Informática) e demais funcionários e colegas de trabalho de quem por acaso eu tenha me esquecido.

Ao Prof. Dr. *Achilles Piedra Buena*, pela ajuda com estatística e pelo carinho que dispensava a todos aqueles com quem convivia.

Ao Dr. Allen D. Samarel e Dr. Michael Porter, por informações técnicas sobre experimentos de biologia molecular.

Ao Marc-Andreas Mündler, meu marido, pela sua ajuda imprescindível nos meus estudos, pelo apoio em todos os momentos deste trabalho e pela grande amizade. A ele, o meu *multíssimo obrigada*.

À minha família: à minha mãe, *Maria Odila*; às minhas irmãs *Berenice e Letícia*; aos meus cunhados, *Ivan e Marco Aurélio*; e à parte mais divertida da família: *Giulia, Sophia, Isabella, Débora e Daniel*.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro durante este trabalho.

SUMÁRIO

A hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa inicial a diferentes estresses cardiovasculares (i.e. sobrecarga de pressão) e está associada a remodelamento mecânico, elétrico e algumas vezes a alterações da regulação de Ca^{+2} celular.

A contração de miócitos ventriculares cardíacos é disparada pela mobilização de Ca^{2+} : pelo influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L e liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) a partir do retículo sarcoplasmático (RS), e consequente aumento da concentração deste íon no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). O relaxamento ocorre pela remoção de Ca^{2+} do citosol por quatro mecanismos de transporte de Ca^{2+} – ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (*A-RS*), troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX*), ATPase do sarcolema e uniporter mitocondrial. A contribuição relativa de cada um destes transportadores para o relaxamento depende da espécie, idade e possivelmente de condições patológicas.

Nosso estudo compara o transporte de Ca^{2+} durante o relaxamento e a diástole de miócitos de animais após 2 ou 7 dias de coarctação aórtica ao de animais controle sob os aspectos: a) contribuição relativa dos transportadores de Ca^{+2} para o relaxamento a partir de dados da cinética de relaxamento, para os quais estabeleceu-se uma relação entre a queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e relaxamento; b) perda espontânea de Ca^{2+} do RS durante a diástole; c) resposta contrátil à variação da concentração de Ca^{2+} extracelular; d) expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de Ca^{2+} .

Nossos resultados não indicam alteração da contribuição relativa dos transportadores de Ca^{2+} , mas indicam maior perda de Ca^{2+} do RS durante a diástole. A razão entre a expressão de mRNAs codificadores da *A-RS* e do *fosfolambam* (proteína acoplada à *A-RS* que exerce um controle negativo sobre esta) encontra-se aumentada e é compatível com a possibilidade de maior *turnover* de Ca^{2+} entre citosol e RS em miócitos ventriculares durante a instalação de hipertrofia cardíaca por sobrecarga de pressão arterial.

Palavras-Chaves: transporte de cálcio, miócitos, hipertrofia, perda espontânea de Ca^{2+} pelo RS, mRNA Serca2a, mRNA NCX

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is an adaptative response to cardiovascular (i.e. pressure overload). Cardiac hypertrophy is associated with mechanical-electrical remodeling and, under certain conditions, with changes in cytosolic calcium handling.

The contraction of cardiac ventricular myocytes is due to an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) after Ca^{2+} mobilization, due to Ca^{2+} influx through L type Ca^{2+} channels, which triggers *Ca^{2+} induced calcium release* (CICR) from the sarcoplasmic reticulum (SR). Relaxation is brought about by Ca^{2+} removal from the cytosol through four main Ca^{2+} transporters – SR Ca^{2+} ATPase (*A-RS*), the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (*NCX*), sarcolemmal Ca^{2+} ATPase and the mitochondrial uniporter. The relative contribution of each of these transporters to the relaxation depends on species, age and possibly pathological conditions.

Our study analyzes Ca^{2+} transport during the relaxation and diastole in rat left ventricular myocytes 2 and 7 days after aortic banding, focusing the following aspects: (i) the relative contribution of Ca^{2+} transporters to the relaxation; (ii) the spontaneous loss of Ca^{2+} from the SR during diastole; (iii) the contractile response to variations in the extracellular calcium concentration; and (iv) levels of mRNA encoding for proteins involved in Ca^{2+} transport.

Our results show no change in the relative contribution of Ca^{2+} transporters to the relaxation, but point out faster SR Ca^{2+} loss during diastole. The ratio of *A-RS* to phospholambam (protein which exerts a negative effect on *A-RS*) mRNA abundance was increased. Our findings suggest increased Ca^{2+} turnover between the SR and the cytosol in ventricular myocytes during cardiac hypertrophy installation.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BASES ANATÔMICAS ÚTEIS - CORAÇÃO E CIRCULAÇÃO	3
1.2. O CICLO CARDÍACO –GERAÇÃO E CONDUÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA; O CORAÇÃO COMO BOMBA	6
1.2.1. Potencial de Membrana	7
1.2.2. Potencial de Ação Cardíaco	10
1.3. CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DA FIBRA MUSCULAR	11
1.3.1. Contração e Relaxamento – Mecanismo das pontes cruzadas	11
1.3.2. Contração do miócito sobre o ponto de vista de transporte de Ca^{2+}	16
1.3.3. Relaxamento do miócito sobre o ponto de vista de transporte de Ca^{2+}	16
1.4. A RELAÇÃO PRESSÃO-VOLUMEN VENTRÍCULO ESQUERDO	19
1.4.1. Pré-Carga	20
1.4.2. Pós-carga	22
1.4.3. Efeito da sobrecarga pressórica sobre a alça pressão-volume	24
1.5. HIPERTROFIA – ASPECTOS MOLECULARES	28
1.5.1. Estímulos na sinalização da hipertrofia	28
A. Acoplamento direto	29
B. Acoplamento indireto	30
B1. Sinalizadores de liberação autócrina ou parácrina	30
B2. Sinalizadores de liberação endócrina	30
1.5.2. Respostas Celulares Gerais Envolvidas na Sinalização da Hipertrofia	31
1.5.3. Vias Gerais de Sinalização da hipertrofia - Via das MAPKs	31
1.5.4. Alguns modelos experimentais usados no estudo da hipertrofia ventricular	32
1.5.5. Mecanismos ativados durante a hipertrofia por coarctação aórtica	33
1.5.5. Expressão dos Transportadores de Ca^{+2} na instalação da hipertrofia	34
2. OBJETIVOS	37

4.5. TRANSPORTE DE Ca^{2+} DURANTE A DIÁSTOLE	95
4.5.1. Atividade Espontânea em Resposta a Aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_o$	95
4.5.2. Perda de Ca^{+2} do RS durante a Diástole	98
5. DISCUSSÃO	101
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA	103
5.2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NA HIPERTROFIA	105
a) Serca e PLB	106
b) NCX	110
c) Substituição da Isoforma α -MHC pela isoforma lenta β -MHC	110
5.3. CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DE MIÓCITOS	112
5.4. ATIVIDADE CONTRÁTIL DE MIÓCITOS EM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ DE 0,5 mM, 1 mM E 2mM	114
5.5. PERDA DE Ca^{2+} DO RS DURANTE A PAUSA ESTIMULATÓRIA	115
5.5.1. Fatores que influenciam a atividade dos CLCR	116
a) CSQ, RyR2	116
b) FKBP12.6	117
c) CamKII	118
d) Sorcina	119
5.5.2. Hipertrofia e Susceptibilidade a Arritmias	119
5.6. HIPERTROFIA E REATIVIDADE ADRENÉRGICA	120
6. CONCLUSÃO	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

APÊNDICE I

- MODELO COMPARTIMENTAL DE FLUXOS DE Ca^{2+} DURANTE O RELAXAMENTO	157
I-1. Protocolo experimental	161
I-2. Análise Compartimental: Descrição do modelo básico e suas premissas	162
I-3. Linhas Básicas para o modelamento da queda da $[Ca^{2+}]_i$ durante o relaxamento	166
I-3.1. Participações Relativas dos Transportadores de Ca^{+2} no relaxamento	167
I-4. Relação entre concentração remanescente de Ca^{2+} e contração remanescente	169
I-4.1. Modelamento do relaxamento em função das constantes de transporte de Ca^{2+}	171
I-4.2. Participações Relativas dos Transportadores de Ca^{+2} com dados do encurtamento	173
I-4.3. Determinação de α em função de grupos experimentais (g) e tipos de contração (C)	174
I-4.4. Hipóteses sobre o coeficiente de ‘acoplamento químico-mecânico’ – $\alpha_C(g)$	176
I-4.5. Testes de Significância dos α_C $\alpha(g)$ (SURE & Wald)	178
a) Valores de ‘ α ’ apresentados em função de grupos (g) e tipos de contração (c).	178
b) SURE – Seemingly Unrelated Regression	178
c) Teste de Wald	179
I-5. Conclusões	182
Referências Bibliográficas – Apêndice I	183

APÊNDICE II - ALGUMAS EQUAÇÕES DO MODELO DE COMPARTIMENTOS	185
---	------------

APÊNDICE III – TABELA DE DADOS ISOLADOS	189
--	------------

FIGURAS E TABELAS:**CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO:**

- Fig. 1.1: Anatomia Cardíaca
- Fig. 1.2: Sistemas de Condução do coração
- Fig. 1.3: Fases do Potencial de ação
- Fig. 1.4: ECC – Estrutura do Sarcômero
- Fig. 1.5: ECC – Interação do Ca^{2+} e proteínas contráteis
- Fig. 1.6: ECC – Mecanismos de mobilização e remoção de Ca^{2+}
- Fig. 1.7: Alça PV – Fases da ciclo de contração ventricular
- Fig. 1.8: Alça PV – Função cardíaca e sobrecarga pressórica

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS:

- Tab. s.n.: Diâmetro do clamp em função do peso do animal
- Fig. 3.1: Local de colocação do clamp aórtico e registro de animal coarctado
- Fig. 3.2: Princípio da Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- Fig. 3.3: Proteínas cuja expressão foram avaliadas por RT-PCR
- Tab.3.2: PCR: sequência dos primers, temperatura, número de ciclos, referências *GenBank*
- Fig. 3.4: Gel e plot de gel para leitura do RT-PCR
- Fig. 3.5: Miócito isolado
- Fig. 3.6: *Set-up* empregado na medição de encurtamento de miócitos
- Fig. 3.7: Protocolo experimental empregado no estudo da participação relativa
- Fig. 3.8: Protocolo experimental empregado no estudo do efeito inotrópico do $[\text{Ca}^{2+}]_o$
- Fig. 3.9: Protocolo experimental empregado no estudo da perda de Ca^{2+} pelo RS

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS:

- Tab. 4.1.A,B: Caracterização da hipertrofia: dados hemodinâmicos e análise de variância bifatorial
- Fig. 4.1: Caracterização da hipertrofia: dados hemodinâmicos e dimensões dos miócitos
- Fig. 4.2: Curvas de calibração das amplificações (RT-PCR)

- Tab.4.2: Expressão de proteínas relacionadas à homeostasia de Ca^{2+} (RT-PCR)
- Fig. 4.3: Expressão de proteínas relacionadas à homeostasia de Ca^{2+} (gel e histograma)
- Tab. 4.3.A,B: Caracterização do Tw: ΔL , ttp, $t_{1/2}$
- Fig. 4.4: Caracterização do Tw: registros, ΔL , ttp, $t_{1/2}$
- Tab.4.4.A,B: Caracterização das contraturas de cafeína em NT e Tyrode 00: ΔL , $t_{1/2}$
- Fig. 4.5: Caracterização das contraturas de cafeínas em NT e Tyrode 00: ΔL , $t_{1/2}$ (Histogramas)
- Fig. 4.6: Registro do curso temporal do Tw, CafNT e Caf00
- Tab.4.5.A,B: Participação relativa: corrigida ou não por α
- Fig. 4.7: Participação relativa: corrigida ou não por α (histograma)
- Tab.4.6.A,B: Amplitude do Tw em resposta ao $[\text{Ca}^{2+}]_o$ e análise de variância trifatorial
- Fig. 4.8: Tw em resposta a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (registro e plot xy)
- Tab. 4.7.A,B: Contratura de Cafeína em Tyrode 00 e análise de variância
- Fig. 4.9: Contraturas de Cafeína em Tyrode 00 em resposta ao $[\text{Ca}^{2+}]_o$ – registros e plot XY
- Tab. 4.8.A,B: Frequência de contrações espontâneas durante a pausa e análise de variância trifatorial
- Fig. 4.10: Atividade espontânea dos miócitos durante a pausa – registro e gráfico
- Tab. 4.9.A,B: Perda de Ca^{2+} do RS durante pausa estimulatória e análise de variância bifatorial
- Fig. 4.11: Perda de Ca^{2+} do RS após pausa estimulatória

DOS EXPERIMENTOS DE FISIOLOGIA

(NB: As abreviaturas foram organizadas segundo sua ordem de aparição no texto.)

ATP	Trifosfato de Adenosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
$I_{Ca,L}$	corrente de cálcio via canais do tipo L
CICR	Ca^{2+} -induced cálcio release (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+})
CLCR	canal de liberação de Ca^{2+} do RS (formada por 4 unidades de RyR)
RyR	receptor de rianodina (formador do CLCR)
RS	retículo sarcoplasmático
A -RS	ATPase de Ca^{2+} do Retículo Sarcoplasmático
NCX	troca Na^+/Ca^{2+} ou trocador Na^+/Ca^{2+} (segundo o artigo a/o)
LENTOS	transportadores lentos: ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLB	fosfolambam
CSQ	calsequestrina, proteína intra reticular, buffer de Ca^{2+}
ECC	<i>excitation contraction coupling</i> (acoplamento excitação-contração)
MEC	meio extra-celular
SL	sarcolema (ou membrana celular)
PR	participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento de miócitos
PR_{A-RS}	participação relativa da A -RS no relaxamento de miócitos
PR_{NCX}	participação relativa da NCX no relaxamento de miócitos
PR_{LENTOS}	participação relativa dos transportadores LENTOS no relaxamento de miócitos
Tw	contração evocada por estimulação elétrica
CafNT	contratura evocada por cafeína dissolvida em solução de Tyrode normal
Caf00	contratura evocada por cafeína dissolvida em solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$
ΔL	encurtamento de pico durante uma contração
$t_{1/2}^{c,\Delta L}$	tempo de meia-vida para relaxamento fásico das contrações:
	$(t_{1/2}^{Tw,\Delta L}, t_{1/2}^{CafNT,\Delta L} \text{ ou } t_{1/2}^{Caf00,\Delta L})$
$[Na^+]_i$	concentração intracelular de sódio
$[Na^+]_o$	concentração extracelular de sódio

$[Ca^{2+}]_o$	concentração extracelular de cálcio
$[Ca^{2+}]_i$	concentração intracelular de cálcio
Ca^{2+}	íon Ca^{2+}
APD ₉₀	duração do potencial de ação desde seu início até 75% de sua repolarização

DOS EXPERIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcrição Reversa)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> (PCR precedida de RT)
Serca2a	Isoforma cardíaca da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
PLB	isoforma codificadora do fosfolambam
RyR2	isoforma cardíaca do receptor de rianodina (proteína formadora CLCR)
CSQ	isoforma codificadora da calsequestrina, proteína intra reticular, buffer de Ca^{2+}
NCX	isoforma codificadora do trocador Na^+/Ca^{2+}
A (dATP)	2'-desoxinucleotídeo de Adenina-5'-trifosfato
C (dCTP)	2'-desoxinucleotídeo de Citosina-5'-trifosfato
G (dGTP)	2'-desoxinucleotídeo de Guanina-5'-trifosfato
T (dTTP)	2'-desoxinucleotídeo de Timina-5'-trifosfato
dNTP's	2'-desoxinucleosídeos-5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar obtido por transcrição reversa
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro

UNIDADES

u	unidades
pb	pares de bases
g	grama
μ g	micrograma (10^{-6} gramas)
ng	nanograma (10^{-9} gramas)
ml	mililitro (10^{-3} litros)
μ l	microlitro (10^{-6} litros)
M	concentração molar

mM	mili molar (10^{-3} molar)
μ M	micro molar (10^{-6} molar)
pmol	picomoles (10^{-12} moles)
min	minutos
Da	dalton (unidade de massa de atômica equivalente 1 g/mol, usada p/ proteínas)
kDa	kilodalton (10^3 dalton)

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

1.1. BASES ANATÔMICAS - CORAÇÃO E CIRCULAÇÃO

O **coração** é um órgão muscular oco, de forma aproximadamente cônica, situado obliquamente no mediastino entre os pulmões, abaixo do osso esterno. No plano mediano, ele é dividido pelos septos que definem duas metades - direita e esquerda, correspondentes a dois sistemas de bombeamento independentes. Cada metade por sua vez, é subdividida no plano transversal em cavidades superiores (átrios) e inferiores (ventrículos). O coração consiste, portanto, de quatro câmaras – **átrio direito, ventrículo direito, átrio esquerdo e ventrículo esquerdo**. Estas câmaras são contráteis e têm a habilidade de bombear o sangue (vide figura 1.1).

O **ÁTRIO DIREITO (AD)** é comunica-se com o **ventrículo direito** pela valva tricúspide. No átrio direito aportam as duas veias cavas, superior e inferior. A *veia cava superior* é formada pela união dos troncos venosos braquiocefálicos direito e esquerdo (ou veias braquiocefálicas direita e esquerda), recebendo, portanto, o sangue venoso procedente dos membros superiores e da cabeça. Para ela também drena o sangue proveniente da *veia âzigo maior* e de outras veias tributárias de menor importância. Segundo Gardner *et al.*(1988), a *veia cava inferior* tem um curto percurso dentro do tórax após atravessar o músculo diafragma e antes de penetrar no átrio direito. Ela drena o sangue pobre em oxigênio proveniente dos membros inferiores e cavidade abdominal. Do átrio direito, o sangue flui através da valva tricúspide para o ventrículo direito. O enchimento desta câmara ocorre em parte durante a diástole. Ao fim da diástole inicia-se a sístole atrial que causa um aumento de pressão no ventrículo direito e o fechamento da valva tricúspide impedindo o retorno do sangue para o átrio.

O **VENTRÍCULO DIREITO (VD)** é uma cavidade de forma aproximadamente triangular, que se estende desde o átrio direito até o ápice do coração. Sua parede posterior é formada pelo septo ventricular. A parede do VD é mais delgada do que a do ventrículo esquerdo, pois o VD bombeia sangue para a circulação pulmonar, que requer menor pressão; enquanto que o ventrículo esquerdo bombeia o sangue oxigenado para a circulação sistêmica (todo o corpo), que requer grande pressão de

bombeamento. A relação entre as espessuras das paredes dos ventrículos direito e esquerdo é 1:3, sendo mais espessa no ápice, adelgaçando-se em direção à base. O volume do VD é semelhante ao do ventrículo esquerdo. No coração humano adulto, este volume é de aproximadamente 85 ml.

O sangue proveniente do átrio direito é bombeado pelo ventrículo direito para a circulação pulmonar através do **tronco das artérias pulmonares**. O tronco das artérias pulmonares, bifurcado em duas artérias pulmonares direitas e uma esquerda, localiza-se à esquerda da aorta ascendente e aproxima-se da curva inferior do arco aórtico (Gardner *et al.*, 1988). Após um dado percurso, este tronco bifurca-se nas proximidades do arco da aorta em artéria pulmonar direita e artéria pulmonar esquerda, conforme observa-se na figura 1.1). A artéria pulmonar direita, mais comprida e calibrosa do que a esquerda, passa sob o arco aórtico e dirige-se ao pulmão direito. A artéria pulmonar esquerda parte do tronco pulmonar e dirige-se ao pulmão esquerdo.

O **ÁTRIO ESQUERDO (AE)** comunica-se com o **ventrículo esquerdo** pela valva mitral (também chamada bicúspide). A ele chegam as quatro veias pulmonares provenientes do pulmão trazendo sangue oxigenado a ser distribuído para todo o organismo. As duas veias pulmonares esquerdas chegam ao canto superior esquerdo da base do coração após coletarem o sangue arterial no pulmão esquerdo (Gardner *et al.*, 1988).

O **VENTRÍCULO ESQUERDO (VE)** contrai-se bombeando sangue oxigenado para todo o corpo através da valva aórtica. A via inicial de condução do sangue arterial é a artéria aorta, principal artéria sistêmica da grande circulação. O principal suprimento sistêmico para o tórax e todo o organismo deriva-se dos ramos da aorta. De acordo com seu percurso, a artéria aorta é denominada aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente torácica e aorta descendente abdominal (Gray, 1998).

A **aorta ascendente**: parte do ventrículo esquerdo estende-se para cima e ligeiramente para a direita até a altura do ângulo esternal, logo à direita do plano mediano. É um pouco dilatada em sua raiz pela presença dos chamados "seios aórticos" (cada seio corresponde a uma cúspide da valva aórtica e tem a mesma denominação). Os ramos da aorta ascendente são as artérias coronárias direita e esquerda.

O **ARCO AÓRTICO** (também denominado "Crossa ou Cajado da Aorta") é formado por uma curvatura da aorta, após o trecho ascendente mencionado. A aorta curva-se para a esquerda,

ventralmente à traquéia, voltando-se a seguir para baixo, por baixo do brônquio esquerdo à esquerda da traquéia e do esôfago. Nas proximidades do arco da aorta encontram-se os nervos frênico e vago, veia intercostal superior esquerda, ramos do nervo vago, e do tronco simpático. A face superior emite três ramos: tronco arterial braquiocefálico esquerdo, artéria carótida comum esquerda e artéria subclávia esquerda.

Do tronco arterial braquiocefálico – primeiro ramo do arco aórtico – saem dois importantes vasos: a Artéria subclávia direita e **Artéria carótida comum direita** responsáveis, respectivamente, pela irrigação do membro superior direito e metade da cabeça e pescoço. O tronco braquiocefálico estende-se da parte posterior da porção inferior do manúbrio do esterno até o nível da articulação esterno-clavicular direita. Atrás dessa juntura se dá a divisão em artérias subclávia direita e carótida comum direita.

As artérias subclávia esquerda, carótida comum esquerda e ramo direito do arco aórtico são responsáveis pela irrigação do membro superior esquerdo e da outra metade da cabeça. A artéria carótida comum esquerda se origina ligeiramente à esquerda do tronco arterial braquiocefálico. A artéria subclávia origina-se à esquerda da artéria carótida comum esquerda e ascende ao longo da traquéia, deixando o tórax por detrás da articulação esterno clavicular esquerda.

A **aorta descendente** é a principal fonte de irrigação da região abdominal e membros inferiores e divide-se em dois trechos segundo sua localização: **aorta torácica**, localizada entre o arco aórtico e o nível da 12ª vértebra torácica, onde atravessa o hiato aórtico do músculo diafragma; e **aorta abdominal**, que se estende a partir do hiato aórtico do diafragma (nível de T12), de onde emergem os troncos que irrigam as vísceras abdominais, até à bifurcação que dá origem às artérias ilíacas comuns direita e esquerda, aproximadamente ao nível da quarta vértebra lombar (L4) (Gardner *et al.*, 1988; <http://www.medstudents.com.br/basic/anatomia/vasos/topico1.htm>).

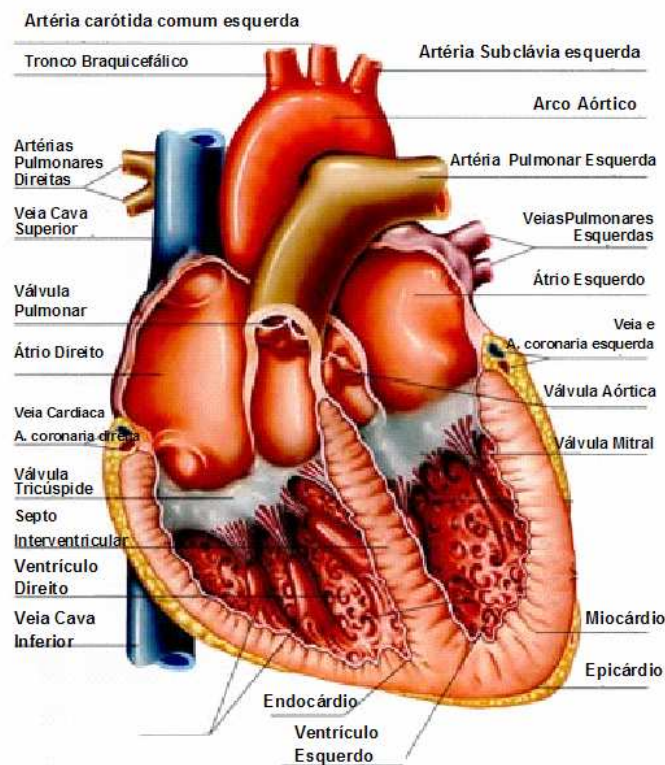


Figura 1.1: Corte frontal do coração e vasos, evidenciando quatro câmaras cardíacas – átrios direito e esquerdo, ventrículo direito e esquerdo, veias cava superior e inferior, artérias pulmonares, veias pulmonares, artéria aorta. A figura mostra ainda as válvulas tricúspide (lado direito) e mitral (lado esquerdo). Note a espessura da parede cardíaca nos ventrículos esquerdo e direito (Camargo AC. - <http://www.hcanc.org.br/outrasinfs/ensaios/colest2.html>; acessado em 08 de novembro de 2003).

1.2. O CICLO CARDÍACO –

GERAÇÃO E CONDUÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA; O CORAÇÃO COMO BOMBA

O coração bombeia o sangue para os pulmões (circulação pulmonar) e para todo o organismo (circulação sistêmica) devido a uma sequência coordenada de contrações das quatro câmaras – átrios direito e esquerdo e ventrículos direito e esquerdo.

A contração destas câmaras e a coordenação destas contrações para que as câmaras esquerdas e direitas funcionem como 2 bombas em paralelo devem-se a características especiais do músculo cardíaco: contratilidade, excitabilidade e condutibilidade.

A **contratilidade** miocárdica é a propriedade de o tecido cardíaco contrair-se possibilitando a realização de um trabalho, a saber, bombear o volume de sangue contido no interior das câmaras cardíacas (Katz, 1992). A **excitabilidade** é a propriedade de o tecido cardíaco dispensar inervação específica para geração de estímulo elétrico para ativação da contração. O tecido cardíaco gera esses estímulos de maneira rítmica e espontânea no *nódulo sino-atrial* (NSA, considerado o marcapasso natural do coração). Estes estímulos propagam-se pelo átrio por três vias internodais até atingir o nódulo atrio-ventricular (NAV). A partir do átrio, eles são conduzidos pelo feixe de His e suas ramificações, fibras de Purkinje, até os ventrículos direito e esquerdo. A esta propriedade denomina-se **condutibilidade** (Figura 1. 2; Opie, 1998; Guyton, 1988).

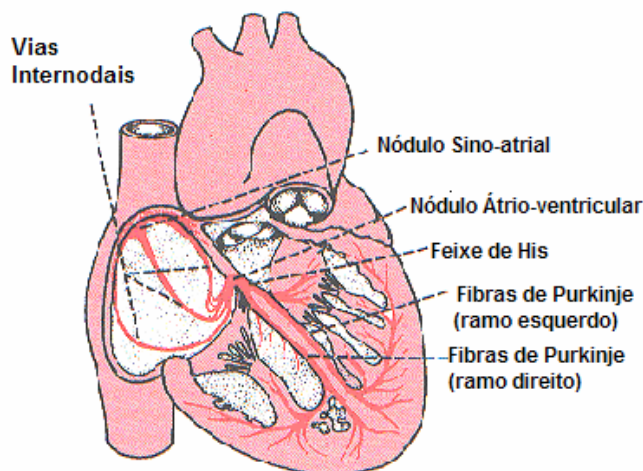


Figura 1.2: Sistemas de geração e condução da excitabilidade no tecido cardíaco. Os estímulos são gerados no nódulo sino-atrial, conduzidos ao nódulo átrio ventricular pelas vias internodais, e posteriormente conduzidos aos ventrículos direito e esquerdo pelo feixe de His e seus ramos, fibras de Purkinje (*Adaptado de Guyton, 1988*).

1.2.1. Potencial de Membrana

A membrana das células miocárdicas é constituída por uma dupla camada de fosfolípidos e proteínas, que podem ser proteínas integrais (inseridas na bicamada fosfolipídica) ou proteínas periféricas (associadas à superfície da bicamada), que podem atuar como receptores para neurotransmissores e como canais para fluxos iônicos. A membrana plasmática apresenta portanto

permeabilidade seletiva a íons, e os meios delimitados por ela diferem entre si na sua composição. O gradiente de concentração iônica transmembrana e a permeabilidade da membrana a um dado íon determina o fluxo do mesmo através da membrana. Estes fluxos representam transferência de carga elétrica, e têm um importante papel no estabelecimento de uma diferença de potencial elétrico entre as faces intra e extracelular da membrana. Por exemplo, existe um considerável gradiente de concentração transmembrana dos íons K^+ e Na^+ ($[K^+]_i = 145 \text{ mM}$ e $[K^+]_o = 5,4 \text{ mM}$; $[Na^+]_i = 10 \text{ mM}$ e $[Na^+]_o = 140 \text{ mM}$). Em decorrência deste gradiente de concentração, estabelece-se a tendência de o K^+ se difundir para o meio-extracelular e de o Na^+ para o citosol (Aidley, 1998).

A membrana de uma célula em repouso tem alta permeabilidade ao K^+ . A difusão de K^+ para o citosol a favor de seu gradiente de concentração (gradiente químico) resulta em separação de cargas através da membrana e dá origem a um gradiente elétrico, ao qual associa-se uma força eletrostática, oriunda da atração que as cargas negativas do lado interno da membrana exercem sobre as cargas positivas (sobre o K^+), restringindo sua saída. A saída de K^+ ocorre até que a força difusional que o impele para fora da célula se iguale à força elétrica que o atrai para dentro. Podemos dizer que, neste caso, a difusão é um processo auto-limitante, pois gera um potencial elétrico que a limita. O potencial no qual o fluxo de um determinado íon através da membrana é nulo (quando força difusional se iguala em módulo à força eletrostática de sentido oposto) depende principalmente da diferença de concentração transmembrana e da carga do íon, e é conhecido como **potencial de equilíbrio eletro-químico** ou **potencial de Nernst** deste íon. Este potencial pode ser estimado pela equação de Nernst. No caso do K^+ , o potencial de equilíbrio (E_K) é dado por $E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$, onde R é a constante dos gases; T é a temperatura em graus Kelvin; ' z ' é a valência do íon em questão; F é a constante de Faraday; e $[K^+]_o$ e $[K^+]_i$ são as concentrações de K^+ fora e dentro da célula, respectivamente (Varanda *et al.*, 2004). Os potenciais de equilíbrio do K^+ e Na^+ calculados a partir da equação de Nernst e de acordo com os gradientes de concentração apresentados acima são: $E_K = -87,94 \text{ mV}$ e $E_{Na} = +70,54 \text{ mV}$.

Da difusão de íons e separação de cargas através da membrana resulta portanto um potencial de membrana, com acúmulo de cargas negativas na superfície interna da membrana e positivas, na superfície externa. Embora estas cargas acumuladas junto à superfície da membrana representem

somente uma fração muito pequena do total de íons dentro e fora da célula, elas são suficiente gerar um potencial de membrana constante durante o repouso (potencial de membrana de repouso, E_m).

O potencial de membrana é função dos potenciais de equilíbrio (potencial de Nernst) dos íons aos quais a membrana é mais permeável, lembrando que a permeabilidade para um dado íon é proporcional ao número de canais abertos ao mesmo. Devido à grande permeabilidade da membrana ao K^+ , o potencial de membrana se aproxima muito ao potencial de equilíbrio deste íon (Goldman, 1943; Varanda *et al.*, 2004; Aidley, 1998).

Embora a permeabilidade ao Na^+ seja muito baixa, ela não é nula, e ocorre uma pequena entrada deste íon na célula, segundo seu gradiente eletro-químico. Esse pequeno influxo de Na^+ diminui a densidade de cargas negativas no lado interno da membrana, afastando o E_m de valores do E_K . Quanto mais o E_m diverge do E_K , maior a força eletroquímica que impele o K^+ para fora da célula e conseqüentemente maior o efluxo de K^+ . No equilíbrio, o efluxo de K^+ é contrabalançado pelo influxo de Na^+ . Deste modo, o E_m em repouso é também influenciado E_{Na} , mas em menor grau, dada a baixa permeabilidade da membrana ao Na^+ . Normalmente a relação entre as permeabilidades ($P_{Na/PK}$) é muito baixa em repouso, ou seja, a membrana é muito mais permeável ao íon K^+ e dessa maneira o potencial de membrana estará mais próximo do potencial de equilíbrio do K^+ ($-87,94$ mV). Já durante o potencial de ação, quando inicialmente há grande aumento da permeabilidade ao Na^+ , e isto causa marcante influxo deste íon e alteração do E_m em direção a E_{Na} ($+70,54$ mV) (Varanda *et al.*, 2004).

Durante o repouso e atividade, o fluxo passivo de K^+ para o meio extracelular e o influxo de Na^+ para o citosol são constantes e tendem a dissipar o gradiente de concentração destes íons através da membrana. A dissipação deste gradiente químico não ocorre graças à atividade da ATPase de Na^+/K^+ (bomba de Na^+), que transloca 3 íons Na^+ para para o meio extracelular e 2 íons K^+ do meio extracelular para o citosol, mantendo baixa a concentração intracelular de Na^+ e alta a concentração intracelular de K^+ . Como a ATPase de Na^+/K^+ move íons contra seus gradientes químicos, ela requer energia, obtida pela hidrólise do ATP. A resultante do funcionamento desta bomba é um efluxo de cargas positivas que tende a hiperpolarizar levemente a membrana (Aidley, 1998).

1.2.2. Potencial de Ação Cardíaco

Quando um impulso despolarizante chega à fibra cardíaca, ocorre um grande aumento da condutância da membrana ao Na^+ , forte influxo destes íons e uma despolarização rápida seguida de repolarização; a esta variação de potencial denomina-se potencial de ação, que apresenta 4 fases (Bers, 2001) (Figura 1.3):

Fase 0 – Despolarização rápida, Abertura dos canais rápidos de Na^+ : nesta fase ocorre ativação dos canais rápidos de Na^+ . A entrada de Na^+ na célula causa rápida despolarização da membrana e reversão do E_m , que atinge um pico de aproximadamente 50 mV (positivo na face intracelular da membrana, com relação à extracelular).

O NSA funciona como marcapasso natural e o átrio direito comanda a contração do músculo ventricular. Isto se deve a dois fatores: menor duração do potencial de ação nos átrios do que nos ventrículos (0,15 vs 0,3 s) e despolarização espontânea das células atriais (Opie, 1988). A despolarização das células do marca-passo (NSA) ocorre de forma diferente do que no ventrículo. Como a membrana destas células apresenta maior permeabilidade ao Na^+ , seu potencial de membrana é maior do que das células ventriculares (-55 mV vs -90 mV) e tende a elevar-se espontaneamente. Neste potencial de membrana (-55 mV), há acomodação e inativação dos canais rápidos de Na^+ , que se encontram fechados; e a despolarização passa a depender somente da abertura dos canais lentos de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$. Por esta razão, a despolarização das células do marca-passo apresenta duas fases, uma despolarização lenta e uma rápida.

Fase 1 – Repolarização inicial: esta fase depende não somente da inativação dos canais de Na^+ , mas principalmente da abertura de canais de K^+ de rápida ativação e inativação e da corrente transiente de saída de K^+ (I_{to}) através destes canais.

Fase 2 - Platô: Os canais lentos de Ca^{2+} , que começaram a se abrir lentamente em -60. Quando o potencial de membrana atinge -50 mV, eles se encontram completamente abertos. O potencial de membrana (E_m) permanece próximo a 0 mV, havendo um balanço entre correntes de entrada (principalmente corrente de Ca^{2+} , via canais do tipo L, $I_{Ca,L}$) e de saída (correntes lentas de K^+ , I_K). O influxo de Ca^{2+} que ocorre nesta fase é responsável pela ativação do processo de contração na fibra

cardíaca. No entanto, como as células ventriculares desenvolvem maior força de contração do que as atriais, elas apresentam um platô mais longo, favorecendo influxo prolongado de Ca^{2+} (Bers, 2001).

Fase 3 – Repolarização tardia: Os canais lentos de Ca^{2+} se fecham e a saída de K^+ – correntes retificadora de fundo (I_{K1}), de ativação lenta (I_{Ks}) e de ativação rápida (I_{Kr}) – leva o potencial de membrana de volta ao valor normal de repouso (de -90 a -80 mV). A repolarização tardia é finalizada com o fechamento dos canais de K^+ voltagem dependentes (I_{Ks} I_{Kr}) quando a a membrana atinge um potencial similar ao seu potencial de repouso. (Bers, 2001).

Fase 4 – Potencial Diastólico (repouso): A alta condutância diastólica da membrana ao K^+ , por canais que conduzem a corrente retificadora de entrada de K^+ (I_{K1}) mantem Em próximo de E_K .

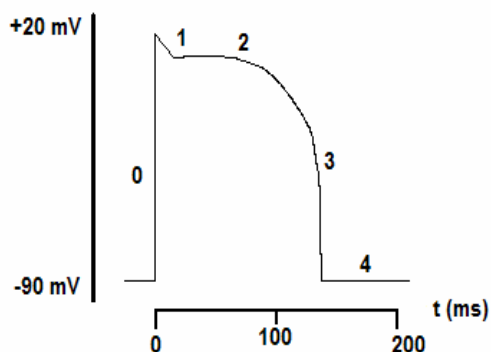


Figura 1.3: Principais fases do potencial de ação ventricular: fase zero: despolarização rápida da membrana; fase 1: repolarização inicial; fase 2: platô; fase 3: repolarização tardia; fase 4: potencial diastólico (de repouso) (Figura adaptada de Bers, 2001).

1.3. CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DA CÉLULA MUSCULAR CARDÍACA

1.3.1. Contração e Relaxamento dos Miócitos – Mecanismo das Pontes Cruzadas

O **músculo cardíaco** é formado por **feixe de miócitos**, cada miócito com aproximadamente 20 μm de diâmetro. Os miócitos cardíacos exibem um padrão estriado que se deve a uma disposição altamente organizada de **miofibrilas** (ou **feixes de filamentos contráteis**) e dos **miofilamentos** dentro das miofibrilas. Os **miofilamentos**, do tipo fino ou grosso, organizam-se nas miofibrilas em unidades contráteis, os **sarcômeros**.

Um **sarcômero** é delimitado por 2 discos Z (ou se considerarmos um modelo plano de miócitos, podemos dizer linha Z) onde se encontram proteínas que promovem a fixação dos miofilamentos a estes discos. Ele compreende $\frac{1}{2}$ banda I (isotrópica) formada de miofilamentos finos; uma banda A (anisotrópica), formada de miofilamentos finos e grossos; e novamente $\frac{1}{2}$ banda I. Dentro dos limites da banda A, encontra-se a zona H, composta somente de miofilamentos de grossos (Figura 1.4.A) (Canale *et al.*, 1986).

Na região dos discos Z, encontramos Túbulos T, RS juncional. A proximidade entre túbulos T e RS juncional favorece que o Ca^{2+} que flui para o citosol durante o potencial de ação (via I_{Ca}) ative o mecanismo de CICR (Bers, 2001). Do encurtamento de muitos sarcômeros associados em série resulta o encurtamento da célula cardíaca (Figura 1.4.B). E o Ca^{2+} serve como mediador na transdução eletro-mecânica (acoplamento excitação contração) que resulta na contração do miócito (Guyton, 1988).

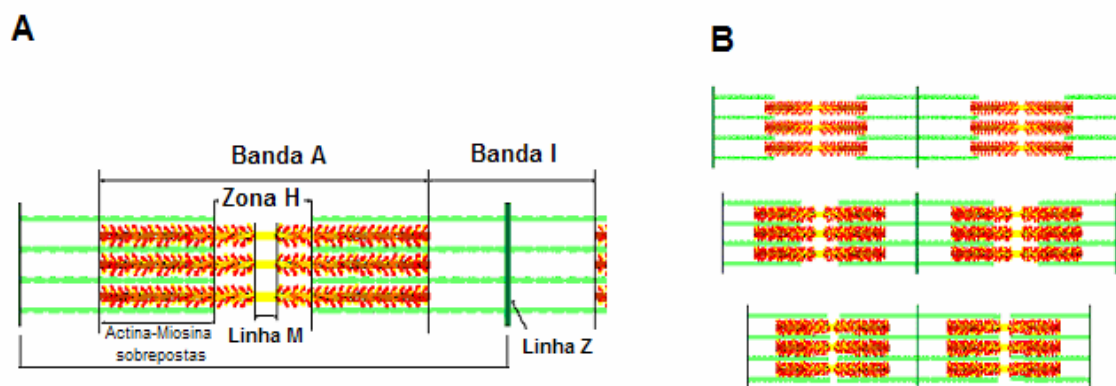


Figura 1.4: Estrutura do sarcômero. A) Estando a célula relaxada, miofilamentos finos (em verde) e grossos (em vermelho) sobrepõem-se apenas parcialmente. B) Ao início da contração, a sobreposição dos miofilamentos finos e grossos é pequena. Porém, na presença de Ca^{2+} , os miofilamentos finos têm seus sítios de ligação para os miofilamentos grossos expostos e ocorre a interação entre estes miofilamentos. Estes deslizam entre si reduzindo o comprimento do sarcômero de aproximadamente 2,4 μm no repouso para valores inferiores a 2 μm durante a contração. (figura adaptada de Langton P. University of Bristol, Great Britain, <http://www.bris.ac.uk/Depts/Physiology/ugteach/uginde/index/>; acessado em 25 de novembro de 2003).

Os **miofilamentos grossos** originam-se da agregação longitudinal e paralela de moléculas proteicas de miosina. Os **miofilamentos** de miosina são limitados pela linha Z e têm aproximadamente 100 nm de diâmetro e 1,5 a 1,6 μm de comprimento.

As moléculas de **miosina** (500 kDa) apresentam duas *cabeças* globulares articuladas com uma cauda (Figura 1.6). A cauda assemelha-se a uma haste de aproximadamente 1300 nm de comprimento situa-se ao longo do filamento. A cabeça bilobulada globular, forma saliências que possibilitam a interação entre a cabeça globular dos filamentos grossos de miosina e os filamentos finos de actina, interação denominada *ponte cruzada* (Guyton, 1988; Braunwald, 2001).

Os **miofilamentos finos** são compostos por monômeros de **actina** e pelo **complexo de troponina-tropomiosina**. Os monômeros de actina são globulares e organizam-se em forma de corrente (filamento de actina). O filamento de actina apresenta sítios de ligação para as cabeças das moléculas de miosina. Estes sítios encontram-se recobertos pelo complexo troponina-tropomiosina, que controla a interação entre miofilamentos de actina e miosina.

O **complexo troponina-tropomiosina** é formado por moléculas de **tropomiosina**, dispostas de forma helicoidal sobre o filamento de actina abrangendo 7 monômeros deste filamento, e por moléculas de troponina (Tn). As moléculas de **troponina**, por sua vez, apresentam 3 subunidades classificadas de acordo com sua afinidade por diferentes ligantes: TnT, com afinidade pela Tropomiosina; TnC, com afinidade pelo Ca^{2+} ; e TnI, subunidade inibitória da Troponina com afinidade pela actina. A **TnT** tem forma alongada e dispõe-se sobre a tropomiosina em uma extensão que compreende 3 monômeros de actina. Este arranjo permite a TnT controlar a posição da tropomiosina com relação ao filamento de actina (Bers, 2001). **TnI**, que interage com a actina ou com TnC, quando Ca^{2+} encontra-se ligado ao TnC. **TnC** interage com o Ca^{2+} .

Durante o repouso, enquanto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for baixa (aproximadamente 100 nM), os sítios da TnC encontram-se livres e a interação entre os sítios de ligação da TnI e TnC é fraca, de modo que TnI interage sobretudo com actina. Esta interação favorece uma configuração do complexo de troponina-tropomiosina tal, que este complexo é deslocado para fora do miofilamento de actina, cobrindo os sítios de ligação da miosina neste miofilamento, o que impede a interação actina-miosina (Bers, 2001).

Com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o Ca^{2+} interage com um sítio específico da TnC, aumenta a interação entre TnC e TnI e desestabiliza a interação entre TnI e actina. Isto favorece uma mudança de configuração do complexo troponina-tropomiosina, descobre os sítios de ligação da miosina no

miofilamento de actina e favorece a interação actina-miosina e a formação de ‘*pontes-cruzadas*’ (Katz, 1992). Com a formação das *pontes-cruzadas*, a cabeça da miosina sofre **flexão** (redução do ângulo entre cabeça e cauda da miosina) e provoca um deslizamento do filamento de actina sobre o de miosina (10 nm), aproximando as linhas Z do centro do sarcômero (aproximando as linhas Z da linha M) e encurtamento-o (*power stroke*) (Katz, 1992).

Quando ligada à actina, a miosina apresenta maior afinidade pelo ATP. A ligação da miosina ao ATP reduz a afinidade desta molécula pela actina, e o complexo actina-miosina desfaz-se. Ainda ligada ao ATP, a cabeça da miosina sofre **extensão** até alcançar um novo sítio de ligação com a actina (aumento do ângulo entre cabeça e cauda da miosina) (Bers, 2001; Katz 2001). Como a cabeça da miosina apresenta atividade ATPásica ativada por Mg^{2+} , o ATP é hidrolisado em ADP e Pi (Scheuer e Bhan, 1979; Westra *et al.*, 2001). A hidrólise do ATP resulta novamente em aumento da afinidade da miosina pela actina. Se $[Ca^{2+}]_i$ permanece elevada, ocorre nova interação de Ca^{2+} com TnC e o processo se repete. A repetição cíclica de *pontes-cruzadas* (*ciclo das pontes-cruzadas*) resulta em deslizamento de um miofilamento sobre o outro e encurtamento dos sarcômeros (*Teoria dos filamentos deslizantes* (Guyton, 1988; Katz, 1992).

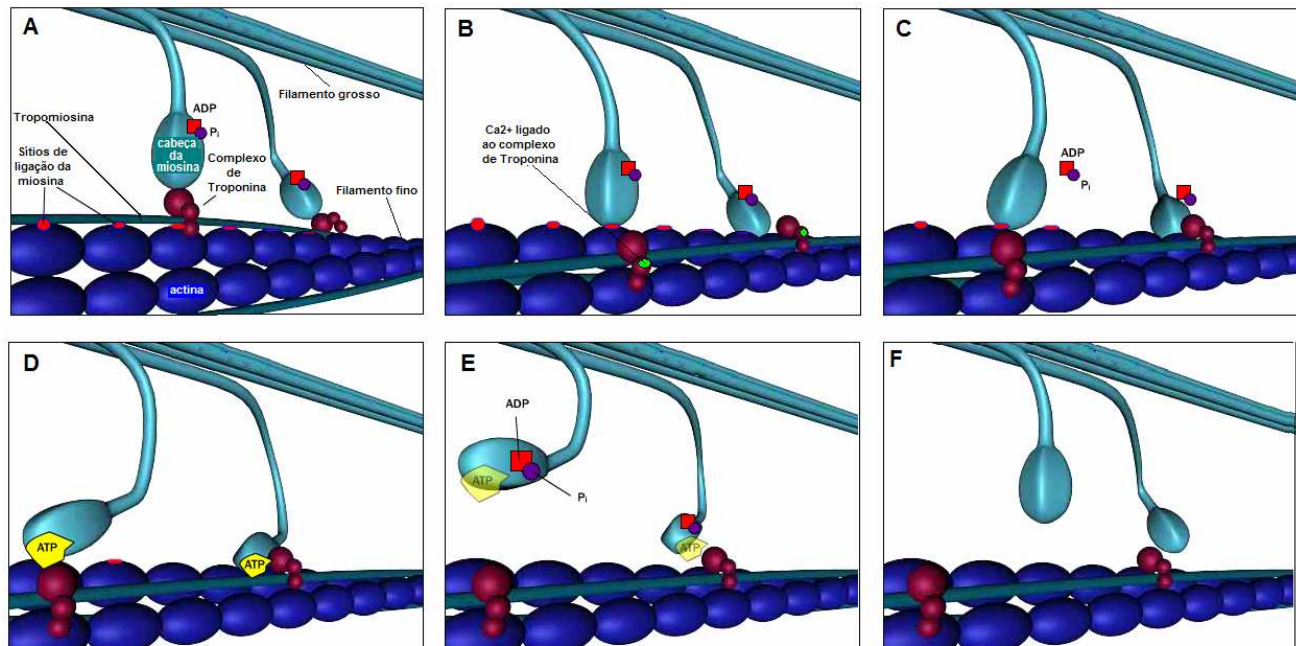


Figura 1.5: Interação entre Ca^{2+} e proteínas contráteis. **A)** estruturas do sarcômero: filamento de actina (ou filamento fino representado por uma cadeia de glóbulos alongados azuis), tropomiosina (fita azul cobalto) torcida sobre a molécula de actina recobrindo nestes os sítios de ligação para a miosina (representados por círculos vermelhos), complexo de troponina (TnC, TnI e TnT, representado pelas esferas cor-de-rosa); miosina (ou filamento grosso, em azul claro), ADP.Pi (quadrados vermelho e círculo roxo). **B)** formação da actomiosina: A ligação do Ca^{2+} (círculos verdes) a TnC promove alteração conformacional da tropomiosina, que expõe os sítios de ligação para a miosina no filamento de actina. Miosina interage com actina formando o complexo actomiosina. **C)** movimentação das pontes cruzadas (*power stroke*): as cabeças da miosina sofrem liberação do ADP-Pi, sofrem **flexão** e movem os filamentos de actina em direção ao centro do sarcômero (linha M) encurtando o mesmo. **D)** interação ATP-Miosina: esta interação reduz a afinidade da miosina pela actina e provoca seu desligamento. **E)** hidrólise do ATP: o ATP é hidrolisado na cabeça da miosina em ADP-Pi, o que aumenta a afinidade da miosina pela actina. **F)** extensão da cabeça da miosina: a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduz-se, a tropomiosina volta a cobrir os sítios da actina e a cabeça da miosina estende-se em direção de novos sítios de interação com a actina, preparando-se para o início do próximo *power stroke*, que terá início com a ligação do Ca^{2+} à TnC (fig.1.6.B). (Freudenrich, 2004.: <http://health.howstuffworks.com/muscle3.htm>).

1.3.2. Contração do Miócito sob ponto de vista de Transporte de Ca^{2+}

Influxo e Mobilização de Ca^{2+} a partir do Retículo Sarcoplasmático

A contração cardíaca inicia-se a nível celular, com a despolarização das células cardíacas pelo potencial de ação (PA), abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L e influxo de Ca^{2+} através destes canais (Bers, 2001).

O influxo de Ca^{2+} promove o aumento localizado da *concentração de Ca^{2+} livre no citosol* ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sob a membrana plasmática (no espaço subsarcolemal), que desencadeia a liberação de grande quantidade de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático (RS) por meio de um mecanismo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) (Fabiato, 1985).

A liberação de Ca^{2+} a partir do RS ocorre na região juncional desta organela, na qual canais de Ca^{2+} do tipo L localizados em invaginações da membrana plasmática (túbulos transversos ou túbulos T) encontram-se em grande proximidade com canais de liberação de Ca^{2+} do RS (CLCR). Os túbulos T ramificam-se penetrando nos sarcômeros até as proximidades do RS. Na célula cardíaca, as regiões de contato entre os túbulos T e RS denominam-se díades (Bers, 2001).

O RS consiste de uma rede de túbulos intracelulares que circundam as miofibrilas (feixes de miofilamentos compostos de proteínas contráteis). Esta estrutura favorece a mobilização rápida de Ca^{2+} , o aumento rápido da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no citosol por meio do mecanismo de CICR, o que resulta em interação deste íon com as proteínas contráteis e contração (vide figura 1.6). O RS é uma organela importante tanto na contração quanto no relaxamento dos miócitos.

1.3.3. O Relaxamento sob o Ponto de Vista de Transporte de Ca^{2+}

Remoção de Ca^{2+} do Citosol pelos Transportadores de Ca^{2+}

Enquanto a contração ocorre em função do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o relaxamento ocorre pela queda da mesma até níveis comuns durante a diástole. Isto se dá pela captação de Ca^{2+} para o interior de organelas citoplasmáticas como o retículo sarcoplasmático (RS) e mitocôndrias (Mito) e extrusão para o meio extracelular (MEC) por meio da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou por meio da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (A-SL) (vide figura 1.6).

A captação de Ca^{2+} para o RS ocorre pela ação da ATPase de Ca^{2+} do RS (*A-RS*), que transporta 2 íons Ca^{2+} por molécula hidrolizada de ATP contra um gradiente de concentração. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varia de 100 nM na diástole a 700 nM de Ca^{2+} na sístole (Bers, 2001), enquanto que a concentração de Ca^{2+} livre no lúmen do RS oscila entre 0,463 a 0,677 mM (≈ 1 mM) (Saiki e Ikemoto, 1997). *A-RS* e NCX contribuem para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, atuando em conjunto para promover o relaxamento; quimicamente porém, competem pelo mesmo íon (Bers *et al.*, 1993).

Avaliando a contribuição relativa de cada um destes transportadores para o relaxamento de miócitos, Bassani *et al.* (1992, 1994a) e Bassani e Bassani (2002) observaram que as contribuições relativas da *A-RS* e da NCX para o relaxamento de miócitos de ratos são, respectivamente, 90% e 7%, enquanto que em coelhos, são de respectivamente 70 % e 28%.

A atividade da *A-RS* é regulada por fosfolambam (PLB). Esta última proteína, quando desfosforilada, interage com a *A-RS*, inibindo-a, por induzir nesta última mudanças conformacionais que resultam em descréscimo de sua afinidade pelo Ca^{2+} e redução de sua taxa de transporte (Brittsan *et al.*, 2003; Cornea *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 1996; MacLennan e Kranias, 2003; Schmidt *et al.*, 2001; Tada e Toyofuku, 1996; Tada *et al.*, 1998; Tada, 2003).

O estudo destes transportadores durante o relaxamento de miócitos mostrou que a função dos mesmos depende da espécie e da idade do animal (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994a,b; Bassani e Bassani, 2002; Sham *et al.*, 1995). Na literatura há relatos de que diversas condições que requeiram um remodelamento cardíaco, possam favorecer o aumento da expressão e/ou atividade da NCX. Dentre estas condições podemos citar a hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica (Ahmmed *et al.*, 2000) e insuficiência cardíaca (Hobai e O'Rourke, 2000).

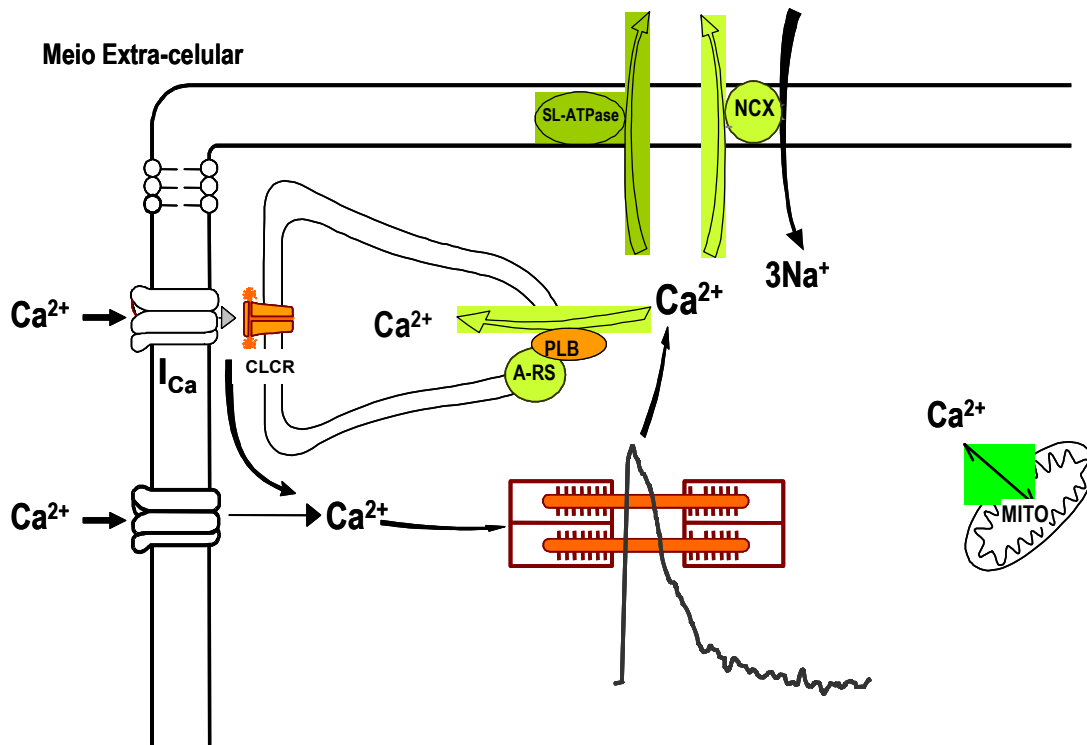


Figura 1.6: Representação esquemática dos mecanismos de mobilização de Ca^{2+} na contração e remoção de Ca^{2+} que ocorrem durante o relaxamento celular. A contração inicia-se pelo influxo de Ca^{2+} (I_{Ca}) através de canais de Ca^{2+} do tipo L. O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas proximidades do CLCR (cor laranja) provoca a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR). A contração resulta de aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e associação de Ca^{2+} aos miofilamentos. O relaxamento se inicia com a queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ devido a captação de Ca^{2+} pelo RS por meio da A-RS, à extrusão de Ca^{2+} para o meio extra-celular por meio da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), à captação de Ca^{2+} para as mitocôndrias pelo Uniporter mitocondrial e à extrusão de Ca^{2+} para o MEC pela A-SL. Os mecanismos que favorecem mobilização de Ca^{2+} e contração estão representados em preto e em tons de vermelho. Os mecanismos participantes da remoção de Ca^{2+} e do relaxamento estão representados em tons de verde (modificado de Bers, 2001).

1.4. A RELAÇÃO PRESSÃO-VOLUME NO VENTRÍCULO ESQUERDO

O desempenho do coração como bomba é determinado pela sua capacidade de manter débito cardíaco (volume/minuto) em função de quatro fatores: a) pré-carga, b) pós-carga, e c) contratilidade cardíaca (inotropismo) e d) frequência cardíaca. A relação pressão-volume do ventrículo esquerdo (alça pressão-volume) fornece informações sobre estes fatores e sobre o trabalho realizado por este ventrículo durante o ciclo cardíaco (Opie, 1988, Braunwald, 2001).

O ciclo ventricular é descrito da seguinte forma (figura 1.7): ao fim da diástole/início da sístole, estando as valvas mitral e aórtica fechadas (fig. 1.7, ponto A), o ventrículo contrai-se sem ejetar sangue, causando um aumento de pressão intracavitária (*contração isovolumétrica*; fig. 1.7, segmento A-B). Quando a pressão sanguínea no ventrículo excede a pressão no segmento inicial da aorta, ocorre a abertura da valva aórtica (fig. 1.7, ponto B) e o sangue é ejetado desta câmara para dentro do sistema arterial (*fase de ejeção*; fig. 1.7, segmento B-C). Conforme o ventrículo se esvazia e a pressão no seu interior cai, a valva aórtica fecha-se (fig. 1.7, ponto C), finalizando o período de ejeção. A abertura e fechamento da valva aórtica limitam, portanto, o período de ejeção, do qual também depende o volume de ejeção. Após o período de *ejeção*, inicia-se o relaxamento ventricular, o volume de sangue no interior do ventrículo permanece constante (*relaxamento isovolumétrico*, fig. 1.7, segmento C-D). Quando a pressão intra-ventricular encontra-se abaixo da pressão atrial, a valva mitral abre-se (fig. 1.7, ponto D) e inicia-se o *enchimento ventricular* (fig. 1.7, segmento DA). O *enchimento ventricular* é limitado pela abertura e fechamento da valva mitral, que, por sua vez, dependem da pressão intraventricular.

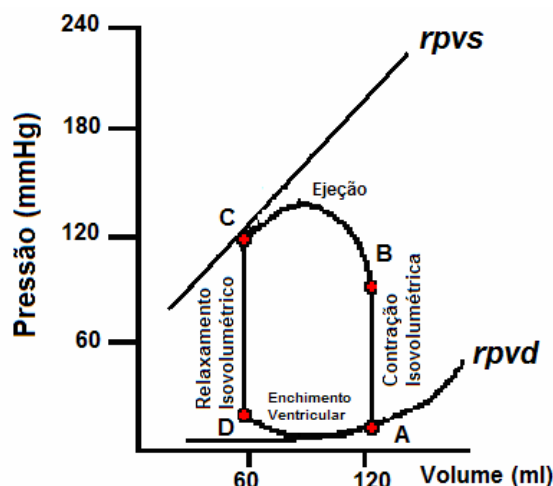


Figura 1.7: Alça pressão-volume do ventrículo esquerdo (VE). O ciclo do VE está compreendido entre as relações de *pressão-volume diastólico* (*rpvd*) e *pressão-volume sistólico* (*rpvs*), que refletem propriedades mecânicas do tecido ventricular: intropismo (durante a sístole) e complacência (durante a diástole). Ao final da diástole (ponto A, *volume diastólico final*), inicia-se a contração isovolumétrica (segmento A-B), fase na qual o VE contrai-se estando as valvas mitral e aórtica fechadas. No ponto B, a contração do VE faz com que a pressão na câmara ventricular supere a pressão no seguimento inicial da aorta (pós-carga) provocando abertura da valva aórtica (B); o que dá início à fase de ejeção (segmento B-C). Em seguida a valva aórtica fecha-se (C) e inicia-se o relaxamento isovolumétrico (segmento C-D). Em D, ocorre abertura da valva mitral e enchimento do ventrículo esquerdo até o fechamento da valva mitral (A), correspondente ao final da diástole (pressão diastólica final ou pré-carga). (Braunwald, 2001).

1.4.1. Pré-Carga

A pré-carga do ventrículo esquerdo, representada pelo volume imediatamente antes da contração, também é descrita pela pressão intracavitária antes do início da contração isovolumétrica (Figura 1.7). Ela é influenciada pelo retorno venoso ao átrio esquerdo e pelo volume sanguíneo total (Braunwald, 2001). O retorno venoso é o volume conduzido ao ventrículo esquerdo durante a diástole ventricular e a sístole atrial esquerda e define a pré-carga. Sob o ponto de vista hemodinâmico, a pré-carga é considerada a pressão de enchimento do ventrículo esquerdo; a nível celular e subcelular, ela corresponde ao comprimento de repouso dos miócitos e ao grau de estiramento dos sarcômeros determinados pelo volume diastólico final. Um aumento da pré-carga implica em maior estiramento

das paredes do ventrículo esquerdo durante a diástole ventricular (Katz, 1992; Edmunds, 1997; Opie, 1998).

A influência da pré-carga sobre o desempenho cardíaco é explicada pelo mecanismo de Frank-Starling, que estabelece que, a força de contração e o comprimento da fibra muscular em repouso apresentam uma correlação positiva dentro de certos limites (Braunwald, 2001; Opie, 1998). Em outras palavras, a força de contração do VE é ajustada de acordo com o volume de sangue contido em sua cavidade ao fim da diástole (pré-carga), o que se deve ao fato de o miócito ajustar a atividade das pontes cruzadas em função de seu estiramento. A correlação positiva entre força e comprimento é observada para comprimentos do sarcômero compreendidos entre 1,9 a 2,3 μm (Opie, 1998).

Uma das explicações para esta correlação positiva é número de pontos de contatos entre os miofilamentos de actina e miosina. Com o sarcômero pouco estirado (comprimento inferior a 1,9 μm), as extremidades centrais dos filamentos de actina provenientes de ambos discos Z sobrepõe-se no centro do sarcômero, de modo que o filamento de actina proveniente de uma extremidade do sarcômero se interponha entre o filamento de actina e o miosina adjacentes da extremidade oposta, o que interfere na interação miosina-actina (“*double overlap*”). Na medida em que o sarcômero é estirado até aproximadamente 2 μm , esta interferência é gradualmente reduzida e há aumento correspondente do número de *pontes-cruzadas* disponíveis. A interação máxima, correspondente à força máxima, ocorre quando o comprimento do sarcômero atinge valores aproximados entre 2 a 2,3 μm . Um estiramento adicional do sarcômero (acima de 2,4 μm), reduz novamente o número de sítios de interação entre miosina e actina e a força de contração do miócito (Braunwald, 2001; Edmunds, 1997; Opie, 1998).

Outra explicação para a correlação positiva entre força de contração e comprimento da fibra muscular é o aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e maior ativação da ATPase de Ca^{2+} devido ao estiramento (Kuhn *et. al.*, 1990; Tavi *et. al.*, 1998). Segundo Smith e Fuchs (Smith e Fuchs, 2000; Fuchs e Smith, 2001), a maior proximidade entre miofilamentos grossos e finos (menor espaçamento lateral) e o aumento do número de sítios de ligação de alta afinidade entre a actina e miosina favorecem a interação das cabeças da miosina com a actina.

Portanto, o mecanismo de Frank-Starling funciona como um eficiente fator de regulação da força de contração pelo enchimento cardíaco acompanhando oscilações fisiológicas do sistema cardiovascular como o ciclo respiratório, mudanças posturais, variações da pressão arterial, exercício

físico, etc. Este mecanismo porém, constitui um suporte de ação limitada em sobrecargas cardíacas sustentadas (Rocha e Silva Jr., 1973).

O enchimento e a complacência do ventrículo são descritos pela *relação entre pressão e volume diastólicos* (figura 1.7., *rpvd*), que apresenta certa variabilidade. A complacência ou distensibilidade do ventrículo é definida como a variação de volume diastólico normalizada pela variação de pressão (dV/dP). A rigidez ventricular, recíproca à complacência, é dada pela variação da pressão normalizada pela variação de volume diastólico (dP/dV). Um aumento da rigidez ventricular altera a *relação entre pressão e volume diastólicos* (*rpvd*, figura 1.8.C relação E), deslocando-a para cima (figura 1.8.C, relação E') (Edmunds, 1997), o que limita o período de abertura da valva mitral e o enchimento ventricular. O aumento de rigidez dificulta a compensação do efeito da pós-carga unicamente por aumento de pré-carga e requer ativação simpática, que favorece o inotropismo (forção de contração do VE), a fim de facilitar a ejeção e reduzir o volume sistólico final (VSF_{VE}), que se encontra aumentado devido à perda de complacência ventricular. Dentre fatores que comumente afetam a complacência e a relação pressão-volume do VE encontram-se a fibrose e a hipertrofia ventricular, decorrentes de patologias ou do envelhecimento (Opie, 1998; Klabunde, 2004).

No caso de fibrose, a redução da complacência ocorre em função do aumento de colágeno intersticial (Derumeaux *et al.*, 2002); no caso da hipertrofia, não somente ao aumento de colágeno (componente não contrátil), mas possivelmente também à disfunção do relaxamento cardíaco (Apstein e Lorell, 1988; Grossman, 1990; Lorell, 1992; Braunwald, 2001; Badenhorst *et al.*, 2003). O relaxamento cardíaco, por sua vez, é um processo complexo, que depende não somente da resistência passiva do tecido cardíaco e dos miócitos, mas também de energia para promover a queda da $[Ca^{2+}]_i$ (Lecarpentier *et al.*, 1987; Arai *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 1997).

1.4.2. Pós-Carga

A pós-carga pode ser definida como tensão ou força por unidade de área de secção transversal atuante sobre as fibras do ventrículo esquerdo no início do encurtamento. No organismo intacto, a pós-carga é determinada pela resistência vascular periférica de artérias e arteríolas (Braunwald, 2001). Ela também pode ser considerada a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo durante a sístole, necessária para superar a pressão na valva aórtica e bombear o sangue do ventrículo para o

interior do sistema arterial. Ela determina, juntamente com o estado inotrópico do coração, o volume de sangue a ser ejetado pelo ventrículo durante a sístole (volume sistólico) (Edmunds, 1997). O aumento da pós-carga encurta o tempo em que a valva aórtica permanece aberta (período de ejeção) e, conseqüentemente, o volume sistólico. Deste modo, a reação ao aumento de pós-carga nos primeiros batimentos é a redução do volume sistólico e, conseqüentemente, queda da pressão arterial (figura 1.8.A) (Klabunde, 2004). A redução da pressão arterial é registrada pelos baroreceptores do seio carotídeo e conduzida até os centros medulares do tronco cerebral, onde evoca reflexos que resultam na redução do tônus parassimpático e no aumento do tônus simpático. O aumento da atividade simpática sobre os vasos se traduz em vasoconstricção (aumento da resistência de arteríolas e redução da complacência venosa), favorecendo o aumento do retorno venoso para o VD e, indiretamente, para o VE (aumento do volume diastólico final do VE, VDF_{VE}). Sobre o coração, o a estimulação simpática promove aumento da força de contração (inotropismo) e da frequência cardíaca (cronotropismo) (Klabunde, 2004). Este **mecanismo compensatório agudo** – ativação simpática – é mais eficiente enquanto o coração não estiver operando ao longo da porção mais inclinada da relação pressão-volume diastólico (figura 1.8.B, relação E), isto é, enquanto ainda houver reserva de pré-carga. Nesta situação, um aumento da pós-carga (figura 1.8.B, pontos B→B') resulta em aumento compensatório do VDF_{VE} (figura 1.8.B, pontos A→A'). O aumento da pré-carga provoca estiramento dos miócitos e faz com que o VE desenvolva maior força de contração, seja capaz de manter o volume sistólico, mesmo ejetando o sangue contra uma maior pressão que tenda a diminuir o período de ejeção (Klabunde, 2004).

A **manutenção da pós-carga**, a tensão parietal elevada e o reduzido volume sistólico resultam em ativação simpática e de vias que sinalizam a indução da hipertrofia (Braunwald, 2001). Em nosso modelo, o aumento de pós-carga foi decorrente de estenose aórtica, obtida por coarctação.

Na estenose aórtica, o esvaziamento do ventrículo esquerdo é dificultado pela grande resistência ao fluxo de saída, que tem como consequência, redução do volume sistólico e aumento do *volume sistólico final* (volume sistólico final do VE, VSF_{VE} ; figura 1.8.A, ponto C'). A redução do volume sistólico deve-se à diminuição da velocidade de encurtamento da fibra devido ao aumento da pós-carga. Mas, como o VSF_{VE} encontra-se aumentado, este excesso é adicionado ao retorno venoso provocando aumento do VDF_{VE} (volume diastólico final ou pré-carga). O aumento na pré-carga, por sua vez, ativa o mecanismo de Frank-Starling que resulta em aumento da força de contração, que se

contrapõe ao aumento da resistência ao fluxo de sangue a ser ejetado pelo VE (Opie, 1998; Klabunde, 2004).

Na estenose aórtica moderada, este aumento da pré-carga pode ser suficiente para manter o volume sistólico normal. Na estenose aórtica severa também ocorre aumento compensatório do volume diastólico final, mas este juntamente com a ativação do mecanismo de Frank-Starling podem ser insuficientes para evitar a redução do volume sistólico (ejetado), devido ao grande aumento do volume sistólico final. A redução do volume sistólico (ejetado) pode ser observada pelo fato de o volume sistólico final apresentar maior aumento do que o volume diastólico final (Klabunde, 2004).

As alterações descritas até então não incluem os mecanismos compensatórios cardíacos e sistêmicos acionados para manter o débito cardíaco e a pressão arterial. Estes mecanismos compensatórios não estão restritos à vasoconstrição sistêmica, mas incluem também aumento do volume sanguíneo, aumento da frequência cardíaca e aumento do inotropismo (Klabunde, 2004).

Estas alterações são mais facilmente representadas por meio de relações pressão-volume.

1.4.3. Efeitos da sobrecarga pressórica sobre a alça pressão-volume

A da *alça* pressão-volume é útil na avaliação do desempenho cardíaco sob condições fisiológicas e patofisiológicas. A figura 1.8 ilustra quatro condições: relação pressão-volume normal, efeito imediato do aumento da pós-carga (figura 1.8.A), compensação rápida do aumento da pós-carga por ativação neuro-humoral (figura 1.8.B) e compensação do aumento da pós-carga pela hipertrofia (figura 1.8.C).

Nos primeiros batimentos após o aumento da pós-carga, a pressão desenvolvida pelo VE não é suficiente para bombear todo o sangue contido nele. Como consequência, ao fim da sístole há um aumento do volume de sangue remanescente no VE (volume sistólico final, VSF) e redução do volume sistólico ejetado (VS). A redução de VS provoca uma queda de pressão, que é registrada por barorreceptores na região do arco aórtico e na carótida (figura 1.8.A) (Klabunde, 2004).

A compensação rápida ao aumento de pós-carga dá-se por ativação neuro-humoral com aumento do tônus simpático. A queda de pressão registrada nos barorreceptores promove ativação reflexa do sistema nervoso simpático (SNS) e liberação de catecolaminas – epinefrina e norepinefrina – por terminações nervosas e adrenal.

As catecolaminas apresentam efeito cronotrópico positivo (aumento da frequência cardíaca), efeito dromotrópico positivo (aumento da velocidade de condução dos estímulos no coração) e efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração) via ativação de receptores β_1 . Sobre artérias e veias, elas apresentam efeito vasoconstritor (via receptores α_1 e α_2). O efeito geral de concentrações baixas a moderadas de epinefrina é o aumento do débito cardíaco, redistribuição da circulação com pequena alteração da pressão arterial média, devido à queda da resistência vascular sistêmica via ativação de receptores β_2 que mediam vasodilatação. Entretanto, em altas concentrações, epinefrina causa aumento de pressão arterial devido à ativação de receptores adrenérgicos α_1 (Guyton, 1986; Klabunde, 2004). Os efeitos da vasoconstrição e aumento da pré-carga decorrentes da ativação simpática são mostrados na figura 1.8.B (ponto A desloca-se para A'), onde observamos um leve deslocamento da alça PV para a direita e para cima (linha pontilhada). O volume sistólico é mantido pelo aumento da pré-carga (figura 1.8.B, manutenção da inclinação da reta F) (Katz, 1992, p.647-649; Edmunds, 1997; Opie, 1998).

Um mecanismo compensatório que atua mais a longo prazo consiste na ativação da cascata de renina-angiotensina-aldosterona que resulta em aumento da volemia e contribui para o aumento da pré-carga (Junqueira, 1997).

O aumento crônico da pós-carga (e.g. estenose aórtica) promove um aumento da tensão sobre as paredes ventriculares (tensão parietal, T). A Lei de Laplace pode ser empregada para o entendimento de como o remodelamento cardíaco durante a hipertrofia favorece a redução da tensão exercida sobre as paredes cardíacas. O coração pode ser modelado como um cilindro pressurizado, no qual a *tensão exercida sobre as paredes* (tensão parietal, T) é proporcional à *pressão dentro do mesmo* (P) multiplicada pelo seu *raio* (R), dividida pela *espessura* das paredes (e), $T = (P \cdot R)/e$. Por esta equação, torna-se claro como o aumento da espessura das paredes resulta em redução da tensão sobre as mesmas, e maior resistência parietal ao regime de altas pressões. A adaptação a um aumento crônico da pós-carga ocorre por meio de hipertrofia com aumento da espessura da parede ventricular que cresce para o interior do VE sem aumentar o volume externo desta câmara (hipertrofia do tipo concêntrica) (Opie, 1988; Braunwald, 2001).

Embora não apresente as todas vantagens observadas na hipertrofia fisiológica desenvolvida por condicionamento esportivo, a hipertrofia induzida por aumento de pós-carga apresenta a vantagem de reduzir a tensão parietal e preservar a função contrátil. No entanto a longo prazo, a este tipo de hipertrofia constitui, por si só, um fator de risco para a doença cardiovascular, e, quando não

tratada, evolui para a insuficiência cardíaca (Liao, 2002). A hipertrofia miocitária, embora contribua para o aumento da rigidez do tecido, favorece também a função contrátil; enquanto que, a hipertrofia de tecido intersticial ocorre com aumento de colágeno e redução da complacência ventricular (Klabunde, 2004). Cingolani *et al.*(2004) atribui ao colágeno um papel benéfico na manutenção da função sistólica de ratos espontaneamente hipertensos.

Os efeitos da redução da complacência miocárdica diastólica podem ser vistos na alça pressão-volume de um coração hipertrofiado (deslocamento da $rpvd$ E para E', figura 1.8.C), bem como aumento do inotropismo e manutenção do volume sistólico (aumento do coeficiente angular da relação pressão volume sistólicos; deslocamento da $rpvs$ para cima – F desloca-se para F').

A contratilidade, força de contração ventricular, sofre influência de fatores como tônus adrenérgico, hipertrofia, isquemia (Edmunds, 1997; Braunwald, 2001). Convém notar que, com a redução da complacência diastólica, reduz-se a capacidade do coração hipertrofiado em aumentar o volume diastólico final (VDF, que corresponde a pré-carga) (figura 1.8.C, pequeno deslocamento de A para A'). A manutenção do volume sistólico passa a depender sobretudo do aumento da contratilidade (figura 1.8.C, $rpvs$ dada por F') (Balke e Shorofsky, 1998; Braunwald, 2001; Edmunds, 1997).

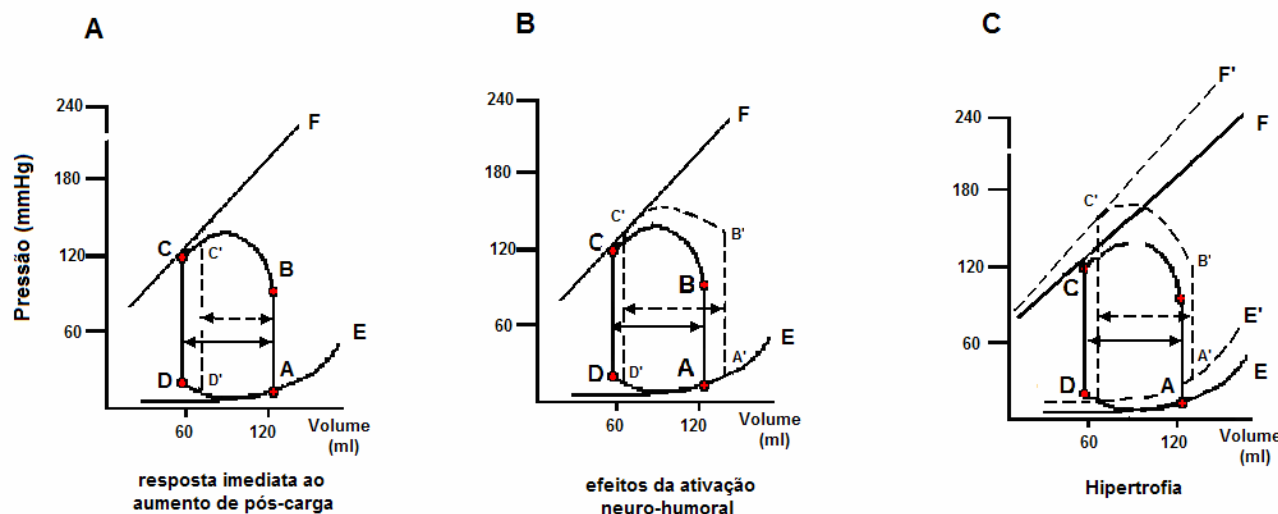


Figura 1.8: Relações pressão-volume do ventrículo esquerdo sob condições fisiológicas e fisiopatológicas.

A linha empregada para a alça controle é contínua; para alças que representam adaptações à sobrecarga pressórica, tracejada.

A) alça controle e em resposta ao aumento agudo da pós-carga: em um primeiro momento, o aumento da pós-carga provoca redução do volume sistólico ejetado (VS). VS está representado por setas horizontais contínua (controle) e tracejada (após aumento de pós-carga).

B) alça controle e após compensação imediata do aumento da pós-carga por ativação neuro-humoral: uma compensação imediata do aumento da pós-carga ($B \rightarrow B'$) consiste no aumento da pré-carga ($A \rightarrow A'$). O volume sistólico é mantido devido ao aumento do retorno venoso obtido por ativação neuro-humoral e vasoconstrição. O inotropismo do ventrículo não se altera (manutenção da relação F).

C) alça controle e após compensação do aumento da pós-carga pela hipertrofia: com a manutenção da pós-carga instala-se a hipertrofia, que ocorre com concomitante diminuição da complacência diastólica do VE (deslocamento $E \rightarrow E'$) e aumento do inotropismo durante a sístole (deslocamento da relação F para F'). A figura representa uma situação na qual a função sistólica e o volume sistólico são mantidos. O volume diastólico final do VE (VDF_{VE}) encontra-se aumentado devido à vasoconstrição por ativação simpática, o que resulta em aumento da pré-carga. O volume sistólico final do VE (VSF_{VE}) encontra-se normalmente elevado em casos de estenose aórtica. O trabalho realizado para manter o volume sistólico (volume ejetado durante a sístole), dado pela área delimitada pela alça pressão-volume, é maior em casos de estenose aórtica e durante a hipertrofia do que em situações controle. Alterações da frequência cardíaca, não consideradas aqui, também podem alterar estes alças (adaptada de *Edmunds*, 1997 e *Klabunde*, 2004).

1.5. HIPERTROFIA CARDÍACA – ASPECTOS MOLECULARES:

Hipertrofia é o aumento das dimensões de um membro, órgão, ou ainda de uma célula. No caso do coração, ela está associada a diversas alterações que variam de remodelamento de miócitos – aumento das dimensões miocitárias, rearranjo estrutural dos mesmos, alteração de propriedades elétricas e de processos de sinalização – a remodelamento de tecido intersticial e fibras colágenas e de tecido vascular. Estas alterações contribuem para que a hipertrofia seja um fator de risco para morbidade e mortalidade (Campbell *et al.*, 1991; Braunwald, 2001).

Alguns autores defendem que o crescimento hipertrófico cardíaco é semelhante ao fisiológico e pode ser atribuído somente à hipertrofia miocitária. Argumentos a este favor foram apresentados por Korecky e Rakusan (1978), que comparando miócitos hipertrofiados (por constrição aórtica) com normais provenientes de corações de igual peso, observaram que os últimos apresentavam igual volume. Resultados semelhantes foram observados por Rakusan *et al.* (1984) na hipertrofia induzida por hipertensão e corroborados por Van der Laarse *et al.* (1989).

Entretanto, Anversa *et al.* (1986) constataram em tecido cardíaco e em miócitos de corações hipertrofiados diferenças a nível histológico e subcelular. De fato, a hipertrofia cardíaca pode ser atribuída, entre outros fatores, ao aumento das dimensões miocitárias; mas também ao aumento de colágeno intersticial e de proliferação de tecido vascular (Eleftheriades *et al.*, 1993; Anversa *et al.*, 1975; Loud *et al.*, 1978). Quanto ao tecido vascular, estes autores observaram redução do volume luminal com relação à superfície dos capilares; a nível subcelular, constataram uma redução potencialmente desfavorável do volume mitocondrial com relação ao volume das miofibrilas, o que possivelmente comprometeria a mobilização e o fornecimento de energia para a demanda dos miócitos durante a contração frente a sobrecarga pressórica. A proporção de RS com relação ao volume citosólico também se encontra aumentada (Anversa *et al.*, 1976; Anversa *et al.*, 1978). Recentemente há crescentes evidências de que a hiperplasia (proliferação de miócitos) possa contribuir para a hipertrofia cardíaca (Anversa *et al.*, 1990; Anversa *et al.*, 1992; Leri *et al.*, 2002).

1.5.1. Estímulos na sinalização da indução de hipertrofia

A hipertrofia resulta da ativação da síntese protéica, controlada por meio de mecanismos transcricionais, translacionais e/ou pós-translacionais (Ito *et al.*, 1980; Fuster *et al.*, 2000; Cooper,

1997). Esta ativação pode ser por **acoplamento direto**, quando a ativação da sinalização da hipertrofia resultar diretamente de estímulo mecânico (Domingos et. al., 2002; Cooper, 1990; Sadoshima e Izumo, 1997) e por **acoplamento indireto**, quando a ativação resultar de estímulos **autócrinos** (hormônios ou fatores de crescimento de liberação local), **parácrinos** (e.g. catecolaminas de liberação local, endotelina e outros peptídeos) ou **endócrinos** (e.g. catecolaminas, angiotensina II, tiroxina) (Cooper, 1997; Fuster et al., 2000).

De modo geral, os principais estímulos capazes de ativar as vias de sinalização da hipertrofia são: a) estiramento dos miócitos; b) agonistas (i.e. catecolaminas, angiotensina II, endotelina); e c) fatores de crescimento como *Insulin-like Growth Factor* (IGF) and *Transforming Growth Factor* (TGF).

A) ACOPLAMENTO DIRETO

No caso da ativação da hipertrofia por acoplamento direto, **estímulos mecânicos** são convertidos em sinais bioquímicos (mecanotransdução), como no caso da sobrecarga pressórica ou volumica que causa estiramento de miócitos por aumento secundário da pré-carga e aumento de pressão intraventricular.

O efeito mais direto do estímulo mecânico é a abertura de *canais iônicos ativados por estiramento* (SACs). A sinalização da hipertrofia por meio dos SACs parece envolver múltiplas vias: influxo de Na^+ , que se acumula no citosol e ativa secundariamente o influxo de Ca^{2+} via NCX e cascatas de sinalização dependentes do Ca^{2+} , com ativação de *proteína quinase C* (PKC), ativação de proto-oncogenes e da via *c-Jun N-terminal quinase* (JNK) (Croizatier, 1996; Opie, 1988; Molkentin e Dorn, 2001, Nadruz et al., 2004).

Outro efeito direto do estiramento de miócitos na sinalização da hipertrofia é mediado por proteínas do citoesqueleto (desminas, tubulinas) (Opie, 1988). A hipertrofia crônica por sobrecarga pressórica está associada ao aumento da densidade da rede de microtúbulos formados por estas proteínas (e.g.. aumento da polimerização da tubulina); aumento este que resulta em disfunção contrátil (Ishibashi et al., 1996; Tagawa et al., 1996; Tagawa et al., 1997, Tagawa et al., 1998; Tsutsui et al., 1993; Tsutsui et al., 1994; Zile et al., 1999). Scopacasa et al.(2003), estudando a participação da tubulina na hipertrofia, observaram que a inibição da sua polimerização pela colchicina mostrou-se eficiente na preservação da função contrátil ventricular e na redução da hipertrofia (Scopacasa et al., 2003).

B) ACOPLAMENTO INDIRETO

B.1) Sinalizadores de liberação autócrina ou parácrina

Um mecanismo indireto pelo qual o estiramento de miócitos ativa os sinalizadores da hipertrofia está associado à liberação de neurotransmissores e outras substâncias ativas na sinalização da hipertrofia. Esta liberação pode ser autócrina (pelas próprias células: *e.g.* geração de angiotensina II nos miócitos) ou parácrina (geração / liberação de sinalizadores pelas células vizinhas: *e.g.* liberação de endotelina pelo endotélio; liberação de fatores de crescimento, GF, pelos fibroblastos) (Watson, 1991; Sadoshima *et al.*, 1992; Cooper, 1997; Sadoshima e Izumo, 1997; Opie, 1998; Yamazaki e Yazaki, 2000; Domingos *et al.*, 2002; Franchini *et al.*, 2000; Franchini, 2002; Torsoni *et al.*, 2003).

B.2) Sinalizadores de liberação endócrina

Sinalizadores da indução da hipertrofia também são liberados por estímulos indiretos, *e.g.* em função da redução do volume sistólico decorrente do aumento da pós-carga, que ativa reflexos mediados por baroreceptores aumentando a liberação de neurotransmissores adrenérgicos e reduzindo o tônus parassimpático (Klabunde, 2004).

Mecanismos ativadores da hipertrofia através de **vias neurais e endócrinas** envolvem geralmente a ativação primária de receptores como os adrenérgicos (sobretudo α_1), receptores de angiotensina II (AT1 e AT2) e o receptor citoplasmático de endotelina, T3. Estes agonistas atuam na sinalização da hipertrofia por acoplamento a um receptor acoplado a uma *proteína ligante de nucleotídeo da Guanina, GTP* (proteína G^2) da classe *Gaq* (Molkentin e Dorn, 2001). Uma via comum ativada por eles envolve ativação da quinase *fosfolipase C* (PLC), que hidrolisa o *fosfatidil inositol bifosfato* (PIP2) em *inositol-trifosfato* (IP3) e *diacil-glicerol* (DAG), que resultam respectivamente no aumento da mobilização de Ca^{2+} e ativação de *proteína quinase C* (Morgan e Baker, 1991; Molkentin e Dorn, 2001).

Agonistas como angiotensina II, endotelina 1, fenilefrina e isoproterenol também atuam na sinalização para hipertrofia por meio da ativação de *quinases ativadas por mitogênios* (MAPKs) (Sadoshima e Izumo, 1993; Knowlton *et al.*, 1993).

² Os receptores acoplados a proteína G são denominados *G protein coupled receptors* (GPCR). Importantes no coração são os receptores adrenérgicos (acoplados a *Gas*, que media efeitos estimulatórios), receptores colinérgicos (acoplados a *Gai*, que media efeitos inibitórios), receptores de angiotensina, receptores α -adrenérgicos e receptores de endotelina (acoplados a *Gaq*, envolvidos com a ativação de vias de sinalização da hipertrofia) (Molkentin e Dorn, 2001; Esposito *et al.*, 2002).

1.5.2. Respostas Celulares Gerais Envolvidas na Sinalização da Hipertrofia

A resposta celular dos miócitos ao acoplamento direto pelo estiramento ou indireto pela ativação de receptores por neurotransmissores liberados reflexamente consiste na produção de segundos mensageiros (*e.g.* IP3, DAG), mobilização de Ca^{2+} , e ativação de enzimas fosforiladoras ou desfosforiladoras (*e.g.* PKC, MAPK, calcineurina). A mobilização de Ca^{2+} , importante no processo de acoplamento excitação-contração (ECC), é também importante na sinalização da hipertrofia. O Ca^{2+} é mobilizado pela ativação receptores α -adrenérgicos, de receptores para a angiotensina (AT1 e AT2) e de receptores para endotelina acoplados a *proteína G* (Gaq) (Akhter *et al.*, 1998; Molkentin e Dorn, 2001). Estes receptores ativam a enzima fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 promove abertura de canais de liberação de Ca^{2+} do RS (IP3Rs) e aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A maior $[\text{Ca}^{2+}]$ resulta em ativação da quinase dependente de Calmodulina (Ca/CaMK) e a proteína quinase C (PKC). PKC, importante na sinalização da hipertrofia, também sofre ativação por DAG (Moschela e Marks, 1993, Bers, 2001).

Grande parte das substâncias envolvidas nas vias de sinalização da hipertrofia são enzimas fosforiladoras, quinases – *e.g.* fosfolipase C (PLC), *protein kinase C* (PKC), *signal transducer and activator transcription* (STAT), *mitogen activated protein kinase* (MAPKs). Algumas destas quinases são ativadas por Ca^{2+} (*e.g.* PKC) (Opie, 1988). A via das MAPKs é comum a muitas vias de sinalização da hipertrofia, razão pela qual será abordada separadamente a seguir.

Em contraposição ao grande número de quinases, uma fosfatase de serina e treonina activada por Ca^{2+} -Calmodulina (Ca/CaM) também atua nestas vias, a calcineurina, por meio da ativação de fatores de transcrição da família de *nuclear factor of activated T cell* (NFAT). Quando ativada, a calcineurina desfosforila estes fatores de transcrição provocando sua translocação do citoplasma para o núcleo e ativação de genes (Molkentin e Dorn, 2001).

1.5.3. Vias Gerais de Sinalização da hipertrofia- Via das MAPKs

Diversas vias de sinalização para a indução da hipertrofia envolvem a participação de enzimas da superfamília das *quinases ativadas por mitogênicos* (superfamílias das MAPKs). Esta superfamília compreende *proteínas quinases de regulação extracelular* (ERK1/2), *c-Jun N-terminal quinase* (JNK) e p38 MAPKs. Estas quinases desempenham papel importante no crescimento do

coração e na função cardíaca (Sugden e Bogoyevitch, 1995; Robinson e Cobb, 1997; Esposito *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998) e têm a intensidade e a duração da sua ativação modulada por fosfatases (MAPK-fosfatases, MKPs), cuja atividade - desfosforilação - é oposta a das quinases, (Bueno *et al.*, 2001). A ativação de uma ou mais vias das MAPKs é determinada em função dos estímulos.

Diversos estímulos (i.e. neuro-hormônios, citoquinas, e estiramento) ativam a via da p38 MAPK, cuja inibição mostrou-se eficaz para prevenção da deterioração cardíaca observada durante o progresso da hipertrofia para casos mais severos insuficiência cardíaca (Zechner *et al.*, 1997; Behr *et al.* 2001).

Rapacciuolo *et al.* (2001) demonstraram as catecolaminas participam da sinalização da hipertrofia por meio da ativação das três vias de sinalização das MAPK – quinase de regulação extracelular (ERK1/2, *extracellular regulated kinase*), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e p38MAPK. Eles demonstraram que a ativação destas vias em resposta à coarctação aórtica encontrava-se completamente inibida em animais transgênicos *knocked-out* para enzima dopamina beta-hidroxilase, que converte dopamina em norepinefrina. Destes resultados concluímos a participação da ativação simpática é na indução da hipertrofia *in vivo*.

Esposito *et al.* (2001) observaram que a ativação destas vias em resposta ao aumento de pós-carga (coarctação aórtica) apresentava uma ordem temporal definida: a ativação da via JNK era imediata, seguida de ativação da via das p38/p38b após 3 dias de coarctação aórtica, e da via das ERK após 7 dias. Eles observaram também que as vias da ERK e JNK dependem de proteína G da classe Gαq, enquanto que a via das p38 é mediada por outro tipo de proteína.

1.5.4. Alguns modelos experimentais usados no estudo da hipertrofia ventricular

São muitos os estímulos capazes de induzir a sinalização da hipertrofia ventricular (*e.g.* estiramento, pressão, neuro-hormônios, angiotensina, endotelina) e muitas as vias pelas quais estes estímulos atuam.

É bem verdade que um estímulo pode ativar diversas vias de sinalização – *e.g.* o estiramento ativa SACs, provoca indiretamente aumento do Ca^{2+} , que por sua vez ativa PKC mas pode também induzir liberação de endotelina, que induz liberação de *fatores de crescimento* a partir de fibroblastos (GF, Growth Factor; alguns destes são: *Insulin-like-growth-factor*, IGF-1; *transforming-growth-*

factor-β, TGB-β). Estes fatores de crescimento atuam nos miócitos ativando as tirosina-quinases JAK /STAT que, por sua vez, ativam proto-oncogenes (Opie, 1988).

Do modo contrário, diversos estímulos podem compartilhar uma mesma via de sinalização para hipertrofia (*e.g.* endotelina, angiotensina II, catecolaminas α -adrenérgicas ligam-se a receptores acoplados a G α_q e ativam PLC, gerando IP₃ e DAG, o que resulta em aumento de [Ca²⁺]_i e ativação da proteína quinase C, PKC) (Kent e McDermott, 1996; Molkentin e Dorn, 2001).

A importância de cada uma destas vias varia em função dos estímulos existentes, dos modelos empregados. Dentre muitos estímulos capazes de induzir hipertrofia ventricular empregados na obtenção de modelos experimentais podemos citar mutações genéticas (modelos transgênicos), intervenções farmacológicas, intervenções cirúrgicas.

Modelos **transgênicos** para o estudo da hipertrofia podem ser obtidos por supressão de gens (*knock-out*) ou ainda por superexpressão de gens, *i.e.* como o da renina, que resulta em ativação do sistema renina angiotensina (Zolk *et al.*, 2002; Rapacciuolo *et al.*, 2001; Sipido *et al.*, 2002; Huggins *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2003).

Dentre as **intervenções farmacológicas** que induzem a hipertrofia podemos citar estimulação adrenérgica (*i.e.* administração crônica de fenilefrina) (Reinecke *et al.*, 1997), inibição da síntese de óxido nítrico (NO) e ativação do sistema renina-angiotensina (Hropot *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2000; di Fusco *et al.*, 2000; Pacca *et al.*, 2002).

Dentre as **intervenções cirúrgicas** comumente adotadas, podemos citar modelos obtidos por sobrecarga pressórica induzida por coarctação aórtica, hipertensão renovascular no modelo Goldblatt de hipertrofia (Medugorac, 1977; Siddiq *et al.*, 2001; Sipido *et al.*, 2002).

1.5.5. Mecanismos ativados na hipertrofia por coarctação aórtica

A hipertrofia por sobrecarga pressórica obtida por coarctação da aorta em modelos animais está associada portanto ao estiramento da parede ventricular e à liberação de neurotransmissores e hormônios, como as catecolaminas e angiotensina II (Fuster *et al.*, 2000).

Akers *et al.* (2000) observaram que o curso temporal da ativação do sistema renina-angiotensina sistêmico e do sistema nervoso simpático durante a instalação da hipertrofia em animais após 3, 10, 30 e 60 dias de coarctação aórtica também apresentava uma sequência temporal bem definida: o aparecimento da hipertrofia coincidia com ativação transitória do sistema renina-

angiotensina ao terceiro dia após a coarctação; ao décimo dia, havia um aumento na densidade dos receptores de angiotensina I (AT1) e da atividade do sistema nervoso simpático; e após 10 dias, redução gradual da resposta contrátil ao agonista de receptores β adrenérgicos, isoproterenol, que foi atribuída a dessensitização destes receptores.

Em nosso modelo animal de estenose aórtica, é possível que haja ativação de estímulos mobilizados indiretamente pelo estiramento resultante de aumento reflexo da pré-carga, bem como da ativação do sistema renina-angiotensina e sistema nervoso simpático.

1.5.6. Expressão dos Transportadores de Ca^{2+} na instalação da hipertrofia

A literatura relata uma correlação de um fenótipo geral da hipertrofia crônica – redução do pico do transiente de Ca^{2+} , prolongamento do tempo de relaxamento, perda diastólica de Ca^{2+} pelo RS (Bailey *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2000), prolongamento do potencial de ação (Ahmmed *et al.*, 2000) – com os seguintes alterações dos níveis de determinados mRNA e proteínas: tendência de redução da expressão de α -MHC (*Myosin Heavy Chain*) e substituição gradual pela isoforma lenta β -MHC (Ojamaa *et al.*, 1994; Haddad *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2001), redução da expressão da *A-RS* (Ho *et al.*, 1998; Takeishi *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2003), aumento do mRNA que codifica o NCX e da respectiva proteína (Kent *et al.*, 1993; Menick *et al.*, 1996; Menick *et al.*, 2002). Como o enfoque de nosso estudo é o transporte de Ca^{2+} durante o relaxamento e a diástole, voltamos nossa atenção para os transportadores atuantes no **relaxamento**, *A-RS* e NCX.

A **redução da expressão da *A-RS*** foi observada por diversos autores em casos de hipertrofia e/ou insuficiência cardíaca (De la Bastie *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994; Wang e Fuchs, 1994; Wankerl *et al.*, 1995; Bailey *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1997; Cadre *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2001; Reilly *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001; Kogler *et al.*, 2003;). Entretanto, há alguns relatos de aumento da expressão da Serca2 e atividade da *A-RS* na hipertrofia suave ou moderada. Arai *et al.* (1996) observaram que ratos submetidos por 8 dias à coarctação aórtica desenvolviam diferentes níveis de hipertrofia, que variava de suave (cuja razão entre o ventrículo esquerdo (VE) e o peso corporal (PC) era inferior a 3,0 (VE/PC < 3,0) a mais severa (VE/PC > 3,5). A função cardíaca encontrava-se intacta em todos os animais. Animais com hipertrofia suave apresentavam aumento da expressão da Serca2 e da capacidade de captação de Ca^{2+} por homogenatos de RS.

Nediani *et al.*(2000), estudando porcos após 6 a 96 horas de coarctação aórtica, observaram um gradiente de pressão entre a aorta proximal e distal de 56 mmHg, 100% de aumento do volume diastólico final (VDF). Estes autores observaram um aumento transitório da expressão da Serca2a e da captação de Ca^{2+} em vesículas de RS após 6 horas de estenose aórtica. Estes parâmetros retornavam ao nível basal 72 horas após a cirurgia. Nediani *et al.*(2000) sugerem que estes resultados expressem um mecanismo adaptativo inicial em resposta à sobrecarga pressórica.

Oito semanas após a coarctação aórtica, Qi *et al.*(1997) ainda não constataram em miócitos de ratos redução da expressão da Serca2a, embora estes apresentassem prolongamento do relaxamento. Após 16 semanas de coarctação aórtica, McCall *et al.*(1998) constataram, em miócitos de ratos, diminuição da expressão da Serca2a e da enzima codificada por ela, mas não observaram redução correspondente da taxa de captação de Ca^{2+} em homogenado de miocardio. Estes autores observaram também diminuição do mRNA codificador de NCX, mas sem correspondente redução do transporte de Ca^{2+} dependente de Na^+ através do sarcolema, o que implica que nesta fase, este mecanismo compensatório ainda não foi acionado.

Estudos realizados em miócitos humanos provenientes de pacientes com insuficiência cardíaca também apontaram para diminuição do mRNA da Serca2a, redução da captação de Ca^{2+} pelo RS e diminuição da capacidade de encurtamento dos miócitos (Davia et al, 1997). Em casos de insuficiência cardíaca, há relatos de aumento compensatório do mRNA que codifica o NCX, acompanhado de aumento de 2 a 3 vezes desta proteína (Kent *et al.*, 1993; Flesch et al, 1996; Menick *et al.*, 1996; Studer *et al.*, 1997; Menick *et al.*2002).

Convém lembrar que os processos adaptativos e a modulação da função cardíaca são constantes ao longo da instalação e desenvolvimento da hipertrofia em resposta à sobrecarga pressórica, e estes processos também influenciam a sinalização da hipertrofia.

Segundo Nakayama *et al.*(2003), a redução dos níveis de Serca2a retroalimenta positivamente a sinalização da hipertrofia, na medida em que o Ca^{2+} deixa de ser captado pela *A-RS*, acumula-se no citosol e promove maior ativação da proteína quinase C (PKC), importante na sinalização da hipertrofia, o que contribui para agravamento da hipertrofia e redução adicional dos níveis de SERCA2a (Takeishi *et al.*, 1999).

Uma outra correlação entre *A-RS* e as vias de sinalização da hipertrofia foi feita por Ho *et al.*, (1998). Estes autores observaram que animais animais transgênicos hiperexpressando o *Ha-Ras* (oncogene ativador da ERK) (Fuller *et al.*, 1998) apresentavam hipertrofia cardíaca com redução do

pico do transiente de Ca^{2+} , prolongamento deste transiente e redução da expressão da Serca2a. Eles atribuíram os efeitos observados à redução da Serca2a mediada pela ativação da via de sinalização Raf-MEK-ERK³ (Raf, quinase e oncogene; MEK, *mitogen-activated protein kinase kinase* e ERK, *extracellular regulated kinase*).

Os resultados acima apontam que a modulação de transportadores de Ca^{2+} é um possível mecanismo adaptativo acionado em resposta à sobrecarga pressórica. Em nosso estudo, pretendemos verificar se a participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento de miócitos altera-se em animais submetidos à sobrecarga pressórica aguda induzida por oclusão da aorta e correlacionar estas informações com a expressão (mRNA) de algumas proteínas envolvidas na homeostasia de Ca^{2+} . Pretendemos também estudar a resposta contrátil destes miócitos a variações de estímulo inotrópico, i.e. da concentração de cálcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$); pois mudanças no *trigger* I_{Ca} , dependente da $[\text{Ca}^{2+}]_o$, podem fornecer informações sobre a eficiência do ECC e/ou evidenciar possíveis disfunções (McCall *et al.*, 1998, Ito *et al.*, 2000).

³ A *Raf* é o primeiro elemento da clássica cascata citoplasmática Raf-MEK-ERK que transmite sinais de crescimento da *Ras* ativada na membrana plasmática até os fatores de transcrição no núcleo, seu papel no controle da proliferação celular é bem estabelecido (Busca *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS:

Este estudo teve como objetivos avaliar em miócitos ventriculares de rato durante a instalação da hipertrofia ventricular induzida por sobrecarga pressórica o transporte de Ca^{2+} durante o relaxamento e a função contrátil sob os seguintes aspectos:

- contribuição relativa dos transportadores de Ca^{2+} – ATPase de Ca^{2+} do RS, NCX e transportadores *lentos* (ATPase de Ca^{2+} do SL e *uniporter* mitocondrial) – para a remoção deste íon do citosol durante o relaxamento.
- resposta contrátil do miócito a variações da $[\text{Ca}^{2+}]_o$.
- variação da carga de Ca^{2+} do RS em resposta à variação da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_o$.
- atividade espontânea e perda de Ca^{2+} do RS durante a diástole.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos:

3.1. ANIMAIS:

Foram usados ratos Wistar, machos (8 a 15 semanas), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, cujo biotério é credenciado pelo *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS). Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas coletivas forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada (10 animais/gaiola até a sexta semana de idade; a partir desta idade, 5 animais /gaiola). As gaiolas eram de polipropileno e tinham tampas de arame galvanizado. Os animais recebiam água filtrada e ração autoclavável *Labina* (Purina, Paulínia, SP) *ad libitum*, eram mantidos à temperatura de 19 a 21 °C e submetidos a ciclos de iluminação de 12 horas com luz fluorescente.

Após a oitava semana de vida, os animais foram transportados para o biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da UNICAMP, onde foram mantidos antes e após a cirurgia, sob condições ambientais semelhantes. Antes da cirurgia de coarctação aórtica, eram mantidos de 4 a 5 animais por gaiola; após a cirurgia, eram mantidos no máximo 2 animais/gaiola durante 2 ou 7 dias, até o sacrifício do animal.

3.2. COARCTAÇÃO AÓRTICA E GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os animais foram submetidos a coarctação aórtica conforme descrito por Franchini *et al.* (2000) e Torsoni *et al.* (2003b). Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma solução preparada a partir de soluções de ketamina (50 mg/ml, Ketalar®, Aché Laboratórios Farmacêuticos SA, Parke-Davis, São Paulo, Brasil) e diazepam (2 mg/ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil). A solução anestésica continha 30 mg de ketamina e 0,2 mg de diazepam por ml; a dose utilizada foi 0,22 ml/100 g de peso corporal, administrada por via intra-peritoneal. Após a anestesia, os animais eram fixados a uma mesa cirúrgica aquecida (38 °C) com auxílio de fita adesiva, e depilados na altura do segundo espaço intercostal. Em seguida, fazia-se assepsia do campo operatório com etanol 70%. As patas dianteiras eram fixadas à mesa cirúrgica na altura da cabeça do animal, de modo a permitir o acesso ao segundo espaço intercostal esquerdo. Com o auxílio da tesoura, perfurava-se a pele na

altura do segundo espaço intercostal esquerdo (o acesso à aorta por esta via evita rompimento das membranas pleurais e pneumotórax). O músculo era cuidadosamente pinçado para evitar hemorragia, e em seguida, cortado e afastado. O timo também era afastado para se visualizar a artéria carótida comum esquerda. Esta artéria era dissecada e afastada para o lado direito do tórax, de modo que a artéria aorta se deslocasse, acompanhando o movimento da artéria carótida, e ficasse exposta a região do arco aórtico, local de colocação de um *clamp* arterial de prata. A artéria aorta era pinçada (com a mão esquerda) e o *clamp* era colocado no arco aórtico entre as saídas da artéria carótida comum esquerda e tronco braquiocefálico (Figura 3.1). A abertura do *clamp* (confeccionado por Thais Holtz Theizen) era ajustada de acordo com o peso do animal (vide Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Espaço da abertura do *clamp* implantado para constrição da aorta proximal de ratos em função do peso do animal.

Peso Corporal (g)	Abertura do <i>Clamp</i> (mm)
200 –220	0,7
221 –240	0,8
241 –260	0,9

Após a colocação do *clamp*, as patas do animal, previamente fixadas à mesa cirúrgica, eram soltas, de modo a reduzir a tensão sobre músculos e pele do animal, facilitando a sutura. Para controle de infecções, usava-se o antibiótico *Pentabiótico Veterinário*® (0,2 ml i.m., Pfizer, São Paulo), logo após a cirurgia. Dois ou sete dias após a cirurgia, procedia-se à medição da pressão arterial dos animais e, a seguir, seu sacrifício, para isolamento de miócitos ou extração do ácido ribonucleico (RNA) do ventrículo esquerdo.

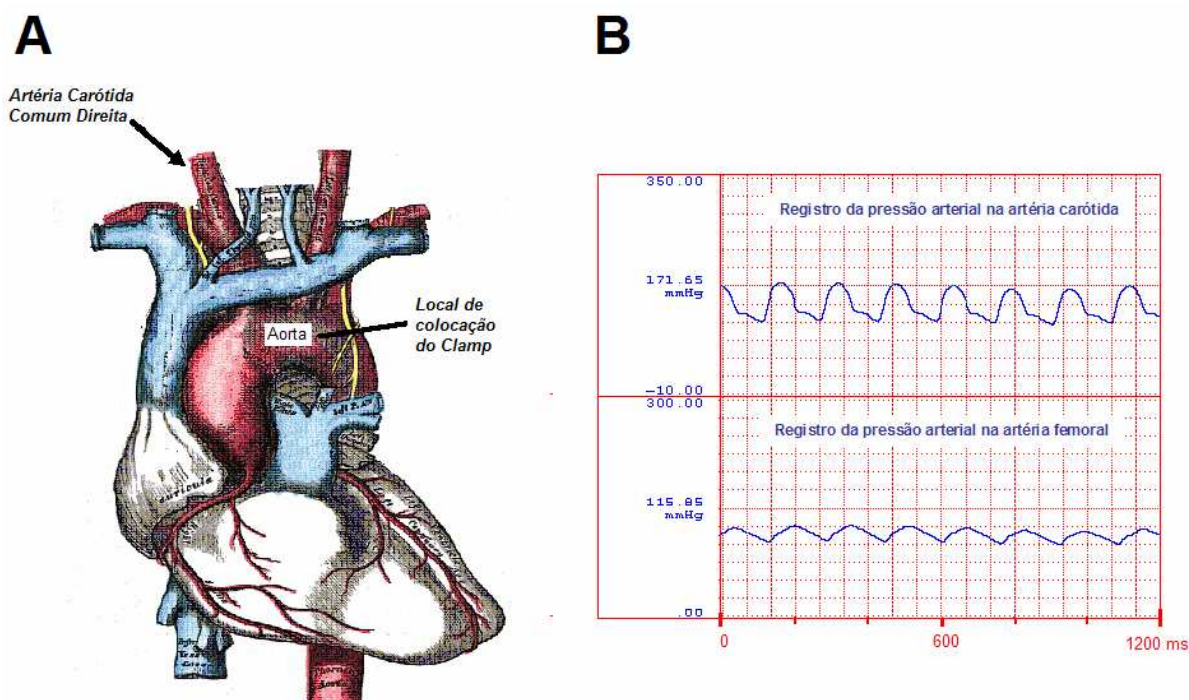


Figura 3.1: A: Localização da aorta com indicação do local de colocação do *clamp* aórtico (figura modificada de Gray, 1918); B: Registros simultâneos de pressão nas artérias carótida comum (registro superior; local de inserção de cateter indicado no figura A) e femoral (registro inferior) de um animal após 7 dias de coarctação aórtica. Note a diferença entre os valores sistólicos de pressão nas duas artérias.

Os animais *controles* (grupo *sham*) foram submetidos aos mesmos procedimentos (anestesia, manipulação cirúrgica, sutura), exceto pela colocação do *clamp* aórtico.

Os animais coarctados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Kleber Franchini do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, Depto. de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP. Os procedimentos cirúrgico e de medição de pressão arterial foram realizadas no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE, UNICAMP).

3.3. MEDICÃO DE PRESSÃO ARTERIAL:

Após decorridos 2 ou 7 dias a partir da cirurgia, os animais eram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/ kg de peso corporal (Abbot **Laboratórios** do Brasil, SP), para medições das pressões arteriais nas artérias carótida direita e femoral esquerda e posterior sacrifício.

O animal era colocado sobre uma mesa cirúrgica aquecida (38 °C) e estas artérias eram dissecadas nas regiões cervical e inguinal, respectivamente. Com o auxílio de fios cirúrgicos fixos nas extremidades distal e proximal do segmento arterial dissecado, distendia-se a artéria. O fio distal era amarrado, fechando a luz da artéria, e fixado à mesa, enquanto que no fio proximal, fixado à mesa cirúrgica de modo a distender a artéria, mantinha-se um laço aberto. Em seguida, fazia-se uma pequena incisão, através da qual inseria-se um catéter de polietileno (PE50: 0,58 de diâmetro interno e 0,99 mm de diâmetro externo, Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA), previamente preenchido com solução salina (NaCl 0,9%). Este cateter era fixado à artéria fechando-se o laço semi-aberto do fio proximal.

Em condições normais, a pressão sanguínea em grandes artérias tende a ser uniforme, devido à elasticidade das mesmas (Guyton, 1988). Por esta razão, a pressão pulsátil era medida somente na artéria carótida de animais controles, pois, na ausência de *clamp*, a pressão na carótida é semelhante àquela medida na artéria femoral. Em animais coarctados, os valores de pressão na artéria femoral foram semelhantes àqueles registrados na carótida dos animais controles (Resultados, Tabela 4.1). No entanto, a obstrução parcial da aorta causa aumento de pressão em regiões proximais ao *clamp*, o que resulta em diferença dos valores de pressão sistólica (*gradiente de pressão*) observados entre as regiões proximais (ex., artéria carótida) e distais (ex., artéria femoral) ao *clamp* (Figura. 3.1B).

A pressão sangüínea era medida através de catéteres preenchidos com solução salina, implantados nas artérias dos animais e conectados a um transdutor de pressão tipo *strain-gauge* BLPR (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EUA) previamente calibrado. O sinal de pressão era amplificado 100 vezes (General Purpose *Stemtech Inc.* GPA-4 Mod. 2; Quintron, Menominee Falls, WI, EUA) e adquirido por uma placa de conversão analógico-digital com 10 bits de resolução (DI-205 DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EUA) conectada a um computador tipo PC, para a monitoração e posterior processamento. Os sinais foram adquiridos em 300 Hz e analisados com os programas WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EUA) e Advanced Cudas (DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EUA), respectivamente. A partir do registro contínuo de pressão arterial, foram obtidos valores de pressão sistólica (máximo), pressão diastólica (mínimo) e pressão média (obtida a partir da integral do sinal a cada pulso), batimento a batimento. A frequência cardíaca era obtida a partir da média do número de picos de pressão por minuto. Os valores de pressão arterial e frequência cardíaca foram armazenados sob a forma de planilhas de dados para processamento posterior com o programa Advanced Cudas.

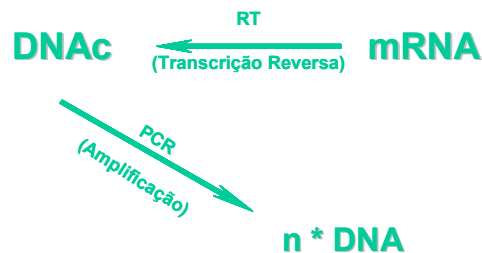
3.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO (mRNA) PARA PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE DE Ca^{2+}

Os transportadores de Ca^{2+} no coração são proteínas, e sua função depende, entre outros fatores, de sua abundância, a qual é, em parte, determinada pelo nível de sua expressão genética. Proteínas são sintetizadas em ribossomas a partir de uma sinalização molecular específica, o mRNA, transcrito diretamente da cadeia de ácido desoxirribonucleico (DNA) que corresponde ao(s) gen(s) que codifica(m) a proteína (Griffiths *et al.*, 2000). Sequências de mRNA específicas para coordenar a síntese de determinadas proteínas constituem o primeiro elo na sinalização da síntese proteica, e conseqüentemente, a primeira alteração detectável no caso de modificação da expressão de proteínas. Por esta razão, estimamos os níveis relativos de mRNA específicos que codificam algumas proteínas envolvidas com a homeostasia de Ca^{2+} por meio do método semi-quantitativo da *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR), no nosso caso, precedida de *transcrição reversa* (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR).

A RT-PCR é uma técnica de biologia molecular usada para detectar de forma semi-quantitativa a expressão de genes por meio dos níveis de mRNA específicos em um tecido. Esta técnica baseia-se nas seguintes reações *in vivo*:



Na RT-PCR, o mRNA nativo do tecido sofre transcrição reversa (pela enzima transcriptase reversa, originária de retrovírus), gerando uma cadeia de DNA complementar (cDNA) que é amplificada em ciclos de polimerização em n (em geral, bilhões) de cópias, segundo as seguintes reações *in vitro*:



Neste estudo, foram comparados níveis de mRNA em ventrículos esquerdos de animais controles e coarctados 7 dias após a cirurgia (grupos *Sh7* e *Coa7*, respectivamente). A medição da pressão arterial foi realizada nos animais sob anestesia induzida por pentobarbital sódico (50 mg / kg; Abbot **Laboratórios** do Brasil, SP). Os animais foram em seguida sacrificados com uma overdose deste anestésico e seus corações foram retirados, os ventrículos esquerdos foram

dissecados e colocados em nitrogênio líquido, para processamento (maceração imediata e extração de RNA).

3.4.1. Extração e tratamento do RNA

Homogeinização: O protocolo utilizado foi descrito por Chomczynski *et al.* (1987). Os ventrículos esquerdos foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo, sendo em seguida homogeneizados no reagente Trizol[®] (Cat. No. 15596, Invitrogen Brasil, São Paulo). Este procedimento causa ruptura celular e liberação do conteúdo intracelular para o meio. Adicionou-se 1 ml de TRIZOL[®] para cada 100 mg de tecido. O TRIZOL[®] é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que mantém a integridade do RNA durante a lise celular.

Clareamento (opcional): Por se tratar de um tipo de tecido com grande concentração de proteínas, acrescentou-se ao processo de extração de RNA o "clareamento" da amostra, que consistia em centrifugação a 12.000 g por 10 minutos (4°C). Coletamos o sobrenadante, no qual o RNA encontrava-se suspenso. Descartou-se o *pellet* resultante, que contém DNA genômico, proteínas de alto peso molecular, membranas celulares e polissacarídeos.

Separação das Fases: O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e mantido em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck GmbH, Damstadt, Alemanha) na proporção de 0,2 ml/1ml Trizol[®], a amostra foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação a 12.000 g a 4°C, a suspensão ficou separada em três fases: a) uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA, denominada fase orgânica; b) uma interfase branca (anel branco) contendo proteínas; e c) uma fase superior, aquosa, incolor, abrangendo cerca de dois terços do volume total, contendo RNA.

Precipitação do RNA: A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, onde o RNA foi precipitado por incubação por 30 minutos com isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), na proporção de 0,5 ml/ 1ml de Trizol[®] empregado na homogeneização do RNA. Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação a 12.000 g por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, vemos o precipitado de RNA como um gel esbranquiçado semi-transparente.

Lavagem do RNA precipitado: O *pellet* de RNA foi ressuspenso em 1 ml de etanol 75% / 1ml de Trizol[®], e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o etanol foi descartado e o *pellet* foi submetido a uma leve secagem a temperatura ambiente.

Eluição e Quantificação do RNA: O *pellet* foi eluído em 50 µl de água DEPC (solução aquosa de dietil pirocarbonato de sódio 0,1% (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA). O RNA foi quantificado com auxílio de um espectrofotômetro de laser. A pureza da amostra em solução foi verificada pela razão das absorbâncias em 260/280 nm, amostras cuja razão de absorbância em 260/280 nm fosse inferior a 1,6, apresentavam grande contaminação por proteínas e eram descartadas. O RNA foi quantificado pela sua absorbância em 260 nm. A concentração de RNA foi quantificada de acordo com a relação:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times \text{FD}$$

[RNA] = concentração de RNA (µg/ml)

A_{260} = Absorbância (em densidade óptica) em 260 nm

40: fator de conversão

(1 unidade de densidade óptica $\approx$ 40 µg/ml RNA)

FD = fator de diluição utilizado (normalmente 1:100)

Verificação da Integridade do RNA por eletroforese: Após extração e quantificação do RNA total obtido do ventrículo esquerdo, a integridade do mesmo foi avaliada pela integridade do RNA ribossômico (rRNA). Amostras de 1 a 5 µg de RNA total foram aplicadas sobre gel desnaturante (0,5 g de agarose, 36 ml de água DEPC, 5 ml de solução aquosa de ácido 3-N-morfolin-propansulfônico (MOPS, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 9 ml de formaldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) e submetidas a uma diferença de potencial de 100 V (DC) por 20 minutos para visualização das bandas 28S e 18S. Estas bandas correspondem às massas moleculares das 2 subunidades do rRNA, assim referidas de acordo com sua taxa de sedimentação após centrifugação em gradiente de densidade de sacarose (Azad 1978; Mori *et al.*, 1978). As alíquotas de RNA foram aplicadas ao gel juntamente com brometo de etídio (10mg/ml, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e azul de bromofenol (Promega, Madison, WI, EUA), que permitia a visualização das bandas.

A integridade do rRNA foi confirmada pela definição das bandas 28S e 18S (e ausência de rastros no gel), e foi considerada como indicação de integridade também do mRNA. Somente as amostras de RNA que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

3.4.2. Transcrição Reversa do mRNA

Dado que a PCR é utilizada para amplificar fragmentos de DNA, e não RNA, torna-se necessária a conversão das moléculas de mRNA extraídas do tecido em moléculas de DNA (cDNA) que sejam complementares às de mRNA (i.e., com seqüência de bases correspondentes). As amostras de RNA obtidas pelo protocolo anteriormente descrito foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa* (Superscript II®, Invitrogen Brasil, São Paulo). O meio de reação consistia de:

- 6 µg de RNA descontaminado
- 5 µl de *Primer poli dT*® (Invitrogen Brasil, São Paulo)
- água ultra-purificada qsp 30 µl

A solução foi mantida em banho seco a 70 °C por 10 minutos, sendo então adicionados:

- 5 µl de ditioneitol 0,1M (DTT, Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 10 µl de *First Strand Buffer*® (375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 250 mM Tris-HCl, pH 8,3, Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 2,5 µl de dNTP (Invitrogen Brasil, São Paulo), que consiste da mistura dos seguintes desoxirribonucleotídeos: trifosfato de adenosina (dATP), trifosfato de timidina (dTTP), trifosfato de guanosina (dGTP) e trifosfato de citidina (dCTP).

As amostras foram então incubadas a 42 °C por 2 minutos, ao que se seguiu a adição de:

- 1 µl de transcriptase *Superscript II*® 200U/µl (Invitrogen Brasil, São Paulo)

Procedeu-se a nova incubação a 42 °C por 2 horas. A atividade da enzima foi inibida ao final da reação pelo aquecimento a 70 °C por 15 minutos. Após a transcrição em cDNA, 0,5 µl de RNase foram adicionados à amostra (para eliminar resíduos de RNA), que foi incubada a 37 °C por 30 minutos. O produto desta reação (cDNA) foi utilizado como substrato

(molde) para produção de cópias pela PCR (ciclos de reações específicas para a amplificação de uma determinada sequência-alvo de DNA).

3.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PCR é um método comumente utilizado para se obter grandes quantidades de um fragmento específico de DNA (i.e., contendo uma determinada sequência-alvo). As sequências-alvos no cDNA correspondem à mensagem genética (i.e., àquelas do mRNA a partir do qual o cDNA foi transcrito) para a síntese de uma determinada proteína. Portanto, procedeu-se à amplificação de somente cadeias de cDNAs correspondentes a cadeias de mRNA que codificam proteínas de nosso interesse.

A sequência-alvo a ser amplificada é identificada por *iniciadores* da reação (*primers*), que reconhecem parte desta sequência no cDNA por complementaridade de bases. Como a conformação espacial preferencial do DNA é de 2 cadeias complementares associadas (dupla fita), são necessários 2 *primers* (um conhecido como *sense*, e outro, como *antisense*) capazes de reconhecer uma determinada sequência-alvo em cada uma das fitas. Cada *primer* consiste de uma cadeia curta de desoxirribonucleotídeos (i.e., um oligonucleotídeo) com uma sequência de bases complementar àquela da cadeia de cDNA a ser amplificada, na região que delimita a sequência-alvo (flancos da sequência-alvo). Os *primers* hibridizam-se (i.e., associam-se por pontes de hidrogênio) aos flancos das sequências-alvos em cada cadeia do cDNA a ser amplificada. A hibridização dos *primers* aos flancos da sequência-alvo marca o local para início da síntese: o *primer sense* demarca a sequência para síntese no sentido 3'-5' da cadeia de cDNA, e o *primer anti-sense*, para a síntese no sentido inverso, isto é, 5'-3'. Na reação de PCR, a sequência-alvo é amplificada em bilhões de cópias complementares pela ação da enzima Taq DNA polimerase (enzima resistente a altas temperaturas, obtida da bactéria *Thermophilus aquaticus*). Esta enzima adiciona a cada *primer* os desoxirribonucleotídeos presentes no meio, em complementaridade à sequência de nucleotídeos da cadeia de cDNA (Griffith *et al.*, 2000).

A reação de PCR foi realizada em aparelho denominado termociclador (mod. PTC-100, RJ Research, Waltham, MA, EUA), que aquece e resfria alternadamente o meio de reação, favorecendo ciclos de amplificação. Cada ciclo é composto de três etapas (Figura 3.2):

- Desnaturação: processo de separação das cadeias que formam a dupla fita de DNA, por meio da elevação da temperatura a ~94 °C;

- Anelamento: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para $\sim 60^{\circ}\text{C}$ e os *primers* hibridizam-se (anelam-se), um em cada fita, na região dos flancos das respectivas seqüências-alvos;
- Extensão: nesta fase, eleva-se a temperatura para $\sim 72^{\circ}\text{C}$, para que a enzima Taq-polimerase posicione-se junto aos *primers* anelados à seqüência-alvo e inicie a duplicação da fitas de DNA (*fitas-molde*), utilizando os nucleotídeos que contêm as bases nitrogenadas complementares àquelas das fitas-molde.

Após o término de cada ciclo, todo o processo é repetido, desde a desnaturação até a extensão, por várias vezes (30 vezes em média) até que se obtenha uma quantidade razoável do cDNA amplificado.

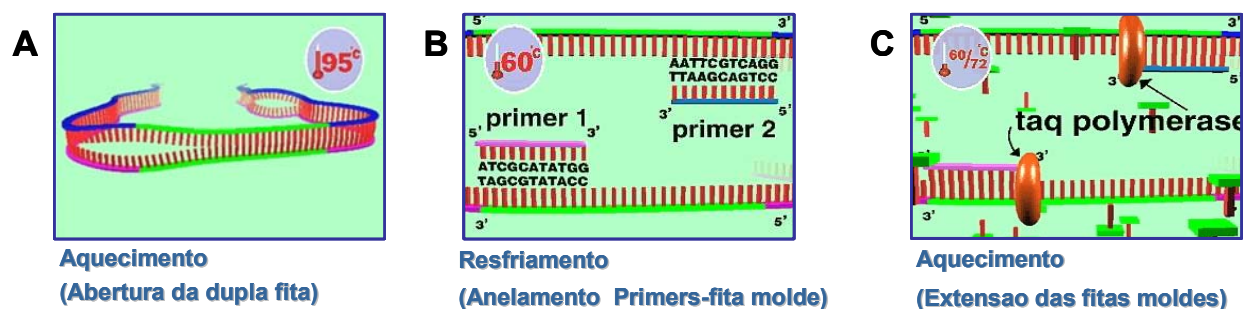


Figura 3.2. Esquema representativo das etapas que constituem cada ciclo de amplificação na reação de PCR. A) desnaturação; B) anelamento dos *primers* (rosa) à seqüência-alvo (verde) do DNA a ser amplificada; C) extensão da cadeia do *primer* (rosa) pela ação da enzima Taq Polimerase (anel vermelho) utilizando nucleotídeos livres (pequenas estruturas em marrom e verde) (figura modificada de Griffiths *et al.*, 2000).

Foram sintetizados *primers* específicos para reconhecer seqüências-alvos de interesse presentes em moléculas de DNA complementares às moléculas de mRNA que codificam a isoforma cardíaca da ATPase de Ca^{2+} do RS (Serca2a), fosfolambam (PLB), isoforma cardíaca do canal de liberação de Ca^{2+} do RS (RyR2), isoforma NCX1 do trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ e calsequestrina (Figura 3.3 e Tabela 3.2).

O meio de reação de amplificação do cDNA teve a seguinte composição:

- 5 µl de PCR Buffer 10x (Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 1 µl de dNTP *mix* 10 mM
- 2 µl do *primer sense* em solução com 10 µM, em água ultra-purificada (Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 2 µl do *primer anti-sense* (Invitrogen Brasil, São Paulo)
- 2 µg do cDNA transcrito
- 0,3 µl de *Taq-Polymerase*® (5U/µl, em solução composta de 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0,1 mM ácido etileno diamino-tetracético (EDTA, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 1 mM DTT, 0,5% Tween 20, 0,5% NP-40 and 50% glicerol, Invitrogen Brasil, São Paulo)
- Água ultra-purificada estéril qsp 50 µl.

A reação constituiu-se dos seguintes ciclos:

- uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos
- número variável de ciclos compostos de: a) etapa de desnaturação a 94 °C por 1 minuto; b) etapa de anelamento dos *primers* com a sequência-alvo do cDNA a ser amplificada (temperatura variável para cada *primer* por um minuto, vide Tabela 3.2); c) uma etapa de alongamento a 72 °C por 2 minutos.
- Após o término dos ciclos, foi adicionada uma etapa de alongamento a 72 °C por 5 minutos.

3.4.4. Eletroforese e Quantificação do Produtos da PCR

O material amplificado é aplicado sobre um gel de agarose (1%, contendo brometo de etídio, Invitrogen Brasil, São Paulo), à qual é aplicada uma diferença de potencial por um determinado período, para permitir a migração das cadeias de DNA, de acordo com sua massa (eletroforese). Ao final do processo, o gel apresenta bandas formadas pela deposição de diferentes espécies de DNA (i.e., cadeias com diferentes massas). A massa de cada banda permite identificar a respectiva espécie de DNA, enquanto que a densidade da banda é tanto maior quanto maior a abundância daquela espécie de DNA no material amplificado. A partir deste método, podemos

detectar variações na expressão genética de uma determinada proteína (i.e., estimada pela quantidade do mRNA correspondente presente na célula) pela comparação dos níveis do respectivo cDNA amplificado entre os diferentes grupos. Ou seja, quanto maior a quantidade de mRNA codificador de uma determinada proteína no tecido, maior será a quantidade de cDNA transcrita e, após um número fixo de ciclos de amplificação, maior será a quantidade de DNA produzida a partir das moléculas transcritas de cDNA.

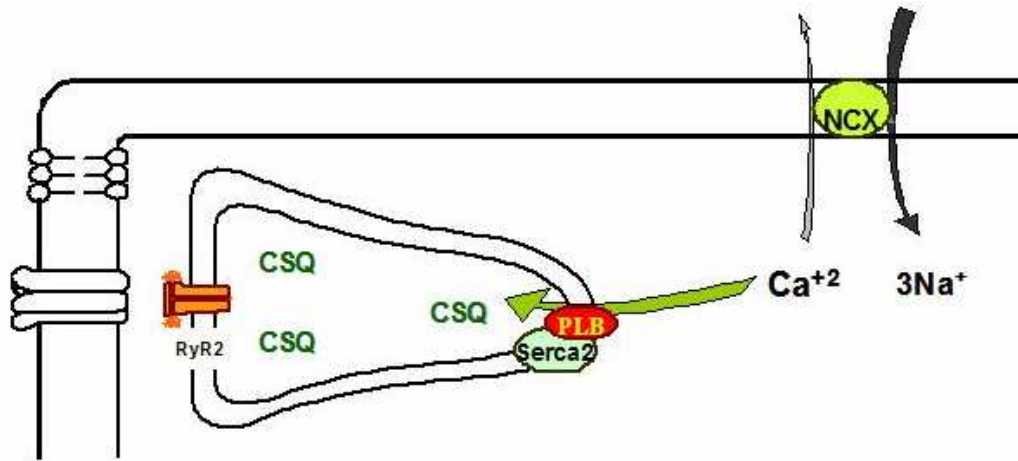


Figura 3.3: Proteínas cujo nível de expressão genética (mRNA) foi comparado entre os grupos Sh7 e Coa7 por meio de RT-PCR. A ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), isoforma cardíaca Serca2a é responsável pela captação de Ca^{2+} para o RS e sofre controle negativo pelo fosfolambam (PLB). Este, por sua vez, quando fosforilado, dissocia-se da Serca2a, o que causa aumento da atividade desta. A calsequestrina (CSQ) proteína abundante no interior do RS, tem o papel de *buffer* de Ca^{2+} . O canal de liberação de Ca^{2+} do RS (RyR2) é a via de saída do Ca^{2+} do RS para o citosol durante a sístole e a diástole. O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) é responsável pela extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular, em troca da entrada de Na^+ . (Figura adaptada de Bers, 2001).

Tabela 3.2: *Primers sense (S) e antisense (AS) empregados (sintetizados por Invitrogen Brasil, São Paulo) e parâmetros (temperatura e número de ciclos de amplificação) utilizados na PCR.*

Gene		<i>Primers</i> (seqüência de oligonucleotídeos)	Produto ^a (bp)	Tm ^b (°C)	Número De Ciclos ^c	GenBank Access Code ^d	Referências
SERCA2a	S	5'-TCTGTCATTTCGGGAGTGGG-3'	156	51	27	X15635	Dr. Michael Porter ^e
	AS	5'-GCCCACACAGCCAACGAAAG-3'					
PLB	S	5'- TACCTCACTCGCTCGGCTAT- 3'	126	60	23	NM023129	Ganim <i>et al.</i> , 1992.
	AS	5'- GATGCAGATCAGCAG AGAC- 3'					
RyR2	S	5'-GTGTTTGGATCCTCTGCAGTTCAT- 3'	602	51	30	M59743	Bidasee <i>et al.</i> , 2001.
	AS	5'- AGAGGCACAAAGAGGAATTCGG- 3'					
CSQ	S	5'- ATAGGCTTTGTGATGGTG- 3'	1200	42	30	AF001334	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999.
	AS	5'- TACCGAGCACAGTGCTGCTT-3'					
NCX	S	5'-AATGAGCTTGGTGGCTTCACA- 3'	826	61	30	U70033	Reinecke <i>et al.</i> , 1997.
	AS	5'-CCGCCGATACAGCAGCAC-3'					
β-actina	S	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3'	400	45	25	NM031144	Nadruz et al., 2004
	AS	5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'					

a) Produto: seqüência de cDNA amplificada, com tamanho expresso em número de pares de bases (*base pairs*) de nucleotídeos.

b) Tm (*melting temperature*): temperatura usada para favorecer o anelamento dos *primers* com a seqüência-alvo da fita molde do cDNA.

c) número de ciclos de amplificação

d) *GenBank access code*: número do código de acesso aos genes descritos no banco de genes do *National Institute of Health* (NIH): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

e) comunicação pessoal

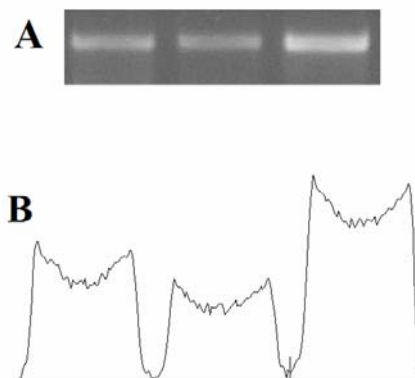
No primeiro poço de cada gel aplicamos uma escala padrão de pesos moleculares (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Cat. no. 12308-011, Invitrogen, São Paulo), que usamos para posterior identificação das bandas de nossas amostras. Tanto o *ladder* quanto cada uma das amostras aplicadas aos poços do gel foram misturadas a uma solução de azul de bromofenol (corante usado para posterior visualização das bandas eletroforéticas, 1 µl / poço). Durante a eletroforese, o gel permaneceu imerso em tampão TAE 1x durante aplicação de um potencial de 120 V (36 mA) por 20 a 30 minutos, em cuba para eletroforese (Bio-Rad, Richmond, VA, EUA).

A imagem do gel com suas bandas eletroforéticas foi adquirida por um sistema de documentação de géis, AlphaDigiDoc (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, EUA). Este sistema consistia de um transiluminador de luz ultravioleta (UV), uma câmara escura e uma câmera digital (DC-290, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA) acoplada a um microcomputador do tipo PC (Pentium 100 MHz, Compaq, Brasil), carregado com o programa AlphaDigiDoc. O transiluminador incidia radiação UV (254 nm) sobre o gel, permitindo a visualização das bandas eletroforéticas de DNA coradas por brometo de etídio. A imagem do gel era adquirida por uma câmera fotográfica digital na câmara escura. A imagem digitalizada era armazenada no microcomputador para posterior análise e quantificação.

As áreas das bandas eletroforéticas a serem comparadas entre os grupos experimentais eram quantificadas com o auxílio do programa *Scion Image*[®] (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>. A figura 3.4 ilustra o *plot* da área das bandas eletroforéticas (número de pixels).

Figura 3.4: Quantificação do produto de PCR.

A) Foto mostrando corte de gel com bandas eletroforéticas de CSQ referentes à amplificação de amostras dos grupos *Sh7*, (2 bandas da esquerda) e *Coa7* (banda da direita); B) Plot das áreas das bandas eletroforéticas usado na quantificar das mesmas. Na abcissa, posição da banda eletroforética no gel; na ordenada, intensidade da mesma, dada pela área da mancha eletroforética (número de pixels).



Para evitar que a comparação da abundância de um dado produto de amplificação entre grupos experimentais seja influenciada por fatores independentes do nível de expressão genética (ex., diferenças entre reagentes e no grau de deterioração do RNA tecidual), foram tomados os seguintes cuidados:

- a) amostras dos grupos Sh7 e Coa7 foram submetidas a corrida eletroforética no mesmo gel;
- b) a quantidade de DNA amplificado referente às proteínas de interesse foi normalizada pela quantidade do DNA que codifica a β -actina (gene *housekeeper*, cuja expressão genética não se altera na hipertrofia ventricular – Ohtani *et al.*, 1997; Teramoto *et al.*, 2001 no mesmo grupo experimental, aplicado ao mesmo gel.

3.4.5. Preparo dos Reagentes

Primers (Invitrogen Brasil, São Paulo):

Os *primers*, fornecidos sob a forma liofilizada, foram suspensos em água ultra-purificada para se obter uma solução estoque 1 mM. Por ocasião do uso, eles foram diluídos em ultra-purificada para 10 μ M.

Gel de Agarose a 1% : 1g de agarose, 100 ml de TAE (Tampão Tris-Acético-EDTA), 1,4 μ l de brometo de etídio (10mg/ml)

dNTP mix 10 mM: 10 μ l de dATP 100 mM; 10 μ l de dTTP 100 mM; 10 μ l de dGTP 100 mM; 10 μ l de dCTP 100 mM; água DEPC qsp 100 μ l.

Tampão TAE 1x: Foi obtido por diluição 1:50 do Tampão Tris-acético-EDTA 50x, composto de: 242 g Tris Base Ultrol® (Calbiochem, La Jolla, EUA); 57,1 ml ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha); 100 ml EDTA 0,5M (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA).

3.5. ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES DE RATO

Miócitos foram isolados da parede ventricular esquerda por digestão enzimática (Bassani *et al.*, 1994a; Bassani & Bassani, 2002). Ainda sob anestesia profunda empregada para a medição da pressão arterial, o tórax do animal era aberto, seu coração era retirado e montado em um sistema para perfusão retrógrada através da aorta (montagem de Langendorff) a 37 °C. Uma vez montado, o coração era inicialmente perfundido com solução de Krebs-Henseleit (KH) contendo 0,5 mM de CaCl_2 e heparina (~33 U/ml) para remover o sangue residual da circulação coronária. A seguir, perfundia-se o coração com solução KH sem CaCl_2 . Após 4-5 minutos, collagenase tipo

I (0,25 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) e albumina sérica bovina (BSA, 0,25 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, EUA) eram adicionadas à solução, e a perfusão era continuada até que o coração ficasse flácido. Ao término da digestão enzimática, a enzima era lavada com solução de Tyrode CI contendo 0,2 mM CaCl_2 e 0,5 mg/ml de BSA.

Em seguida, o coração era retirado do aparelho de perfusão e dissecado. As paredes dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) eram pesados separadamente a fim de se estabelecer a razão entre suas massas (razão VE/VD). O passo seguinte consistia na fragmentação e dispersão do tecido ventricular com auxílio de uma pipeta de Pasteur, em um bequer contendo solução de Tyrode CI com 0,2 mM de CaCl_2 e 0,5 mg/ml BSA. Esta suspensão era recolhida em um tubo de centrífuga, e as células viáveis eram contadas. O procedimento era repetido com os fragmentos remanescentes do tecido. Em seguida, as células em suspensão eram lavadas repetidas vezes, e a concentração de CaCl_2 na solução de Tyrode era aumentada progressivamente a cada lavagem até que atingisse 0,5 mM.

A Figura 3.5 apresenta um miócito isolado obtido segundo o procedimento descrito acima.

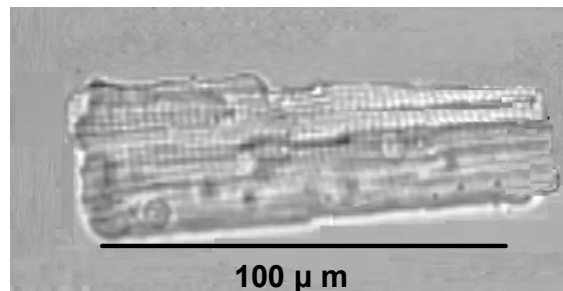


Figura 3.5: Miócito ventricular isolado de rato controle (*Sh 7*). Figura obtida por foto digital da imagem registrada com uma câmera digital.

3.5.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS EM EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS ISOLADOS

Solução de Krebs-Henseleit (K-H):

115 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 25 mM NaHCO_3 ; 2,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 11,1 mM glicose; concentração variável de cloreto de cálcio; pH 7,4 a 37 °C sob borbulhamento com 95% O_2 /5% CO_2 .

Solução de Tyrode CI:

140 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 2,4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 mM ácido [4-(2-hidroxietil)1-piperazina]etano-sulfônico (HEPES); 11,1 mM glicose; pH 7,4 ajustado com NaOH 1M a 23 °C.

Solução de Tyrode Normal (NT):

140 mM NaCl; 6 mM KCl; 1,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5 mM HEPES; 11,1mM glicose; 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. O pH foi ajustado para 7,4 a 23°C com NaOH.

Solução de Tyrode 0Na^+ , 0Ca^{2+} :

140 mM cloreto de colina; 1,5 mM KCl; 4,5 mM KOH; 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5 mM HEPES; 11,1 mM glicose; 1 mM etileno-glicol-bis(β -aminoetil-eter)-N,N,N',N' ácido tetracético (EGTA), pH 7,4 a 23°C.

Soluções de Cafeína

10 mM cafeína foram adicionados a NT (CafNT) ou solução de Tyrode $0\text{Na}^+0\text{Ca}^{2+}$ (Caf00). O sal foi dissolvido diretamente na solução.

Os sais foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA) e Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As soluções foram preparadas com água ultra-purificada (resistência 18,5 M Ω) obtida do sistema de purificação de água *Easy Pure UF* (Barnstead, Dubuque, Iowa, EUA) e eram mantidas sob refrigeração a 4 °C.

3.6. EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS ISOLADOS

A suspensão de miócitos era colocada em uma câmara para perfusão de células em regime de fluxo laminar (desenvolvida e construída no CEB/UNICAMP – PI 0302.403-2) cujo fundo consistia de uma lamínula. Esta lamínula era tratada com solução de colágeno 15 a 20 minutos antes da semeadura das células, a fim de facilitar adesão das células à lamínula. A câmara de perfusão era colocada sobre o estágio de um sistema de microscopia óptica, montado sobre uma mesa anti-vibratória, desenvolvido e construído no CEB/UNICAMP (Gomes, 1997). Os miócitos eram continuamente perfundidos com solução NT a 23 °C e estimulados eletricamente até que a amplitude de suas contrações (T_w) atingissem o regime estacionário. O descarte da solução de perfusão era feito a partir de uma saída da câmara de perfusão acoplada a uma linha de vácuo. As contrações dos miócitos eram evocadas por estímulos elétricos (estimulação por campo),

aplicados através de um par de eletrodos de platina, que consistiam de pulsos bifásicos tensão de intensidade 20% acima de limiar de excitação, com 5 ms de duração, a 0,5 Hz. Os eletrodos eram imersos na solução de perfusão e conectados a um estimulador elétrico (01581/97- CEB, UNICAMP). Além disso, contraturas eram evocadas pela rápida aplicação de cafeína (CafNT ou Caf00) na ausência de estimulação elétrica (Bassani *et al.*, 1992; 1994a).

A imagem dos miócitos era registrada por uma câmera digital de vídeo (CCD, Oriente, Manaus, AM) cuja saída encontrava-se conectada a um gravador de videocassete (VCR, mod. VC1494B, Sharp, Manaus, AM). A saída do VCR encontrava-se conectada a um Detector Analógico de Borda de Imagem em Vídeo (DBV), desenvolvido e construído no CEB, UNICAMP (PI 300.834-7) e usado para medir o encurtamento celular durante as contrações. O sinal do DBV era enviado para um monitor de vídeo e para um microcomputador (AT 486 DX4 100 MHz, Acer do Brasil Ltda., São Paulo, SP), via uma placa de conversão analógico-digital (CAD 1236, 12 bits de resolução, Lynx, São Paulo, SP). Os sinais eram adquiridos a 100 Hz e armazenados para posterior análise sob forma de arquivo com o auxílio de um programa (AqDados 4 - DOS, Lynx, São Paulo, SP). Quando necessário, os sinais foram filtrados por filtro passa-baixas de 50 Hz controlado pelo mesmo programa. Um osciloscópio digital (mod. TDS 210, 60 MHz, Tektronix Inc, Beaverton, OR, EUA) conectado à saída do DBV foi utilizado para monitoração dos sinais adquiridos e dos sinais do estimulador (vide Figura 3.6.).

Com o auxílio de uma grátícula micrométrica (10 μm /divisão), calibramos a relação entre deslocamento da borda do sinal de vídeo e saída em tensão fornecida pelo DBV (10 μM $\approx$ 100 mV), e estabelecemos uma escala graduada que fixamos à tela do monitor de vídeo. O comprimento de repouso dos miócitos era medido por esta escala. O encurtamento de pico das células durante contrações evocadas elétrica ou quimicamente (em regime de carga virtualmente nula) era tomado como a amplitude destas contrações.

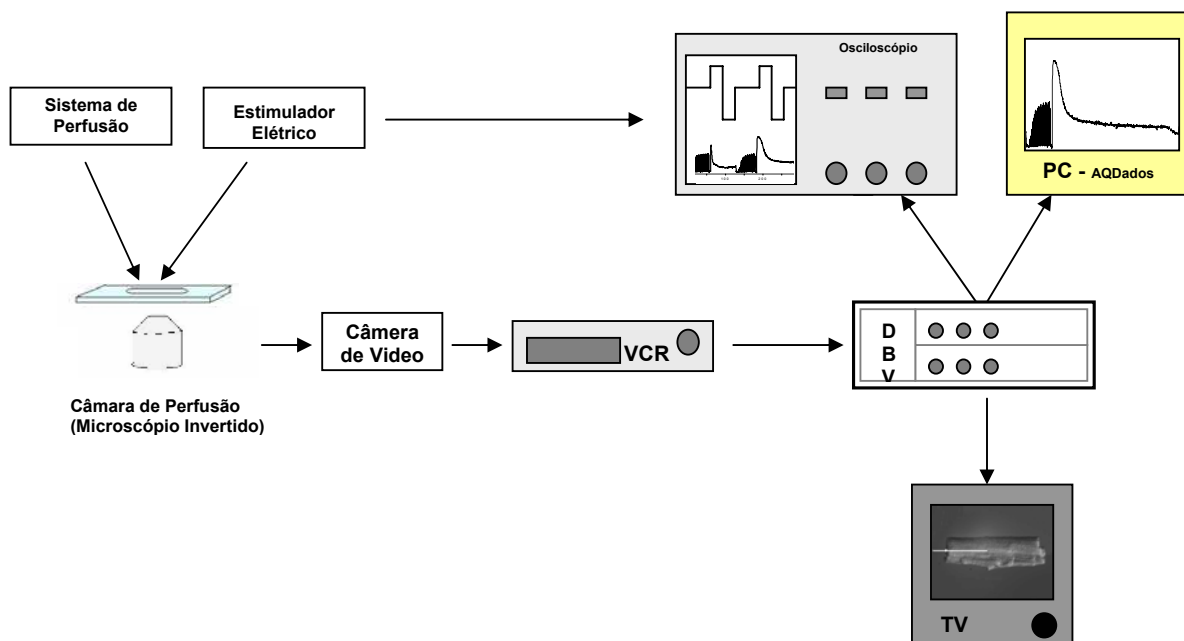


Figura 3.6: Diagrama em blocos representando a montagem utilizada para a medição do encurtamento celular de miócitos isolados. Na câmara de perfusão, os miócitos eram estimulados eletricamente por meio de eletrodos conectados a um estimulador elétrico, ou quimicamente, com cafeína, por meio de um sistema de perfusão. A imagem dos miócitos era registrada por uma câmara de vídeo conectada a um gravador de vídeo (VCR), cujo sinal de saída era enviado a um detector de bordas de sinal de vídeo (DBV), cuja tensão de saída era proporcional ao deslocamento da borda do miócito. Este sinal era adquirido com um programa para aquisição de dados (AqDados 4, Lynx, São Paulo, Brasil) através de um conversor A-D. O sinal era armazenado em um microcomputador sob a forma de arquivo e registrado simultaneamente em um osciloscópio. Um monitor de vídeo conectado à saída do DBV permitia a visualização do miócito e seu posicionamento com relação à janela de medição do DBV.

3.6.1. Estimativa das Participações Relativas de Transportadores de Ca^{2+} no Relaxamento Celular

Entende-se por *participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} na remoção do Ca^{2+} citosólico* a contribuição relativa do fluxo mediado por cada transportador – ATPase de Ca^{2+} do RS (*A-RS*), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX*) e transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial de Ca^{2+} , denominados *LENTOS*) – para o fluxo total de remoção de Ca^{2+} citosólico durante o relaxamento. Como o relaxamento depende da queda da concentração do

Ca^{2+} citosólico, utilizamos o curso temporal do relaxamento de diferentes tipos de contração para estimar a contribuição dos transportadores operantes neste processo.

Empregamos três tipos de contrações: a contração em resposta à estimulação elétrica (Tw), a contratura em resposta à solução de cafeína dissolvida em *Normal Tyrode* ($CafNT$) e a contratura em resposta à cafeína dissolvida em Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$ ($Caf00$) – que nos permitiram inibir progressivamente os transportadores durante a queda de $[Ca^{2+}]_i$ que resulta em relaxamento. Durante o Tw , todos os transportadores de Ca^{2+} ($A-RS$, NCX e $LENTOS$) operam em conjunto e contribuem para a queda de $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüentemente para o relaxamento. Durante contraturas de cafeínas, é induzida liberação de Ca^{2+} do RS, enquanto a acumulação de Ca^{2+} nesta organela é inibida, pois a cafeína mantém abertos os canais de liberação de Ca^{2+} do RS (Rousseau e Meissner, 1989), fazendo com que o fluxo resultante de recaptção de Ca^{2+} para o RS seja praticamente nulo. Por esta razão, durante a contratura $CafNT$, a queda de $[Ca^{2+}]_i$ deve-se somente ao NCX e aos transportadores $LENTOS$ (Bassani et al., 1992, 1994a). Empregando cafeína diluída em solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$, bloqueamos adicionalmente a extrusão de Ca^{2+} pelo NCX durante o relaxamento, pois esta depende do influxo de Na^+ extracelular (Blaustein & Lederer, 1999). O curso temporal do relaxamento da contratura eliciada por cafeína em solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$ ($Caf00$) pode ser então atribuído somente aos transportadores $LENTOS$ (Bassani et al., 1992).

Protocolo experimental: Os miócitos foram inicialmente perfundidos com solução de NT e estimulados eletricamente a 0,5 Hz por aproximadamente 15 minutos, até as contrações atingirem o regime estacionário (*steady-state*). Somente então as medições foram iniciadas.

A Figura 3.7 ilustra o protocolo utilizado (Bassani et al., 1992). Após estabilização das contrações a 0,5 Hz (Tw), a estimulação elétrica foi interrompida e foi aplicada solução NT contendo cafeína (10mM), que causou uma contratura por liberação de Ca^{2+} do RS. Após retorno do perfusato para NT sem cafeína, o RS foi novamente recarregado por meio de estimulação elétrica (Bassani et al., 1993a,b). Para bloqueio simultâneo da remoção de Ca^{2+} citosólico pela $A-RS$ e pelo NCX , cafeína foi aplicada em solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$, o que foi precedido por interrupção da estimulação elétrica e perfusão com solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$ por 20 segundos (para remoção de Na^+ e Ca^{2+} do meio extracelular, Bassani et al., 1992).

Durante o Tw , foram avaliadas a amplitude de contração do miócito (ΔL_{Tw}), a cinética de contração (t_{pTw} , tempo para a amplitude de contração de pico) e a cinética de relaxamento ($t_{1/2}^{Tw,\Delta L}$, tempo para 50% do relaxamento). Durante $CafNT$, medimos a amplitude de contração (ΔL_{CafNT})

e a cinética de relaxamento ($t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}$). Caf00 também foi avaliada quanto aos mesmos aspectos: amplitude da contratura (ΔL_{Caf00}) e cinética de relaxamento ($t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}$). Como a cafeína apresenta efeito direto sobre os miofilamentos, aumentando a sensibilidade destes ao Ca^{2+} (Wendt & Stephenson, 1983; Palmer & Kentish, 1994), a contratura por ela evocada apresenta dois componentes: um fásico (devido à liberação de Ca^{2+} do RS) e um tônico (devido ao seu efeito direto sobre os miofilamentos). Por esta razão, ao estudarmos a cinética de relaxamento da cafeína, consideramos apenas o componente fásico (Bassani *et al.*, 1993a).

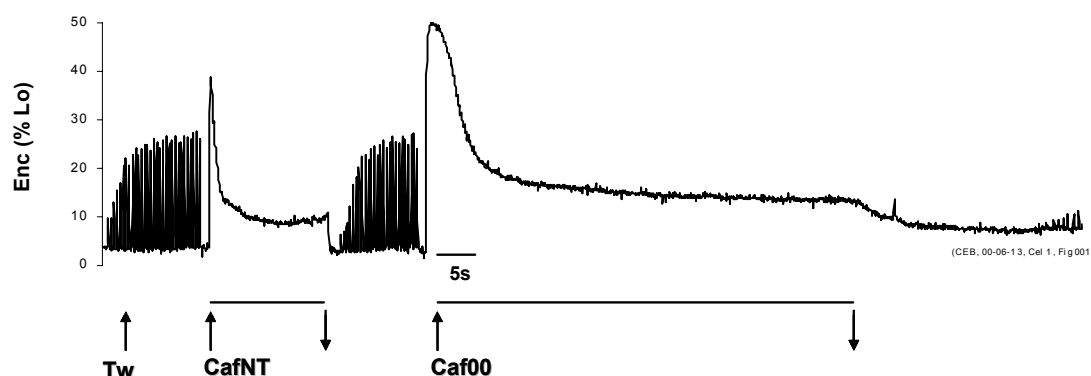


Figura 3.7: Protocolo experimental para estudo da cinética de relaxamento de miócitos cardíacos. Registro de encurtamento celular de um miócito ventricular de rato (ΔL , expresso como porcentagem do comprimento da célula em repouso, L_0) durante protocolo experimental empregado para avaliação da participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento. Inicialmente, o miócito foi estimulado eletricamente a 0,5 Hz até estabilização das contrações (Tw). Em seguida, a estimulação elétrica foi interrompida e aplicou-se solução NT contendo cafeína, que evocou uma contratura (CafNT), após a qual, cafeína foi removida e o RS foi novamente recarregado por meio de estímulos elétricos. Após estabilização das contrações, o miócito foi perfundido com solução de Tyrode $0Na^+0Ca^{2+}$ por 20 s (não mostrado), seguidos de mudança do perfusato para mesma solução contendo cafeína, a qual evocou uma contratura lenta (Caf00). Os períodos de aplicação de cafeína estão indicados por linhas horizontais e setas, abaixo do traçado.

Em conjunto, os valores de $t_{1/2}^{Tw, \Delta L}$, $t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}$ e $t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}$ possibilitam a análise da contribuição dos transportadores de Ca^{2+} para o relaxamento de um Tw, pois o relaxamento dos diferentes tipos de contração depende de diferentes conjuntos de transportadores de Ca^{2+} em operação (i.e., transportadores *LENTOS* em Caf00, *LENTOS* e *NCX* em CafNT, e *LENTOS*, *NCX* e

ATPase do RS em Tw). Assumimos aqui que a cinética do relaxamento mecânico acompanha aquela de queda de $[Ca^{2+}]_i$, e assim, que a participação relativa de cada transportador (i.e., RS-ATPase (PR_{A-RS}), NCX (PR_{NCX}) e *LENTOS* (PR_{LENTOS})) no relaxamento mecânico refletiria a contribuição do fluxo de Ca^{2+} mediado pelo respectivo transportador na remoção do Ca^{2+} citosólico (Bassani *et al.*, 1992, 1994 a,b).

Segundo a abordagem de Bassani *et al.* (1992), a razão entre os $t_{1/2}$ de relaxamento dos diferentes tipos de contração, fornecem uma boa aproximação da estimativa de PR_{RS} , PR_{NCX} , PR_{LENTOS} .

Em nosso estudo, empregamos as seguintes fórmulas para a estimativa de PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{LENTOS} no relaxamento:

$$PR_{A-RS} = 1 - \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}}$$

$$PR_{NCX} = \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}} - \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}}{t_{1/2}^{Caf^{00}, \Delta L}}$$

$$PR_{LENTOS} = \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}}{t_{1/2}^{Caf^{00}, \Delta L}}$$

A estimativa das participações relativas indicada acima foi estendida com a aplicação de um modelo baseado em análise compartimental, através do qual procuramos estabelecer uma relação entre a cinética de relaxamento do miócito e curso temporal do queda da $[Ca^{2+}]_i$ (vide Apêndice I).

3.6.2. Varição da Concentração Extracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$)

Para avaliar a reserva contrátil destes miócitos, analisamos o efeito inotrópico de variações da $[Ca^{2+}]_o$, segundo abordagem empregada por Ito *et al.* (2000) e Bassani *et al.* (2001).

O protocolo empregado está apresentado na figura 3.8. Um miócito em estudo era estimulado a 0,5 Hz até estabilização das contrações (ssTw), das quais se mediram a amplitude (ΔL_{Tw}) e o tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2}$). A seguir, aplicou-se uma pausa estimulatória de 1 min de duração, após a qual o miócito foi novamente estimulado até a estabilização das contrações. Em seguida, a estimulação elétrica foi interrompida, e o miócito foi perfundido por 20

segundos com solução de Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$, o que foi seguido pela aplicação rápida e mantida de 10 mM de cafeína dissolvida na mesma solução. A amplitude da contratura resultante (ΔL_{Caf00}) foi usada como índice de carga de Ca^{2+} do RS. Este protocolo foi repetido para três valores de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5 mM, 1 mM e 2 mM), cuja ordem de aplicação foi aleatória. Após a troca de soluções de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$, aguardava-se um período de 5 a 10 minutos para estabilização.

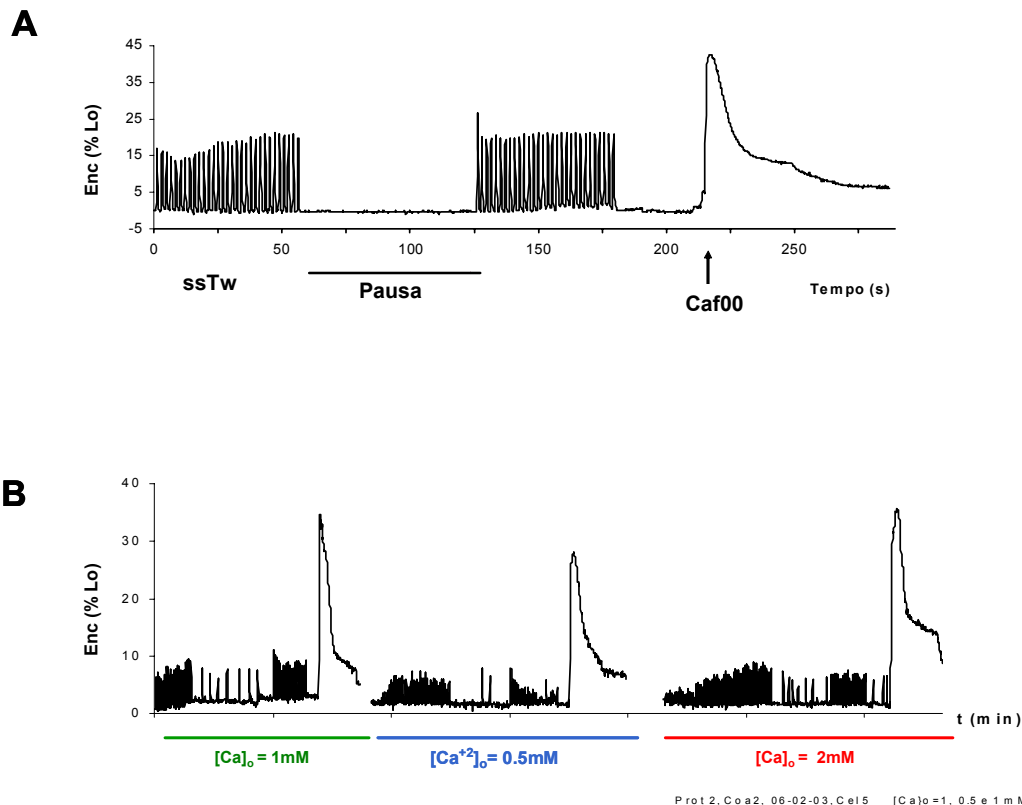


Figura 3.8: Traçados de encurtamento celular (expresso como percentual do comprimento de repouso, % L_o) obtido de miócitos ventriculares de rato, mostrando o protocolo experimental empregado na avaliação da resposta contrátil à variação da concentração de cálcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). A) Detalhe do protocolo experimental realizado para cada $[\text{Ca}^{2+}]_o$. O miócito foi estimulado eletricamente e a contração em regime estacionário foi avaliada (ssTw). A estimulação elétrica foi interrompida temporariamente, com a aplicação de uma pausa estimulatória de 1 min de duração (indicada por uma linha horizontal abaixo do traçado). Após estabilização, a estimulação elétrica foi novamente interrompida, a célula perfundida com solução Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ por 20 segundos, e a seguir foi aplicada cafeína. Também foi avaliada a amplitude da contratura evocada (Caf00). B) Resposta de um miócito a 3 diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5; 1 e 2 mM), aplicadas em ordem aleatória.

3.6.3. Estimativa de Variações do Conteúdo de Ca^{2+} do RS

Para detectar variações do conteúdo de Ca^{2+} do RS, comparamos a amplitude da Caf00, cujo procedimento de obtenção já foi descrito. Nestas condições, a inibição da NCX evita a abreviação do pico da contratura pela extrusão de Ca^{2+} (vide Bassani *et al.*, 1993a). A amplitude de contraturas produzidas por cafeína pode ser empregada como índice de carga do RS somente em observações pareadas, isto é, contraturas observadas em uma mesma célula em resposta a algum procedimento experimental (Bassani *et al.*, 1993b; Bassani & Bers, 1994a; Shannon *et al.*, 2002).

3.6.4. Transporte de Ca^{2+} Durante a Diástole

Diversos estudos abordam a perda de Ca^{2+} pelo RS durante a diástole (Bassani & Bers, 1995; Cheng *et al.*, 1996; Bassani *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 2000). Experimentos prévios realizados por nosso grupo mostravam uma correlação entre a concentração extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) e atividade espontânea (Bassani *et al.*, 2001).

Neste contexto, estudamos:

a) atividade contrátil espontânea do miócito (número de contrações espontâneas) durante uma pausa estimulatória com 1 min de duração, na presença de diferentes valores de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5; 1 e 2 mM) (Figura 3.8);

b) perda de Ca^{2+} do RS durante uma pausa com 3 min de duração, na qual a célula foi perfundida com solução de Tyrode sem CaCl_2 . Nesta condição, a extrusão pelo NCX do Ca^{2+} liberado do RS é termodinamicamente favorecida (Bassani & Bers, 1994, 1995; Ferraz *et al.*, 2001). O protocolo para este experimento está apresentado na figura 3.9. Após estabilização das contrações sob estimulação elétrica, foi evocada uma Caf00 controle (que denominamos Caf001), para verificar a carga de Ca^{2+} do RS em *steady-state*. Após lavagem da cafeína, a estimulação elétrica foi retomada até nova estabilização, quando considerávamos que a carga de Ca^{2+} do RS havia retornado ao seu nível inicial. A seguir, o miócito foi submetido a 3 minutos de pausa estimulatória na presença de Tyrode 0Ca^{2+} , ao fim da qual foi evocada uma Caf00 teste (Caf002), cuja amplitude representa o conteúdo residual de Ca^{2+} presente no RS após a pausa estimulatória. Este nível residual foi expresso pela razão de amplitude das 2 contraturas (Caf002/Caf001).

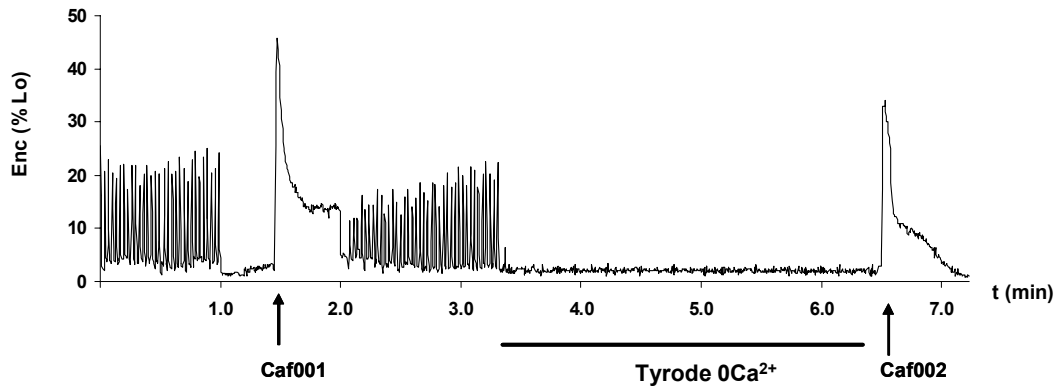


Figura 3.9: Protocolo para estudo da perda de Ca do RS durante a pausa estimulatória em solução de Tyrode sem Ca^{2+} (indicada por barra horizontal abaixo do registro). Registro de encurtamento celular (expresso como percentual do comprimento em repouso, % L_0) obtido em miócito ventricular isolado de rato. A amplitude de contrações evocadas por cafeína em solução de Tyrode $0\text{Na}^+, 0\text{Ca}^{2+}$, foi tomada como índice do conteúdo de Ca^{2+} do RS. A fração deste conteúdo remanescente no RS após a pausa foi estimada pela razão de amplitudes das contrações antes (Cf001) e depois da pausa (Cf002).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O limite de significância estatística considerado foi 5% ($p < 0,05$).

Utilizou-se análise de variância bifatorial para comparação dos seguintes dados: valores de massa ventricular e pressão arterial, dimensões de miócitos, valores relativos dos níveis de mRNA, dados de amplitude de contrações e de seu curso temporal, valores das participações relativas dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento celular, e razões de amplitude de contração de cafeína. Nesta análise, os fatores considerados foram o tipo de cirurgia e o tempo decorrido após a mesma. Mais especificamente, utilizou-se análise de variância bifatorial do tipo *nested* (que considerava o fator *tempo após a cirurgia* como uma variável embutida no fator *tipo de cirurgia*).

Os dados de encurtamento usados para o estudo da atividade contrátil e do número de contrações espontâneas diastólicas em resposta à variação de cálcio extracelular foram comparados por análise de variância trifatorial, na qual os fatores analisados foram o tipo de cirurgia, tempo após a cirurgia e $[\text{Ca}^{2+}]_o$.

Médias foram comparadas por meio de teste de *t post-hoc* apenas no caso de ocorrência de efeito de algum fator e/ou interação estatisticamente significativa acusada na análise de variância.

As amostras empregadas no estudo dos níveis de mRNA por RT-PCR foram analisadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Francia. Constando que estas não apresentavam distribuição normal, elas foram comparadas pelo teste *post hoc* de Mann-Whitney.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Intercooled STATA 7* (College Station, Texas, USA; Stata Manual, 1999).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE COARCTAÇÃO AÓRTICA

Uma das formas de se verificar *in vivo* o sucesso da coarctação aórtica (i.e., produção de sobrecarga pressórica arterial) é a constatação da existência de um gradiente entre as pressões arteriais sistólicas medidas na artéria carótida comum direita e artéria femoral esquerda.

Como pode ser visto na Tabela 4.1, a pressão sistólica na artéria carótida comum em animais coarctados foi cerca de 40 mm Hg maior do que a pressão na artéria femoral, o que caracteriza a eficácia da colocação do *clamp* aórtico para produzir sobrecarga de pressão e um gradiente sistólico (figura 4.1.A). Além disso, a pressão carotídea nestes animais foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a observada em animais após períodos equivalentes da cirurgia *sham*. O gradiente pressórico em todos os animais coarctados constituía um pré-requisito para sua inclusão nos grupos de animais coarctados (*Coa2* ou *Coa7*). A colocação do *clamp* aórtico não influenciou a pressão arterial média medida na artéria femoral de animais *Coa*, de modo que esta equiparava-se à pressão arterial medida na artéria carótida de animais *Sh*.

Embora o gradiente de pressão sistólica se estabelecesse imediatamente após a colocação do *clamp* aórtico; 2 dias de sobrecarga pressórica foram insuficientes para induzir hipertrofia ventricular esquerda detectável. A hipertrofia foi constatada somente 7 dias após a coarctação por um aumento de 40% da razão entre as massas do ventrículo esquerdo e direito (VE/VD) ($p < 0,05$) (Tabela 4.1.A; Figura 4.1B). Estes resultados estão em concordância com resultados previamente obtidos por (Scopasa *et al.*, 2003), que constatarem hipertrofia após 6, mas não após 2 dias de coarctação aórtica; e com resultados obtidos por Esposito *et al.* (2001), que constatarem hipertrofia após 7 dias de coarctação aórtica.

Analisando as dimensões dos miócitos, não observamos alteração do comprimento dos mesmos, mas observamos um aumento aproximado de 13 % da largura dos miócitos ($p < 0,05$). Se considerarmos que o miócito se aproxima de um cilindro, e a largura seja o diâmetro deste cilindro, tal aumento na largura corresponderia a um considerável aumento (42%) da área de secção transversal, e consequentemente do volume do miócito, já que não houve alteração do comprimento. Talvez o aumento da razão VE/VD possa ser atribuído em parte a este aumento (Figura 4.1 B, C e D).

A contribuição de outros fatores para o aumento da razão VE/VD – aumento de tecido intersticial e componentes vasculares (Canale *et al.*, 1986) – também deve ser levada em conta.

Tabela 4.1.A: Dados hemodinâmicos e anatômicos (média $\pm$ EPM, erro padrão da média) de animais controles (*Sh*) e submetidos à coarctação aórtica (*Coa*), após 2 e 7 dias da cirurgia: pressão arterial média, pressão arterial sistólica na artéria carótida direita, pressão arterial sistólica medida na artéria femoral, razão entre as massas do ventrículo esquerdo e ventrículo direito (VE/VD) e dimensões dos miócitos (comprimento diastólico e largura). O número de observações (ratos) encontra-se entre parênteses (Testes de significância: análise de variância bifatorial e teste *t post-hoc*: * $p < 0.05$: *Coa* vs *Sh* para o mesmo período após cirurgia; ♦ $p < 0.05$: *Coa7* vs os demais grupos).

Grupos	Sh2	Coa2	Sh7	Coa7
Peso Corporal (g)	249,5 $\pm$ 12,8 (16)	255,4 $\pm$ 6,5 (25)	290,7 $\pm$ 15,4 (18)	259,3 $\pm$ 10,7 (19)
Pressão Arterial Média (mmHg)	116,82 $\pm$ 0,65 (17)	117,8 $\pm$ 1,8 (25)	118,7 $\pm$ 0,4 (19)	119,1 $\pm$ 1,2 (23)
P. Sistólica Carótida (mmHg)	131,05 $\pm$ 0,5 (17)	168,32 $\pm$ 1,8 * (25)	132,10 $\pm$ 0,6 (19)	169,17 $\pm$ 0,8 * (23)
P. Sistólica Femoral (mmHg)	-----	124,94 $\pm$ 1,2 (25)	-----	139,93 $\pm$ 1,8 (23)
Gradiente Sistólico (mmHg)	-----	43,68 $\pm$ 1,2 (25)	-----	39,39 $\pm$ 0,9 (23)
VE/VD	1,52 $\pm$ 0,06 (14)	1,60 $\pm$ 0,11 (21)	1,38 $\pm$ 0,06 (14)	2,25 $\pm$ 0,07 ♦ (23)
Comprimento Celular Diastólico (μm)	96,3 $\pm$ 3,4 (19)	98,6 $\pm$ 3,5 (25)	102,9 $\pm$ 2,8 (20)	101,3 $\pm$ 2,7 (22)
Largura celular (μm)	25,2 $\pm$ 1,4 (19)	23,8 $\pm$ 1,0 (25)	24,9 $\pm$ 0,9 (18)	28,3 $\pm$ 1,1 ♦ (22)

Tabela 4.1.B: Análise de variância bifatorial das variáveis: peso corporal, pressão arterial, pressão sistólica na carótida, razão entre as massas dos ventrículos esquerdo e direito (VE/VD), comprimento inicial dos miócitos em repouso (L_0) e largura dos miócitos para os fatores *tipo de cirurgia* e *tempo após a mesma* (2 ou 7 dias). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	P
Peso corporal (g)	Cirurgia	1	3883,36	1,62	0,20
	Tempo	1	7963,68	3,33	0,07
	cirurgia x tempo	1	6648,62	2,78	0,09
	resíduo	74	2394,05		
Pressão Arterial Média (mmHg)	Cirurgia	1	7,5	0,21	0,64
	Tempo	1	52,3	1,45	0,23
	cirurgia x tempo	1	1,7	0,05	0,82
	resíduo	80	36,0		
P. Sist. Carótida (mmHg)	Cirurgia	1	28342	886,5	< 0,001
	Tempo	1	18,36	0,57	0,45
	cirurgia x tempo	1	1,19	0,01	0,93
	resíduo	80	31,96		
VE/VD	Cirurgia	1	4,07	30,69	< 0,001
	Tempo	1	2,14	16,11	0,02
	cirurgia x tempo	1	2,71	20,41	< 0,001
	resíduo	68			
Comprimento (L_0 , μm)	Cirurgia	1	0,01	0,00	0,99
	Tempo	1	393,68	1,85	0,17
	cirurgia x tempo	1	70,27	0,33	0,56
	resíduo	82	212,88		
Largura (μm)	cirurgia	1	15,13	0,56	0,45
	tempo	1	123,91	4,58	0,03
	cirurgia x tempo	1	120,46	4,45	0,03
	resíduo	80	27,03		

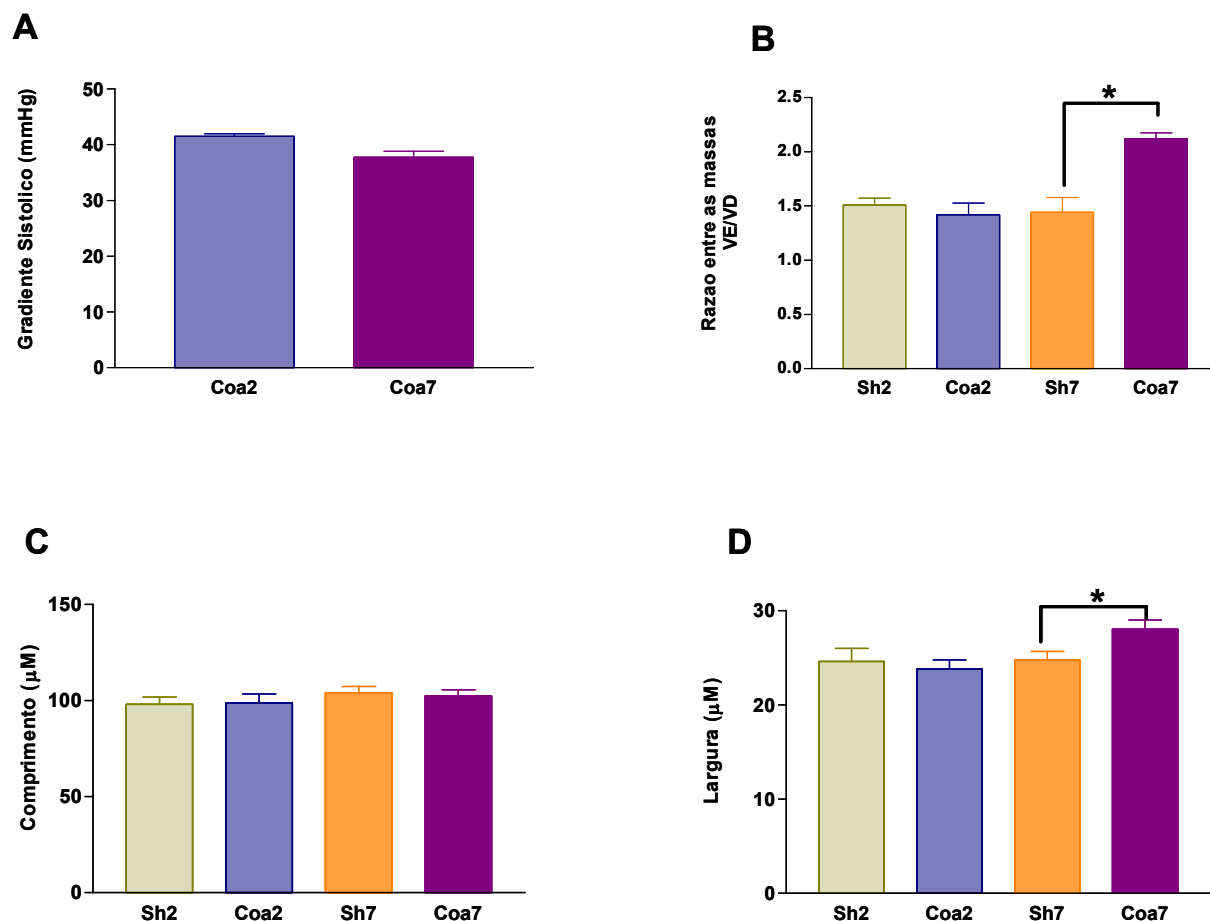


Figura 4.1: A) Gradiente entre as pressões sistólicas medidas nas artérias carótida e femoral nos animais dos grupos *Coa*; B) índice de hipertrofia (razão de massas das paredes ventriculares esquerda e direita, VE/VD); C) e D) comprimento diastólico e largura de miócitos ventriculares esquerdos, respectivamente (vide dados da Tabela 4.1; barras representam médias, linhas verticais representam o erro padrão da média - EPM). Resultados significantes da análise de variância bifatorial e teste *t post hoc* foram indicados como: * $p < 0.05$: *Coa7* vs *Sh7* (Vide Tabelas 4.1.A e 4.1.B).

4.2. NÍVEIS DE mRNA PARA PROTEÍNAS RELACIONADAS A TRANSPORTE DE $[Ca^{2+}]_i$

Experimentos de RT-PCR foram empregados para determinar de modo semi-quantitativo a expressão de gens que codificam proteínas envolvidas com a homeostasia de Ca^{2+} no ventrículo de animais dos grupos Sh7 e Coa7. Os gens cujas expressões foram estudadas foram:

- a) Serca2a: isoforma cardíaca da ATPase de Ca^{2+} do RS, *A-RS* (Misquita et al., 1999);
- b) fosfolambam (PLB): proteína associada a A-RS, que atua como um inibidor da mesma (Chu e Kranias, 2002). Quando PLB é fosforilado – i.e., em resposta a estimulação β -adrenérgica e ativação da PKA (Bers, 2001) –, ele se dissocia da *A-RS*, o que remove a inibição desta. Devido ao fato que a taxa de captação de Ca^{2+} pelo RS depende da abundância tanto de A-RS, quanto de PLB, expressamos nossos resultados também pela razão Serca2a/PLB (Ren *et al.*, 2003).
- c) NCX1: isoforma cardíaca do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) presente no sarcolema, responsável pela extrusão do Ca^{2+} para o meio extracelular. Há indícios de alteração da expressão deste transportador sob certas condições patológicas como hipertrofia, insuficiência cardíaca e infarto (Studer *et al.*, 1994; Litwin e Bridge, 1997; McCall *et al.*, 1998; Sipido *et al.*, 2002).
- d) RyR2: isoforma cardíaca do monômero (receptor de rianodina, RyR) formador do canal de liberação de Ca^{2+} do RS (CLCR). Este canal é um tetrâmero, cuja abertura e liberação de Ca^{2+} é controlada tanto do lado citosólico quanto do lado luminal do RS. Do lado citosólico, a liberação de Ca^{2+} por este canal é ativada pelo próprio Ca^{2+} , que desencadeia o processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) (Fabiato 1983, Wier e Balke, 1999). Do lado luminal do RS, o controle da abertura do CLCR e da liberação de Ca^{2+} parece ser função da concentração luminal de Ca^{2+} livre no RS (Bassani *et al.*, 1995a; Snyder *et al.*, 2000; Lukyanenko *et al.*, 2001) e da associação da calsequestrina (CSQ) com os CLCR através da proteína triadina (Beard *et al.*, 2002).
- e) CSQ: proteína do lúmen do RS, relacionada às funções de armazenamento e controle da liberação de Ca^{2+} desta organela. Devido à sua grande capacidade de ligação de íons Ca^{2+} (40-50 mol Ca^{2+} /mol CSQ), esta proteína atua como reservatório de Ca^{2+} no RS, determinando sua capacidade funcional. Após parcial ou totalmente depletado de Ca^{2+} , o RS é novamente carregado pela ação da *A-RS*. O aumento do nível de CSQ no RS aumenta a capacidade de armazenamento de Ca^{2+} no RS e de liberação a partir do mesmo, prolonga entretanto o tempo necessário para recarga do RS. Redução de CSQ produz o efeito oposto: reduz o estoque de Ca^{2+} , reduz o tempo necessário para a recarga do

mesmo, e aumenta a propensão à ativação prematura dos CLCR, mesmo por uma menor carga de Ca^{2+} , o que favorece liberação espontânea de Ca^{2+} e arritmias (Terentyev *et al.*, 2003).

Os experimentos de amplificação pela PCR foram precedidos por ensaios exploratórios para determinação do número ideal de ciclos de amplificação empregados na comparação dos níveis teciduais de cada um dos mRNA acima. O uso do número adequado de ciclos de amplificação permitiu comparar cDNAs provenientes dos diferentes grupos durante sua fase exponencial de sua amplificação e evitar comparações na fase em que a amplificação já havia atingido seu máximo (platô). O número de ciclos escolhido para cada amplificação correspondia ao número empregado para se obter 50% da amplificação máxima.

A figura 4.2 mostra exemplo de ensaios empregados na determinação do número de ciclos a serem usados na reação de PCR. O cDNA – obtido por transcrição reversa a partir do mRNA extraído de grupos *Sh7* e *Coa7* – foi submetido a um número variável de ciclos de amplificação –entre 18 e 40 ciclos – específica para cada oligonucleotídeo (*primer*). A amplificação obtida para cada número de ciclos foi normalizada pela amplificação máxima e expressa em gráfico como função do número de ciclos. A partir destes dados determinamos o número de ciclos a ser empregado na amplificação com cada par de *primer*. Por exemplo, para amplificação da *Serca2a* testamos 25, 27, 30 e 35 ciclos; para amplificação do *PLB*, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 30 e 35 ciclos (Figura 4.2.C.). O número de ciclos escolhido para a amplificação com cada um destes dois *primers* (*Serca2a* e *PLB*) foi respectivamente por 27 e 23 ciclos. Os números de ciclos empregados em cada uma das reações de PCR foram apresentado na Tabela 3.2.

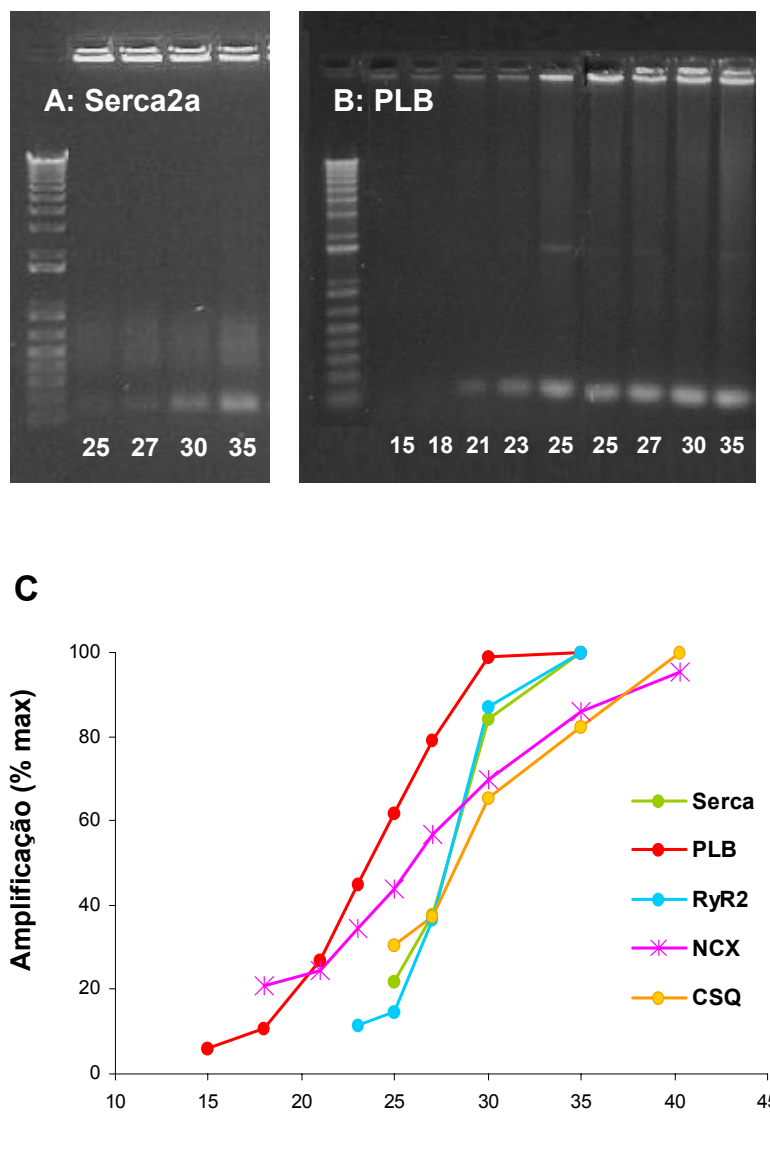


Figura 4.2. Ensaios preliminares realizados para Serca2a, PLB, RyR2, NCX e CSQ para determinação do número de ciclos de amplificação empregado na comparação de Sh e Coa. A e B) Exemplo de géis empregados na determinação do número de ciclos a serem usados na reação de PCR: bandas eletroforéticas para Serca2a após 25, 27, 30 e 35 ciclos de amplificação (A), e para PLB com 15, 18, 21, 23, 25, 27, 30 e 35 ciclos de amplificação (B). Nestes casos, optou-se 27 e 23 ciclos para Serca2a e PLB, respectivamente (vide Tabela 3.2). C) Curvas de calibração para escolha do número de ciclos a ser usado em cada reação de amplificação.

Definido o número de ciclos de amplificação para cada par de *primer*, realizamos experimentos de PCR a partir de amostras dos grupos *Sh7* e *Coa7*. Nestes experimentos, observamos um aumento da expressão de Serca2a de aproximadamente 50% no grupo *Coa7*, com relação a *Sh7*, mas este aumento não foi significativo (embora o valor de *p* de 0,053 tenha sido bem próximo do limite de significância estatística). A expressão do PLB no grupo *Coa7* não difere estatisticamente da do grupo *Sh7*, mas sob o ponto de vista biológico apresenta uma redução que pode ser importante, pois Serca2a e PLB constituem uma unidade funcional na captação de Ca^{2+} para o RS. Por esta razão, avaliamos a razão entre a expressão destas duas proteínas (Serca2a/PLB) e esta mostrou-se aumentada em 157% no grupo *Coa7* com relação ao grupo *Sh7* ($p < 0,05$, Tabela 4.2, Figura 4.3.A e E). Este aumento da razão da mensagem para Serca2a/PLB é compatível com aumento da taxa de captação de Ca^{2+} pelo RS, caso seja acompanhado de aumento da síntese e função destas proteínas (Tabela 4.2).

Também estudamos a expressão de proteínas relacionadas à função de armazenamento de Ca^{2+} no RS e liberação de Ca^{2+} a partir do RS – processos mediados por CSQ e RyR2, respectivamente. Nossos resultados não apontam diferenças significativas na expressão de CSQ e RyR2 entre os grupos *Sh7* e *Coa7* (Tabela 4.2 e Figura 4.3B,C,D). Entretanto o NCX, quando avaliado por este método, apresentou um aumento de 69% de sua expressão muito próximo do limite de significância estatística ($p = 0,068$).

Tabela 4.2: Níveis estimados de mRNA codificadores de proteínas relacionadas à homeostasia de Ca^{2+} no ventrículo: Serca2a, PLB, RyR2, CSQ e NCX. Os dados representam média $\pm$ EPM da densidade das respectivas bandas eletroforéticas normalizada pela densidade da banda da β -actina (corrida no mesmo gel), em cada grupo experimental (vide Apêndice III para dados individuais). O número de amostras analisadas encontra-se entre parênteses. (* $p < 0.05$: *Coa7* vs *Sh7*, teste de Mann-Whitney para amostras com distribuição não normal).

mRNA	Produto (bp)	mRNA / mRNA β -actina		Razão $\frac{\text{Coa7}}{\text{Sh7}}$	P
		Sh7	Coa7		
Serca2a	196 bp	0,75 $\pm$ 0,12 (3)	1,15 $\pm$ 0,14 (5)	1,53	0,053
PLB	126 bp	2,43 $\pm$ 0,61 (4)	1,45 $\pm$ 0,14 (5)	0,59	0,221
Serca2a/PLB	--	0,40 $\pm$ 0,18 (3)	1,03 $\pm$ 0,15 (5)	2,57	0,025 *
CSQ	980 bp	1,61 $\pm$ 0,31 (2)	2,13 $\pm$ 0,73 (3)	1,32	0,564
RyR2	620 bp	1,45 $\pm$ 0,47 (2)	2,13 $\pm$ 0,85 (5)	1,46	1,00
NCX	826 bp	0,98 $\pm$ 0,18 (5)	1,68 $\pm$ 0,24 (6)	1,69	0,068
β -actina (area/1000)	400 bp	8,22 $\pm$ 2,16 (8)	8,71 $\pm$ 2,08 (13)	1,05	0,87

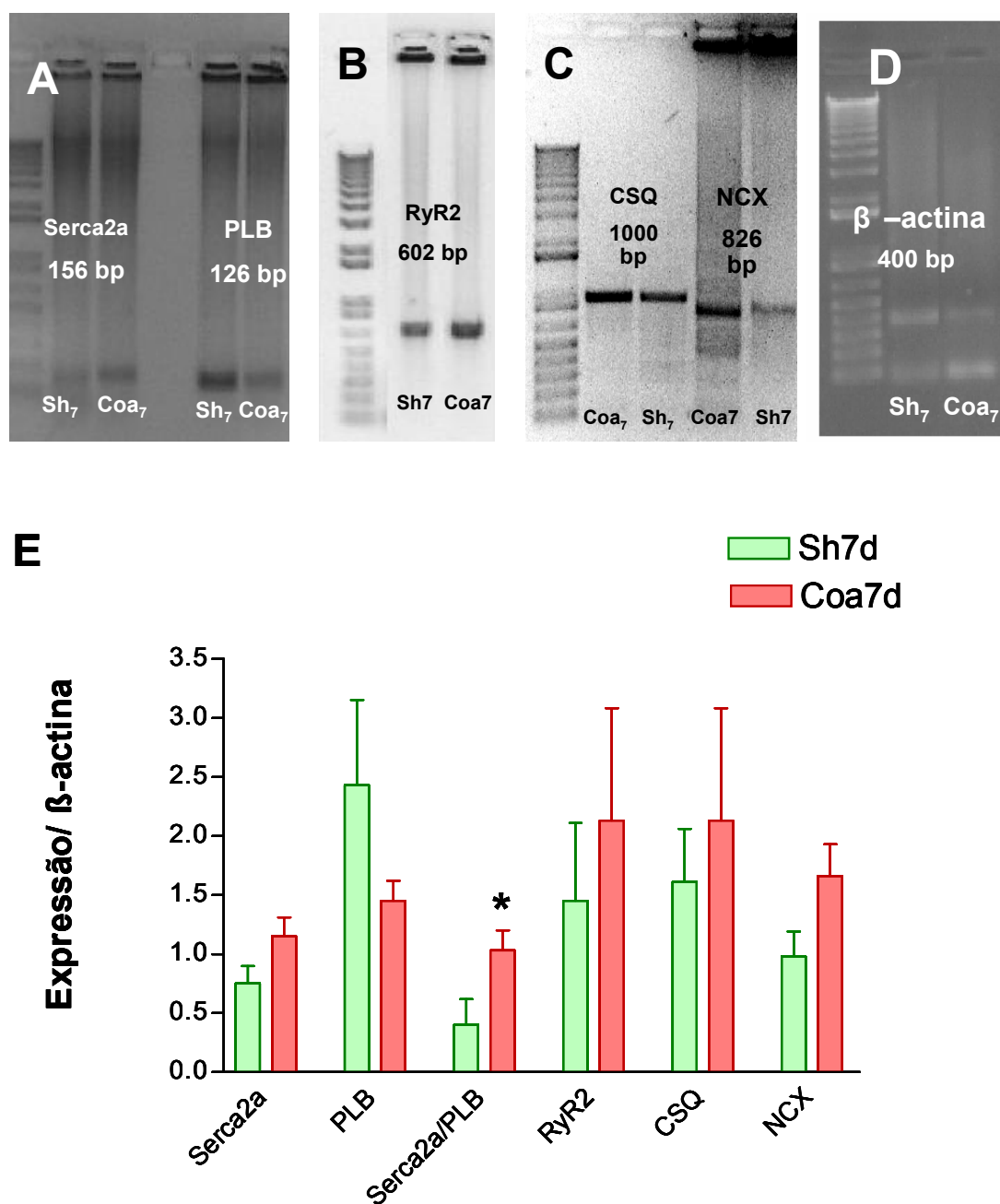


Figura 4.3. A a D: Bandas eletroforéticas dos produtos da PCR: amplificação do DNA complementar ao mRNA para Serca e PLB (em A), RyR2 (em B), CSQ (em C) e β -actina (em D) em ventrículos esquerdos de ratos 7 dias após coarctação aórtica (Coa7) ou cirurgia simulada (Sh7). D) Valores médios das áreas bandas de amplificação da PCR, normalizadas pela área da banda de β -actina na mesma preparação (dados da Tabela 4.2, barras representam médias, linhas verticais representam EPM) (* $p < 0,05$, teste Mann-Whitney).

4.3. PARTICIPAÇÃO RELATIVA DOS TRANSPORTADORES DE Ca^{2+} NO RELAXAMENTO

A contribuição relativa dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento de miócitos foi determinada por meio da razão entre os valores de $t_{1/2}$ do relaxamento de Tw, CafNT e Caf00 – diferentes tipos de contrações que nos permitiram isolar funcionalmente os transportadores. Estes diferentes tipos de contração foram caracterizados abaixo.

Paralelamente a estes resultados, apresentamos uma relação entre o encurtamento remanescente e a queda da $[\text{Ca}^{2+}]^i$ durante o relaxamento do Tw, CafNT e Caf00 e empregamos o resultado desta relação na análise de nossa estimativa a partir dos $t_{1/2}$ s do relaxamento (Apêndice II – Estudo do relaxamento de miócitos segundo a análise compartimental).

4.3.1. Caracterização dos Tipos de Contração

A função contrátil dos miócitos em regime estacionário foi analisada a partir de parâmetros do Tw, cujo relaxamento conta com a participação de todos os transportadores de Ca^{2+} . Os parâmetros do Tw analisados foram: amplitude de contração (ΔL_{Tw}), tempo para o pico da contração (t_{tpTw}), tempo para 50% do relaxamento do Tw ($t_{1/2\text{Tw}}$).

ΔL_{Tw} a 0,5 Hz na presença de 1 mM de Ca^{2+} extracelular não diferiu significativamente entre os grupos *Sh* e *Coa* (Tabelas 4.3. e Figura 4.4 A,B). A cinética de contração – avaliada pela variável t_{tpTw} – também não se mostrou significativamente alterada. No entanto, o curso temporal do relaxamento mostrou-se prolongado no grupo *Coa7* ($t_{1/2\text{Tw}}$ no grupo *Coa7* foi significativamente maior do que nos grupos *Sh7*, $p = 0,016$). Para a variável $t_{1/2\text{Tw}}$ detectou-se influência estatisticamente significativa do tipo de cirurgia, mas não do tempo decorrido após a mesma ou da interação entre estes fatores (vide tabela 4.3.A e B para resultados e análise de variância).

Contraturas de cafeína em solução de Tyrode normal (CafNT) foram empregadas para estudar o relaxamento sob o bloqueio seletivo do RS (Bassani et al., 1992, 1994a,b; Bassani e Bassani, 2002). A cafeína atua sobre os canais de liberação de Ca^{2+} do RS, aumentando a sensibilidade destes canais ao Ca^{2+} e favorecendo a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) mesmo em resposta a níveis diastólicos de Ca^{2+} (Bers *et al.*, 1987). Isto faz com que o Ca^{2+} recaptado seja perdido e o fluxo líquido de recaptção do Ca^{2+} seja nulo. Adicionalmente, empregamos cafeína dissolvida em solução de Tyrode $0\text{Ca}^{2+}/0\text{Na}^+$ (Caf00), que induz contraturas ainda mais prologadas, cujo relaxamento ocorre sob bloqueio do RS e do NCX na remoção do Ca^{2+} citosólico (e.g., Bassani et al., 1992).

Os valores de amplitude de pico (ΔL_{CafNT} e ΔL_{Caf00}) e do tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2\text{CafNT}}$ e $t_{1/2\text{Caf00}}$) de CafNT e Caf00, respectivamente, estão apresentados na Tabela 4.4.A e Figura 4.5. A análise de variância bifatorial não apontou efeito significativo dos fatores *tipo de cirurgia* e *tempo decorrido* após a mesma para as variáveis ΔL_{CafNT} e ΔL_{Caf00} . Quando aplicada ao $t_{1/2\text{CafNT}}$, a análise de variância bifatorial apontou significância apenas do efeito do fator *tipo de cirurgia* (Tabela 4.4.B). Comparando estes dados por meio de teste *t post hoc*, verificamos que $t_{1/2\text{CafNT}}$ do grupo *Coa7* era significativamente maior que o do grupo *Sh7* ($p=0,046$). Analisados por análise de variância bifatorial, os valores de $t_{1/2\text{Caf00}}$ não foram significativamente diferentes entre os diversos grupos.

Tabela 4.3.A: Parâmetros contráteis do Tw a 0,5 Hz: amplitude (ΔL_{Tw} , encurtamento evocado por estimulação elétrica expresso como % do comprimento celular diastólico, L_0), tempo para o pico de contração (ttp_{Tw}) e tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2}$) em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente). Dados estão apresentados como média $\pm$ EMP, e o número de experimentos (n) está indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ para Coa7 vs. Sh7, teste t *post-hoc*.

Grupos (n)	Sh2 (12)	Coa2 (15)	Sh7 (9)	Coa7 (10)
ΔL_{Tw} (% L_0)	11,9 $\pm$ 1,6	10,0 $\pm$ 1,1	10,6 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 1,5
ttp_{Tw} (s)	0,32 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02
$t_{1/2 Tw}$ (s)	0,19 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,03 *

Tabela 4.3.B: Análise de variância bifatorial das variáveis ΔL , ttp_{Tw} e $t_{1/2Tw}$ da contração evocada por estimulação elétrica a 0,5 Hz para os fatores *tipo de cirurgia* (Sh ou Coa) e *tempo decorrido após a mesma* (2 ou 7 dias). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	p
ΔL_{Tw} (% L_0)	Cirurgia	1	29,77	1,40	0,2438
	Tempo	1	11,71	0,55	0,4625
	cirurgia x tempo	1	0,93	0,04	0,8346
	resíduo	42	21,30		
ttp_{Tw}	Cirurgia	1	$5 \cdot 10^{-3}$	1,31	0,2597
	Tempo	1	$3 \cdot 10^{-3}$	0,85	0,3604
	cirurgia x tempo	1	$2 \cdot 10^{-3}$	0,57	0,4535
	resíduo	42	$3 \cdot 10^{-3}$		
$t_{1/2Tw}$	Cirurgia	1	$34 \cdot 10^{-3}$	6,28	0,0162
	Tempo	1	$3 \cdot 10^{-3}$	0,50	0,4830
	cirurgia x tempo	1	$9 \cdot 10^{-3}$	1,66	0,2050
	resíduo	42	$5 \cdot 10^{-3}$		

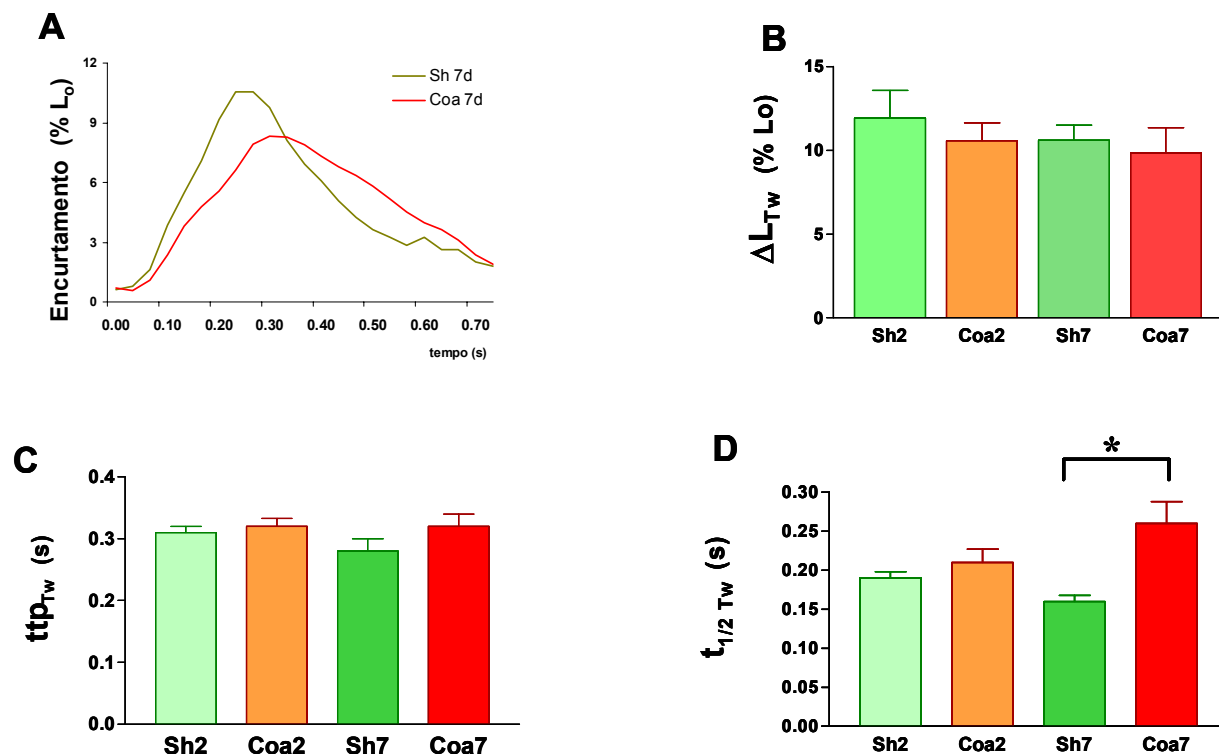


Figura 4.4: A) Registros de Tw obtidos em miócitos ventriculares de animais dos grupos *Coa7* e *Sh7*; B) Amplitude do Tw (ΔL_{Tw} , expressa como porcentagem do comprimento celular diastólico, L_0) a 0,5 Hz em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (*Sh2* e *Sh7*, respectivamente) e após coarctação aórtica (*Coa2* e *Coa7*, respectivamente); C) tempo para o pico da contração (ttp); e D) tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2 Tw}$) observado em animais do grupo *Sh2*, *Sh7*, *Coa2* e *Coa7*. Dados da Tabela 4.3 (barras representam médias, linhas verticais representam EPM). * $p < 0,05$, teste *t post hoc*.

Tabela 4.4.A: Amplitude (ΔL , expresso como porcentagem do comprimento celular diastólico, L_o) e valores de tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2}$) de contraturas evocadas por cafeína dissolvida em solução de Tyrode normal (CafNT) e $0Ca^{2+}/0Na^{+}$ (Caf00) em miócitos ventriculares isolados de ratos após 2 e 7 dias de cirurgia simulada (respectivamente *Sh2* e *Sh7*) e coarctação aórtica (respectivamente *Coa2* e *Coa7*). Resultados apresentados como média $\pm$ EPM; o número de observações (N) encontra-se entre parênteses. * $p < 0,05$: *Coa7* vs *Sh7* (teste *t post hoc*).

Grupos (n)	Sh2 (12)	Coa2 (15)	Sh7 (9)	Coa7 (10)
ΔL_{CafNT} (% L_o)	25,1 $\pm$ 2,3	24,3 $\pm$ 2,8	22,5 $\pm$ 2,6	19,4 $\pm$ 3,4
$t_{1/2}$ CafNT (s)	1,2 $\pm$ 0,13	1,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,09	1,45 $\pm$ 0,1*
ΔL_{Caf00} (% L_o)	31,2 $\pm$ 4,4	33,7 $\pm$ 3,4	28,3 $\pm$ 1,3	27,4 $\pm$ 2,7
$t_{1/2}$ Caf00 F (s)	5,7 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 0,8	6,3 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,9

Tabela 4.4.B.: Análise variância bifatorial das variáveis ΔL_{CafNT} , ΔL_{Caf00} , $t_{1/2CafNT}$ e $t_{1/2Caf00}$ para os fatores *tipo de cirurgia*, e *tempo decorrido após a mesma* (2 ou 7 dias). QM, quadrado médio; GL, grau de liberdade.

Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL							
	ΔL_{CafNT}				ΔL_{Caf00}			
	GL	QM	F	p	GL	QM	F	p
Cirurgia	1	30,55	0,33	0,5692	1	15,77	0,11	0,7373
Tempo	1	165,88	1,79	0,1884	1	257,46	1,86	0,1798
Cirurgia x tempo	1	14,30	0,15	0,6966	1	36,04	0,26	0,6124
Resíduo	42	92,80			42	138,45		
	$t_{1/2}$, CafNT (Fas)				$t_{1/2}$, Caf00 (Fas)			
	GL	QM	F	p	GL	QM	F	p
Cirurgia	1	1,077	4,92	0,0320*	1	25,7368	2,20	0,1451
Tempo	1	0,009	0,04	0,8336	1	1,3473	0,12	0,7358
Cirurgia x tempo	1	8,56.10 ⁻⁹	0,00	0,9998	1	0,2090	0,02	0,8942
Resíduo	42	0,2190			42	11,6773		

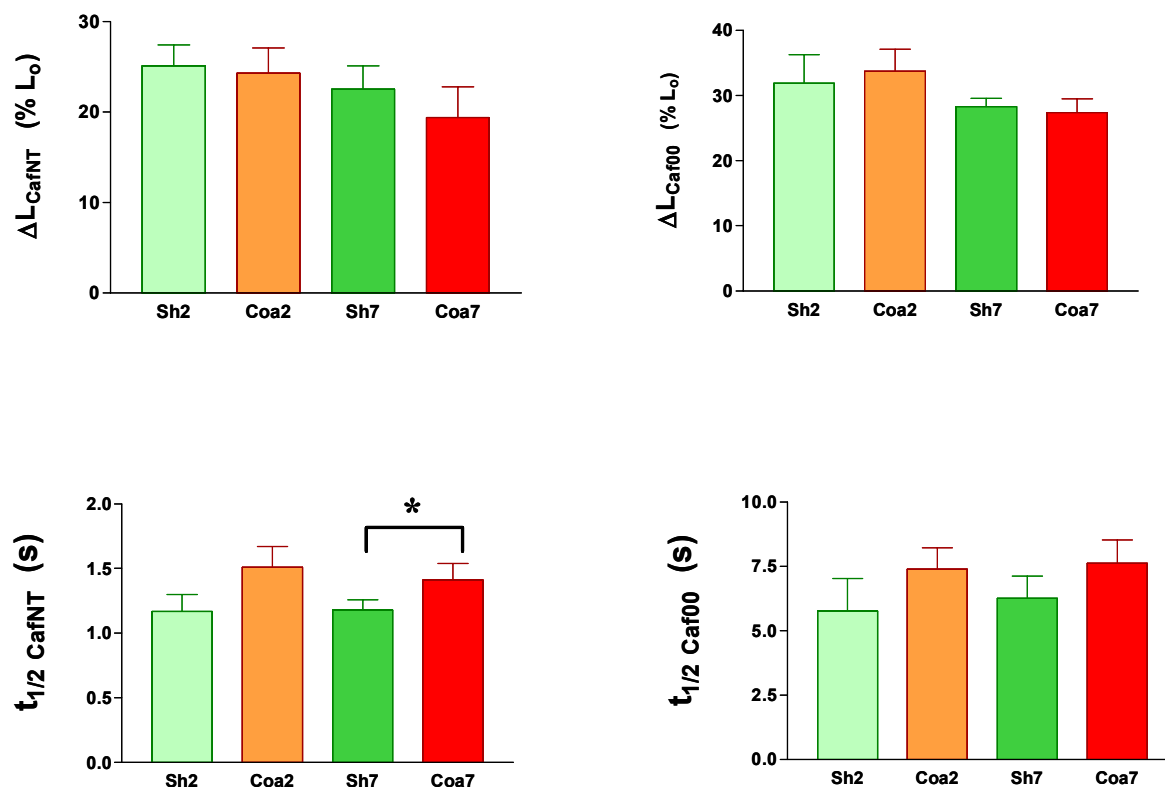


Figura 4.5: Contraturas evocadas por cafeína dissolvida em solução de Tyrode normal (CafNT) e $0\text{Ca}^{2+}/0\text{Na}^{+}$ (Caf00), em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente). A) e B): valores de tempo para 50% de relaxamento ($t_{1/2}$) de CafNT e Caf00, respectivamente. C) e D) Amplitude destas contraturas, respectivamente, expressa como porcentagem do comprimento celular diastólico (L_0). Dados da tabela 4.6. As barras verticais representam a média e as linhas representam o EPM. * $p < 0,05$ entre Coa7 e Sh7 (teste *t post hoc*).

4.3.2. Estimativa das Contribuições Relativas dos Transportadores de Ca^{2+} para o Relaxamento

(As estimativas e resultados apresentados nesta seção foram calculados conforme modelo matemático apresentado nos apêndices I e II.)

Como, em cada tipo de contração, o relaxamento depende de determinados transportadores atuantes (*i.e.*, dos transportadores lentos na Caf00; dos transportadores lentos e NCX na CafNT; e de todos os transportadores em conjunto no Tw), razões entre os valores de $t_{1/2}$ do relaxamento de diferentes tipos de contração permitem inferências sobre a contribuição parcial de cada transportador para a remoção de Ca^{2+} citosólico durante uma contração fisiológica, ou seja, sua participação relativa (PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{Lentos}) no relaxamento de miócitos (Bassani et al., 1992, 1994a,b). Os valores de $t_{1/2}$ de relaxamento para os 3 tipos de contração estão apresentados nas Tabelas 4.3 a 4.5. A figura 4.6 ilustra a marcante diferença do curso temporal de relaxamento destas contrações, ressaltada pela normalização da amplitude de pico.

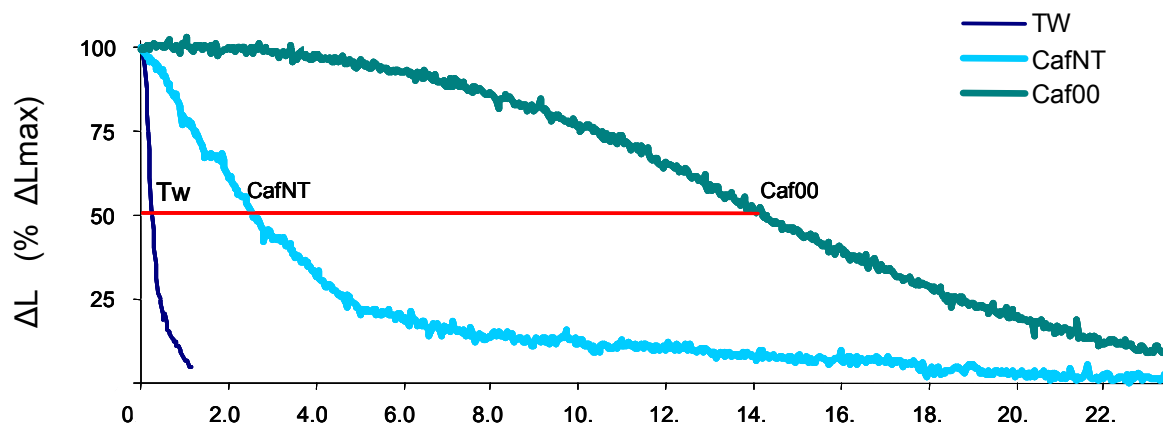


Figura 4.6: Registro do curso temporal do relaxamento de uma contração evocada por estimulação elétrica a 0,5 Hz (Tw, azul escuro), e de contraturas evocadas por cafeína em solução NT (CafNT, azul claro) e em solução de Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ (Caf00, verde) obtidos em miócitos de animais *Sh7*. A amplitude das contrações foi normalizada para 100% da amplitude de pico (ΔL). Em nossos resultados consideramos apenas o relaxamento fásico das contraturas de cafeína.

Os valores de PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{Lentos} foram estimados a partir dos valores de $t_{1/2}$ de relaxamento, conforme descrito no capítulo ‘*Materiais e Métodos*’ e nos apêndices I e II (Tabela 4.5 e figura 4.7).

A fim de avaliar se, em nossas condições experimentais a estimativa da participação relativa a partir de dados da cinética do relaxamento de miócitos era válida, procuramos formular um modelo que permitisse uma análise mais detalhada desta abordagem. Este modelo, baseado em análise compartimental, encontra-se apresentado no Apêndice I, e estabelece um fator de correção, que denominamos fator de *acoplamento químico-mecânico* – α . Este fator foi determinado experimentalmente para reduções fracionais de ΔL e $\Delta[Ca^{2+}]_i$ numa fase restrita do relaxamento das contrações estudadas (Tw, CafNT e Caf00) e corrige valores de $t_{1/2}$ do relaxamento ($t_{1/2}^{\Delta L}$) para valores de $t_{1/2}$ da queda da concentração citosólica de Ca^{2+} ($t_{1/2}^{[Ca^{2+}]_i}$). Como exposto no Apêndice I, o valor de α mostrou dependência do tipo de contração usada no isolamento funcional dos transportadores de Ca^{2+} ($\alpha_{(c)}$) determinados para Tw, CafNT e Caf00 foram respectivamente 0,9661; 1,1712 e 0,8090). A partir destes valores de $\alpha_{(c)}$, procedeu-se então à correção dos valores de $t_{1/2}$ para cada tipo de contração e para cada célula estudada, como mostrado abaixo:

$$PR_{A-RS}(g) = 1 - \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{CafNT}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)}$$

$$PR_{NCX}(g) = \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{CafNT}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)} - \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{Caf00}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g)}$$

$$PR_{LENTOS}(g) = \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{Caf00}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g)}$$

Os valores de PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{Lentos} , corrigidos por ‘ α ’ encontram-se na tabela 4.5. A figura 4.7 apresenta as PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{Lentos} antes (*inset*) e após correção por ‘ $\alpha_{(c)}$ ’.

A análise de variância bifatorial destes dados não apontou diferenças significativas entre os diversos grupos, seja devido ao tipo de cirurgia ou ao tempo decorrido após a mesma, antes ou após a correção por ‘ α ’ (tabela 4.5.B).

Independente da aplicação dos fatores de correção, as contribuições *relativas* dos transportadores permaneceram inalteradas para participações relativas estimadas a partir de ‘ $t_{1/2}$ ’ do encurtamento ($t_{1/2}^{\Delta L}$) corrigidos ou não pelos respectivos $\alpha_C(g)$ conforme fórmulas apresentadas acima (para PR_{A-RS} , o fator de correção foi $\frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{CafNT}(g)} = 0,8248$; para PR_{LENTOS} , foi $\frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{Caf00}(g)} = 1,1941$; e para PR_{NCX} , foram usados ambos os fatores de correção. Estes resultados apontam para a manutenção do balanço dos fluxos de remoção de Ca^{2+} do citosol durante o relaxamento. Entretanto, eles não descartam a possibilidade de um aumento conjunto destes fluxos em valor absoluto.

Tabela 4.5.A: Participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} (ATPase de Ca^{2+} do RS, *A-RS*; trocador Na^+-Ca^{2+} , *NCX*; e sistemas lentos) no relaxamento determinada em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente). Estão apresentados média $\pm$ EPM, calculados a partir de valores de $t_{1/2}$ de relaxamento não corrigidos e após correção destes valores por α (veja texto para detalhes). O número de experimentos está indicado entre parênteses.

Participação Relativa (%)		Sh2 (12)	Coa2 (15)	Sh7 (9)	Coa7 (10)
Não corrigida	A-RS	80,1 $\pm$ 3,1	82,8 $\pm$ 2,2	83,4 $\pm$ 1,8	80,3 $\pm$ 3,1
	NCX	14,3 $\pm$ 1,6	13,7 $\pm$ 2,0	13,1 $\pm$ 1,6	15,6 $\pm$ 2,9
	Lentos	5,6 $\pm$ 1,6	3,4 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,7
Corrigida por “ α ”	A-RS	83,6 $\pm$ 2,5	85,8 $\pm$ 1,8	86,3 $\pm$ 1,5	83,8 $\pm$ 2,6
	NCX	9,7 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 1,6	9,5 $\pm$ 1,3	11,4 $\pm$ 2,4
	Lentos	6,7 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,8

Tabela 4.5.B: Análise de variância bifatorial das variáveis PR_{A-RS} , PR_{NCX} , PR_{LENTOS} e $PR_{A-RS-\alpha}$, $PR_{NCX-\alpha}$, $PR_{LENTOS-\alpha}$ para os fatores tipo de cirurgia (*Sh* ou *Coa*) e tempo decorrido após a cirurgia (2 ou 7 dias). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	p
PR_{A-RS}	Cirurgia	1	1,4393	0,020	0,8947
	Tempo	1	0,4053	0,001	0,9440
	cirurgia x tempo	1	93,4363	1,150	0,2893
	resíduo	42	81,1174		
PR_{NCX}	Cirurgia	1	5,1414	0,10	0,7529
	Tempo	1	2,7728	0,05	0,8169
	cirurgia x tempo	1	27,7874	0,54	0,4653
	resíduo	42	51,1878		
PR_{LENTOS}	Cirurgia	1	12,0214	1,13	0,2930
	Tempo	1	5,5055	0,50	0,4832
	cirurgia x tempo	1	19,3148	1,82	0,1843
	resíduo	42	10,6000		
$PR_{A-RS-\alpha}$	Cirurgia	1	0,9793	0,02	0,8947
	Tempo	1	0,2758	0,00	0,9440
	cirurgia x tempo	1	63,5766	1,15	0,2893
	resíduo	42	55,1955		
$PR_{NCX-\alpha}$	Cirurgia	1	9,9021	0,33	0,5712
	Tempo	1	4,9406	0,16	0,6889
	cirurgia x tempo	1	7,4592	0,25	0,6230
	resíduo	42	30,3966		
$PR_{LENTOS-\alpha}$	Cirurgia	1	17,1097	1,13	0,2930
	Tempo	1	7,5512	0,50	0,4832
	cirurgia x tempo	1	27,4903	1,82	0,1843
	resíduo	42	15,0874		

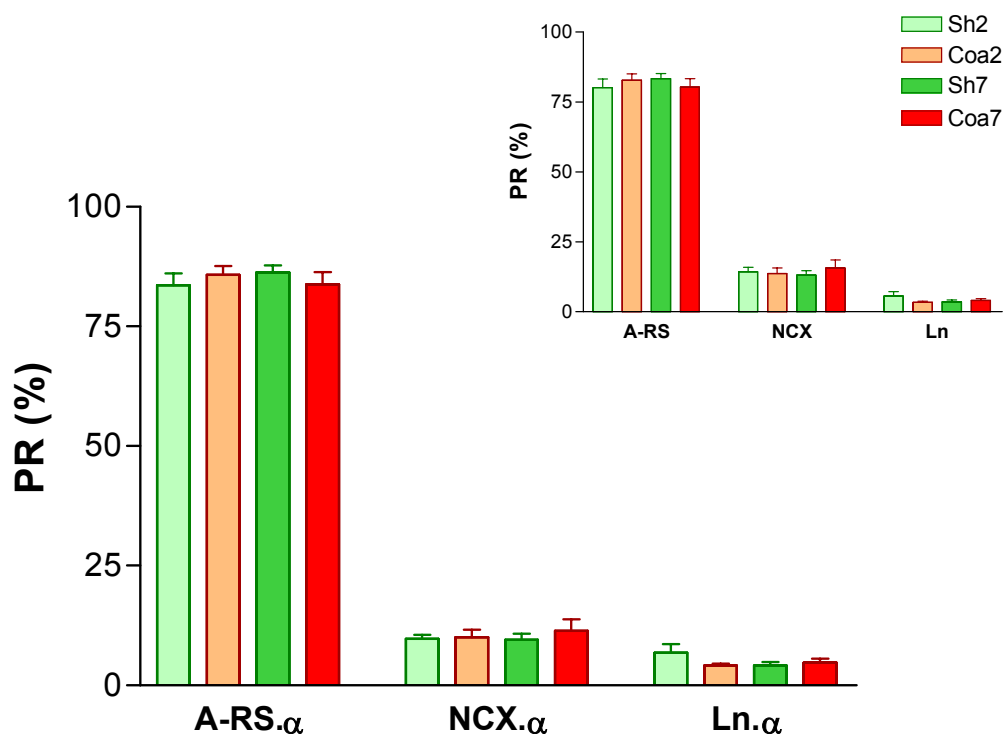


Figura 4.7. Participação relativa (PR) dos transportadores de Ca^{2+} (ATPase de Ca^{2+} do RS, A-RS; trocador Na^+ - Ca^{2+} , NCX; e sistemas lentos, Ln) no relaxamento estimada em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente), após correção valores de $t_{1/2}$ de relaxamento pelo ‘coeficiente de acoplamento químico-mecânico’ (α). *Inset:* Estimativa realizada sem a correção. Barras e linhas verticais representam médias e EPM, respectivamente (dados apresentados na Tabela 4.5).

4.4. RESPOSTA INOTRÓPICA À VARIAÇÃO DA $[\text{Ca}^{2+}]_o$:

4.4.1. Amplitude de contração em resposta a estímulos elétricos (Tw):

Em experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório (Bassani *et al.*, 2001), havíamos observado um aumento da amplitude do Tw em miócitos ventriculares de rato em resposta ao aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ entre 0,25 e 2 mM. Resultados obtidos por Ito *et al.* (2000) mostraram que miócitos ventriculares de ratos 7 semanas após estenose aórtica mostravam uma redução da resposta contrátil ao aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_o$, ou seja apresentavam menor reserva contrátil que miócitos de animais controles. Tendo em vista

estes resultados, consideramos relevante avaliar esta resposta na fase de instalação da hipertrofia ventricular, na faixa de $[Ca^{2+}]_o$ entre 0,5 e 2 mM.

A análise de variância trifatorial para a amplitude do Tw a 0,5 Hz evidenciou que a resposta inotrópica positiva ao aumento da $[Ca^{2+}]_o$ não pôde ser atribuído a alterações decorrentes da cirurgia, mas devia-se unicamente à $[Ca^{2+}]_o$ (Tabela 4.6.A e B). Quando normalizamos a amplitude do Tw obtida em diferentes $[Ca^{2+}]_o$ pela amplitude obtida em 1mM de $[Ca^{2+}]_o$, ficou evidente que o efeito inotrópico positivo foi semelhante em todos os grupos experimentais (Tabela 4.6.A e B; Figura 4.8). Tais resultados sugerem manutenção da resposta contrátil na fase de instalação da hipertrofia.

Tabela 4.6.A: Amplitude da contração (Tw) evocada por estimulação elétrica a 0,5 Hz na presença de diferentes concentrações de cálcio extracelular ($[Ca^{2+}]_o = 0,5, 1$ e 2 mM), obtida em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (*Sh2* e *Sh7*, respectivamente) e após coarctação aórtica (*Coa2* e *Coa7*, respectivamente). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. Para cada grupo, o encurtamento desenvolvido está apresentado como porcentagem do comprimento celular diastólico (% L_o) e também como porcentagem da amplitude desenvolvida a 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ (valores entre colchetes). O número de células analisadas está indicado entre parênteses, ao lado do nome de cada grupo; o número de observações (N) encontra-se entre parênteses.

$[Ca^{2+}]_o$ (mM)	Tw (% L_o) (% Tw em 1 mM $[Ca^{2+}]_o$)		
	0,5 mM	1,0 mM	2,0 mM
Sh2 (11)	5,9 $\pm$ 1,2 [64,5 $\pm$ 8,4]	9,3 $\pm$ 1,5 [100]	14,8 $\pm$ 1,8 [177,6 $\pm$ 20,7]
Coa2 (9)	5,0 $\pm$ 0,9 [48,8 $\pm$ 7,4]	9,6 $\pm$ 1,2 [100]	11,1 $\pm$ 1,3 [129,4 $\pm$ 16,9]
Sh7 (14)	3,9 $\pm$ 0,5 [42,4 $\pm$ 4,7]	9,3 $\pm$ 0,7 [100]	13,4 $\pm$ 1,4 [150,1 $\pm$ 18,6]
Coa7 (12)	3,8 $\pm$ 0,6 [41,9 $\pm$ 5,1]	9,3 $\pm$ 1,1 [100]	11,6 $\pm$ 1,0 [145,65 $\pm$ 25,2]

Tabela 4.6.B.: Análise de variância bifatorial da variável ΔL_{Tw} para o tipo de cirurgia, tempo decorrido após a cirurgia (2 ou 7 dias) e concentração de Ca^{2+} extracelular ($[Ca^{2+}]_o$). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	p
ΔL_{Tw} (% L_o)	Cirurgia	1	58,27	3,73	0,0557
	Tempo	1	9,25	0,60	0,4381
	$[Ca^{2+}]_o$	2	769,23	48,61	< 0,001
	Cirurgia x tempo	1	13,39	0,86	0,3564
	Cirurgia x $[Ca^{2+}]_o$	2	31,45	2,01	0,1379
	tempo x $[Ca^{2+}]_o$	2	9,99	0,64	0,5295
	cirurgia x tempo x $[Ca^{2+}]_o$	2	5,02	0,32	0,7259
	resíduo	132	15,63		
ΔL_{Tw} (% ΔL_{Tw} em 1mM de $[Ca^{2+}]_o$)	Cirurgia	1	4859,1624	2,70	0,1030
	Tempo	1	1502,7209	0,83	0,3629
	$[Ca^{2+}]_o$	2	119307,965	66,19	< 0,001
	cirurgia x tempo	1	3603,0211	2,00	0,1598
	cirurgia x $[Ca^{2+}]_o$	2	2454,2633	1,36	0,2599
	tempo x $[Ca^{2+}]_o$	2	733,9576	0,41	0,6664
	cirurgia x tempo x $[Ca^{2+}]_o$	2	1700,7878	0,94	0,3919
	resíduo	132	1802,6250		

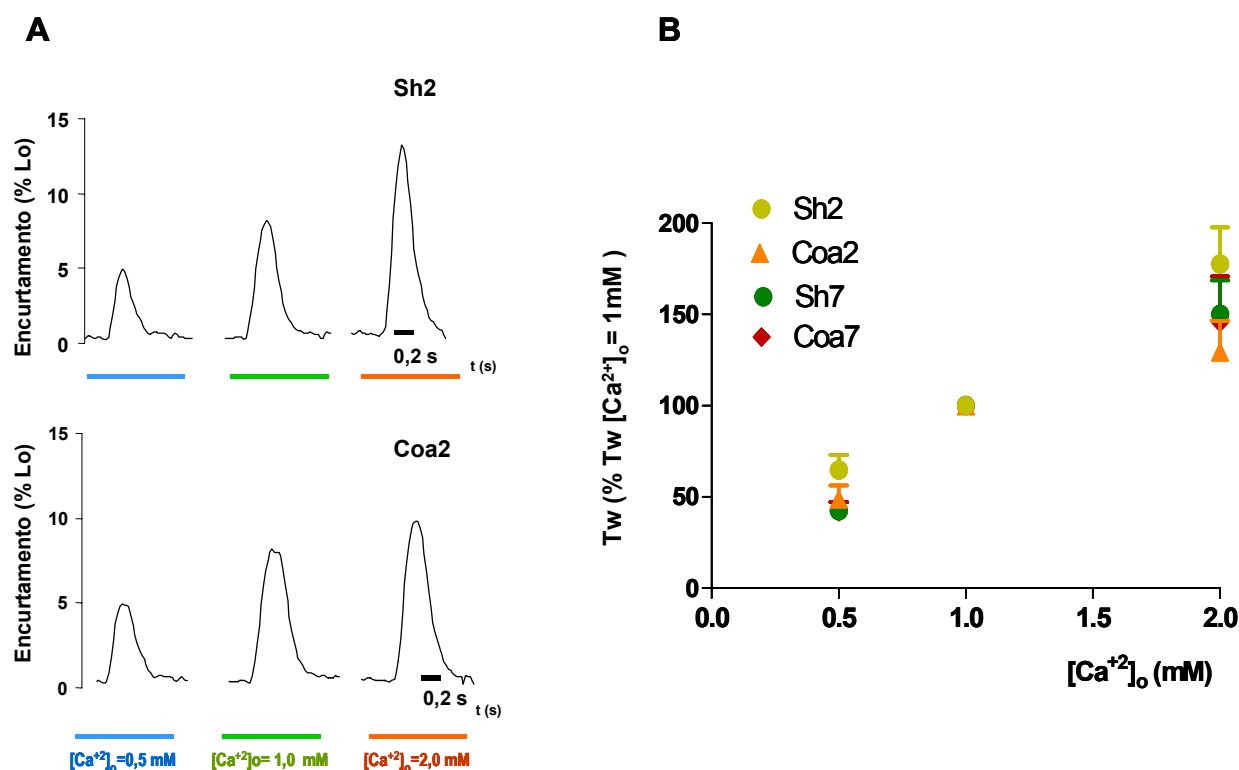


Figura 4.8: Resposta contrátil a variações da concentração de cálcio extracelular ($[Ca^{2+}]_o$), registrada em em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente) estimulados a 0,5 Hz. A) Registro do encurtamento (expresso como porcentagem do comprimento celular diastólico, Lo) na presença de 0,5; 1 e 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ em células dos grupos Sh2 e Coa2; B) Amplitude normalizada das contrações (como porcentagem da amplitude em 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ na respectiva célula) na presença de diferentes $[Ca^{2+}]_o$. Os dados ilustrados estão apresentados na Tabela 4.6.

4.4.2. Amplitude da Contratura de Cafeína em Tyrode 0Na⁺/0Ca²⁺ (Caf00)

A amplitude de Caf00 foi usada como índice de carga de Ca^{2+} do RS para observações pareadas, o que nos permite detectar indiretamente possíveis variações do conteúdo de Ca^{2+} nesta organela, dependentes de $[Ca^{2+}]_o$.

Como no caso do Tw, a análise de variância trifatorial apontou influência significativa apenas da $[Ca^{2+}]_o$, mas não dos fatores ‘cirurgia’, ‘tempo após a cirurgia’, ou de interação destes fatores (Tabela 4.6.B). Comparando os dados apresentados nas tabelas 4.6.A (Tw) e 4.7.A (Caf00), observamos que, a amplitude de ambos os tipos de contração é tanto maior quanto maior $[Ca^{2+}]_o$, mas as variações percentuais para Caf00 foram bem menores do que para Tw. Estes dados estão ilustrados na figura 4.9.

Tabela 4.7.A: Amplitude de contraturas evocadas por cafeína em solução de Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ (Caf00) registradas em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente), após perfusão e estimulação a 0,5 Hz por 10 min na presença de diferentes concentrações de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM, e a amplitude das Caf00 foi normalizada por aquela registrada na presença de 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ na respectiva célula. O número de células estudadas está indicado entre parênteses.

$[\text{Ca}^{2+}]_o$ (mM)		Amplitude de Caf00 (% de 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$)		
		0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM
Sh2	(11)	$87,4 \pm 5,7$	100	$109,9 \pm 5,7$
Coa2	(9)	$79,7 \pm 7,5$	100	$108,1 \pm 8,1$
Sh7	(14)	$82,5 \pm 5,2$	100	$109,5 \pm 6,1$
Coa7	(12)	$86,7 \pm 7,8$	100	$110,3 \pm 11,8$

Tabela 4.7.B.: Análise de variância trifatorial da variável ΔL_{Caf00} para o tipo de cirurgia, tempo decorrido após a cirurgia (2 ou 7 dias) e concentração de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	p
ΔL_{Caf00} (% ΔL_{Caf00} de 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$)	cirurgia	1	21,0723	0,05	0,8289
	tempo	1	15,0622	0,03	0,8550
	$[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	7820,8498	17,41	0,0000
	cirurgia x tempo	1	208,4683	0,46	0,4969
	cirurgia x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	9,6631	0,02	0,9787
	tempo x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	3,7750	0,01	0,9916
	cirurgia x tempo x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	114,9726	0,26	0,7746
	resíduo	132	449,2487		

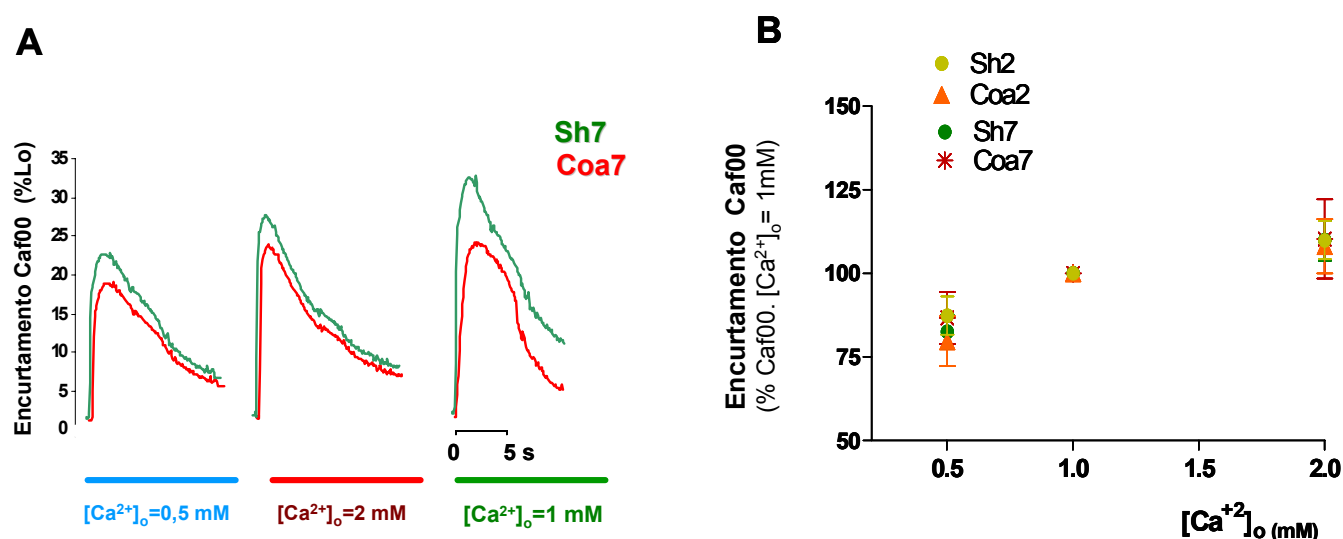


Figura 4.9: Amplitude da contraturas de cafeína em Tyrode $0Na^+/0 \text{ Ca}^{2+}$ (Caf00) em resposta a variações da concentração de cálcio extracelular ($[Ca^{2+}]_o$), evocadas em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente) e estimulados a 0,5 Hz. A) Registros de Caf00 na presença de 0,5; 1 e 2 mM $[Ca^{2+}]_o$. B) Amplitude normalizada das contraturas de Caf00 em resposta à variação da $[Ca^{2+}]_o$ (contraturas foram expressas como porcentagem da amplitude da contratura em 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ na respectiva célula). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Dados apresentados na Tabela 4.9.

4.5. TRANSPORTE DE Ca^{2+} DURANTE A DIÁSTOLE

4.5.1. Atividade Espontânea em Resposta ao Aumento de $[Ca^{2+}]_o$

Estudos recentes mostraram que a liberação de Ca^{2+} durante o ECC e a liberação espontânea durante a diástole resultam de um evento elementar comum de liberação de Ca^{2+} , o *spark* de Ca^{2+} (Cannell *et al.* 1994; Cheng *et al.*, 1996). Durante a ECC, a liberação de Ca^{2+} suficiente para promover a contração resulta da somação temporal e espacial de *sparks* de Ca^{2+} (Cheng *et al.*, 1996). Os *sparks* constituem liberação espontânea local de Ca^{2+} pelo RS, mas podem em alguns casos ativar sítios vizinhos de liberação de Ca^{2+} promovendo ondas de liberação de Ca^{2+} e que se propagam pelo miócito (Cheng *et al.*, 1996). Um mecanismo proposto para explicar a propagação destas ondas, que se expressam como

contrações espontâneas, consiste na liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR), ou seja, o Ca^{2+} recém-liberado do RS serve para a retro-alimentação positiva da liberação de Ca^{2+} a partir de sítios vizinhos; ou seja, a CICR foi apresentada como mecanismo para explicar a propagação de ondas diante do aumento local da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ devido à maior liberação diastólica de Ca^{2+} pelo RS durante a sobrecarga de Ca^{2+} (Backx *et al.*, 1989), observação posteriormente corroborada por Cheng *et al.* (1996) e Bassani *et al.* (1997). Segundo Bers *et al.* (1998), três principais fatores parecem influenciar diretamente a liberação espontânea localizada de Ca^{2+} do RS: a) a concentração citosólica de Ca^{2+} ; b) o conteúdo de Ca^{2+} do RS; e c) período refratário do CLCR (Cheng *et al.*, 1996; Bers, 1998).

Em estudos prévios obtidos do nosso laboratório, observamos uma relação entre a atividade contrátil espontânea durante pausa prolongada (diástole) e aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,25 para 2 mM em miócitos ventriculares de rato (Bassani *et al.*, 2001). Neste contexto, consideramos relevante observar o controle da liberação de Ca^{2+} a partir do RS em nossos animais submetidos à coarctação aórtica. Nestes experimentos, avaliamos a frequência de contrações espontâneas de miócitos durante um minuto de pausa da estimulação elétrica, visando investigar como a variação da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ poderia facilitar a liberação diastólica de Ca^{2+} do RS nos grupos *Sh* e *Coa*.

A atividade espontânea do miócito durante a pausa foi avaliada após este ter atingido o regime estacionário durante estimulação elétrica (T_w) em cada concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ empregada (0,5 mM, 1 mM e 2 mM). Durante a estimulação elétrica, o influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ depende da $[\text{Ca}^{2+}]_o$, favorecendo o enchimento do RS, que, quando sobrecarregado, apresenta maior perda espontânea de Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1995^a; Bassani *et al.*, 1997).

Nestes experimentos, observamos que o aumento da frequência de contrações espontâneas em resposta ao aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ era comum a todos os grupos experimentais, mas que os miócitos dos grupos *Coa* apresentaram maior frequência do que os do grupos *Sh* (para quaisquer valores de $[\text{Ca}^{2+}]_o$). (tabela 4.8.A e figura 4.10).

A análise de variância trifatorial para tipo de cirurgia, tempo após cirurgia e $[\text{Ca}^{2+}]_o$ apontou que as diferenças entre as frequências de contrações espontâneas observadas entre os grupos poderiam ser atribuídas à cirurgia (ao efeito da coarctação), à $[\text{Ca}^{2+}]_o$ e à interação de ambos fatores (tabela 4.8.A e B). A frequência de contração apresentou uma relação positiva com a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ em todos os grupos, mas seu aumento foi maior nos grupos *Coa*, especialmente para maiores valores de $[\text{Ca}^{2+}]_o$. No entanto, em qualquer $[\text{Ca}^{2+}]_o$, a frequência de contrações espontâneas foi maior em células de animais *Coa*.

Tabela 4.8.A: Número de contrações espontâneas registradas durante um minuto de pausa estimulatória em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente), na presença de diferentes concentrações extracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, e o número de células estudadas está indicado entre parênteses. * $p < 0,05$: Coa2 vs Sh2 ou Coa7 vs Sh7.

$[\text{Ca}^{2+}]_o$ (mM)		NÚMERO DE CONTRAÇÕES ESPONTÂNEAS/MIN		
		0.5 mM	1 mM	2 Mm
Sh2	(10)	0,4 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 1,1
Coa2	(11)	1,8 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 1,4	12,6 $\pm$ 3,1 *
Sh7	(14)	1,0 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 1,4
Coa7	(12)	1,7 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 1,2 *	10,0 $\pm$ 2,0 *

Tabela 4.8.B.: Análise de variância trifatorial da variável ‘número de contrações espontâneas durante a pausa’ para os fatores *tipo de cirurgia*, *tempo decorrido após a cirurgia* (2 ou 7 dias) e *concentração de Ca^{2+} extracelular* ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	P
Frequência de contrações espontâneas/min	Cirurgia	1	451,9107	20,92	$p < 0,001$
	tempo	1	0,0039	0,00	0,9893
	$[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	588,3229	27,23	$p < 0,001$
	cirurgia x tempo	1	19,6706	0,91	0,3417
	cirurgia x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	100,0499	4,63	0,0114
	tempo x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	2,0378	0,09	0,9100
	cirurgia x tempo x $[\text{Ca}^{2+}]_o$	2	19,0381	0,88	0,4167
	resíduo	132	21,6032		

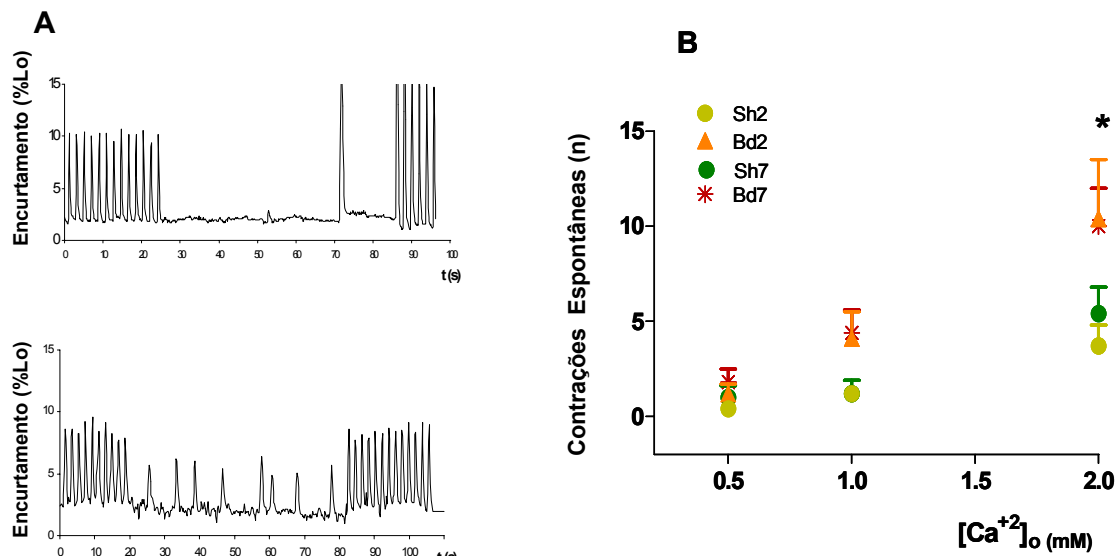


Figura 4.10: Atividade espontânea dos miócitos durante pausa estimulatória em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente), na presença de diferentes concentrações extracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). A) Registros da atividade espontânea durante 1 minuto de pausa em miócitos dos grupos *Sh7* (registro superior) e *Coa7* (registro inferior). B) Número de contrações espontâneas por minuto de pausa nos diferentes grupos, como função de $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Os resultados estão expressos como média (barras) $\pm$ EPM (linhas verticais), e são os mesmo apresentados na Tabela 4.8.

4.5.2. Perda de Ca^{2+} do RS durante a Diástole

Tendo observado maior atividade espontânea em miócitos de animais Coa, em comparação com os respectivos grupos Sh, em todos os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ estudados, consideramos relevante verificar se este aumento devia-se a maior perda diastólica de Ca^{2+} do RS. Para tal, comparamos a amplitude de Caf00s obtidas em *steady-state* (0,5 Hz) e após pausa estimulatória de 3 min. Durante este período de pausa, a célula era perfundida com solução sem Ca^{2+} , segundo Bassani e Bers (1994, 1995) e Ferraz *et al.* (2001). A ausência de Ca^{2+} extracelular favorece o funcionamento da NCX em seu modo direto, em competição com a A-RS, o que, durante a diástole, leva a perda cumulativa de Ca^{2+} do RS. Esta perda em condições controles seria mascarada pela baixa atividade diastólica da NCX e pela grande atividade da A-RS em ratos (Bassani e Bers, 1994, 1995; Ferraz *et al.*, 2001). A razão da amplitude das duas Caf00s (antes e após a pausa) é inversamente relacionada à perda de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1993, 1995).

Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.9. e figura 4.11. A análise de variância bifatorial mostrou que a diferença entre grupos na perda de Ca^{2+} do RS durante a pausa pôde ser atribuída à cirurgia ($p=0,0007$), sendo maior nos grupos *Coa* do que nos *Sh* ($p<0,05$).

Tabela 4.9.A: Razão da amplitude de contraturas evocadas por cafeína em solução de Tyrode $0\text{Na}^+, 0\text{Ca}^{2+}$ (Caf00) em *steady-state* sob estimulação elétrica a 0,5 Hz (Caf001) e após pausa estimulatória de 3 min em solução de Tyrode 0Ca^{2+} (Caf002). Dados apresentados como média $\pm$ EPM, obtidos em miócios ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente). O número de experimentos está indicado entre parênteses. * $p<0,05$: teste *t post-hoc Coa vs Sh*, nos respectivos tempos após a cirurgia.

GRUPOS (N)	Sh2 (10)	Coa2 (10)	Sh7 (8)	Coa7 (9)
CAF002/CAF001	79,2 $\pm$ 6,8	52,9 $\pm$ 4,2*	73,7 $\pm$ 3,8	63,0 $\pm$ 4,4*

Tabela 4.9.B: Análise de variância bifatorial das variáveis ‘razão entre a contratura de cafeína em *steady-state* e a contratura após pausa estimulatória para o tipo de cirurgia e tempo após a cirurgia (2 ou 7 dias). GL, graus de liberdade; QM, quadrado médio.

	Causas de Variação	ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL			
		GL	QM	F	P
Caf002/Caf001	Cirurgia	1	3353,6712	13,87	0,0007
	Tempo	1	60,2962	0,25	0,6208
	cirurgia x tempo	1	558,8395	2,31	0,1379
	resíduo	74	241,7647		

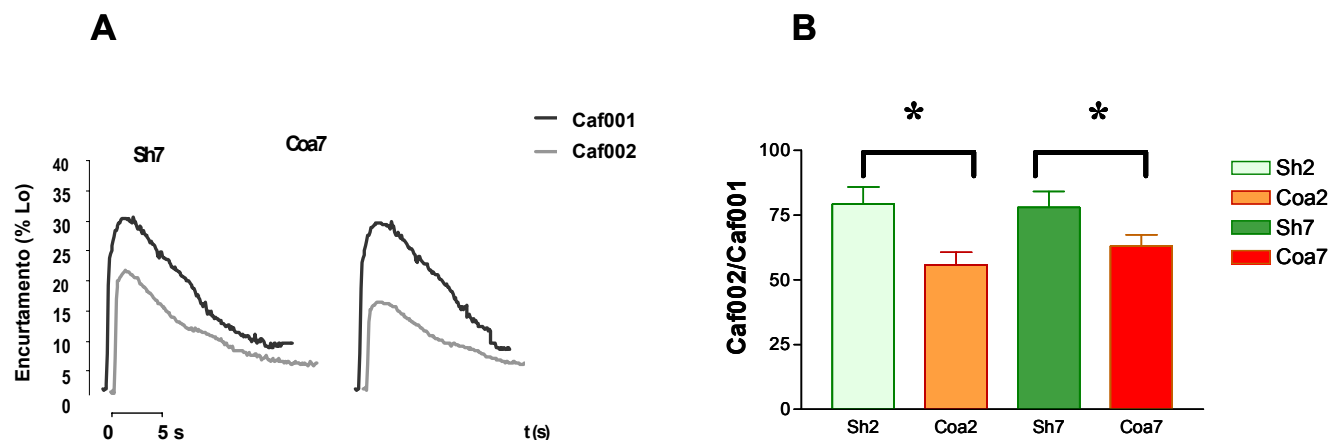


Figura 4.11: Perda de Ca^{2+} do RS após pausa estimulatória de 3 min em solução de Tyrode 0 Ca^{2+} . A) Registros de contraturas evocadas por cafeína em solução de Tyrode $0\text{Na}^{+}-0\text{Ca}^{2+}$ após estimulação em *steady-state* a 0,5 Hz (Caf001) e após pausa estimulatória (Caf002), em miócitos ventriculares isolados de ratos 2 e 7 dias após cirurgia simulada (Sh2 e Sh7, respectivamente) e após coarctação aórtica (Coa2 e Coa7, respectivamente). B) Razão das amplitudes de Caf002 e Caf001. Barras representam médias, linhas verticais representam EPM. Dados apresentados na Tabela 4.9. * $p < 0,05$ teste *t post-hoc*.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO:

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Hipertrofia cardíaca é um mecanismo adaptativo dependente do tipo, duração e intensidade do estímulo (Bers, 2001). Em nosso estudo adotamos um modelo de hipertrofia por sobrecarga pressórica, no qual a hipertrofia deve-se a estímulos mecânicos e à ativação do sistema renina angiotensina e sistema nervoso simpático (Akers *et al.*, 2000). Este modelo é relativamente bem caracterizado e já foi objeto de muitos estudos.

Embora a sinalização para o desenvolvimento da hipertrofia seja ativada minutos após o início do estímulo mecânico (Domingos *et al.*, 2002), a manifestação da mesma requer mais tempo pois envolve reprogramação genética, síntese proteica e reestruturamento celular e tecidual. No caso de sobrecarga pressórica por coarctação aórtica, são suficientes alguns dias para constatação e estabilização da hipertrofia. Scopacasa *et al.* (2003) observaram que a razão VE/VD após 2, 6 e 15 dias de coarctação aórtica correspondia respectivamente a $3,9 \pm 0,12$, $4,2 \pm 0,1$ e $4,3 \pm 0,1$ – resultados que sugerem uma estabilização da hipertrofia após o sexto dia de coarctação aórtica. Os resultados de Arai *et al.* (1996) mostram níveis variáveis de hipertrofia em ratos 8 dias após coarctação aórtica, mas resultados de outros autores confirmam os resultados de Scopacasa *et al.* (2003). Em um estudo sobre o efeito agudo da coarctação aórtica após 6, 12, 24, 48 e 96 horas em porcos, Nediani *et al.* (2000) constataram aumento da espessura da parede ventricular após 96 horas. Akers *et al.* (2000) constataram hipertrofia 3 dias após coarctação aórtica, coincidindo com a ativação do sistema-renina angiotensina.

Neste contexto, adotamos um modelo de hipertrofia em rato induzida por 2 ou 7 dias de coarctação aórtica. Em nossos experimentos não constatamos hipertrofia 2 dias após coarctação da aorta. A hipertrofia foi constatada 7 dias após a cirurgia pelo aumento da razão VE/VD e aumento da largura dos miócitos. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Scopacasa *et al.* (2003), que não constataram aumento da razão VE/VD 2 dias após a coarctação da aorta, mas somente 6 dias após a cirurgia. Akers *et al.* (2000) observaram um aumento da razão entre VE e peso corporal após 10 dias de coarctação da aorta abdominal.

Nossos resultados divergem daqueles obtidos por Anversa *et al.* (1975), que observaram um aumento de 9% do diâmetro do miócito e aumento correspondente de 20% de sua área de secção transversal já após 20 horas de constrição da aorta abdominal. A este aumento correspondia um aumento de 43% da incorporação de amino-ácidos para síntese proteica. Estes autores não observaram aumento do comprimento do miócito. Tais resultados foram posteriormente reproduzidos e estendidos pelos mesmos autores (Anversa *et al.*, 1976), correlacionando o aumento da área de secção transversal ao aumento do volume mitocondrial (36%), aumento do volume do RS (78%) e aumento do volume de miofibrilas (4%).

Loud *et al.* (1978) observaram aumento de 21 a 37% do volume de miócitos, em um intervalo compreendido entre 1 ou 4 semanas após a coarctação da artéria renal, dependendo da procedência do miócito - endocárdio ou epicárdio. O aumento de dimensões miocitárias também foi observado por Delbridge *et al.* (1997) neste mesmo modelo experimental.

Além do aumento da espessura da parede ventricular e das dimensões dos miócitos, alterações características da hipertrofia concêntrica por sobrecarga pressórica, outros mecanismos de remodelamento ocorrem paralelamente à hipertrofia. Dentre estes, alteração da expressão genética de proteínas contráteis e de proteínas associadas ao controle de Ca^{2+} , alteração de propriedades mecânicas e elétricas dos miócitos e do coração, possivelmente alteração da função diastólica e/ou sistólica (Edmunds, 1997).

Uma propriedade mecânica comumente alterada durante o desenvolvimento da hipertrofia no VE é a complacência do mesmo, que se reduz na medida em que o ventrículo se torna fibrótico (Opie, 1988). Algumas alterações adaptativas da hipertrofia podem ser observadas no diagrama pressão-volume. Na hipertrofia observamos um maior aumento da pressão intra-ventricular em resposta a um dado influxo de sangue ao VE do que em corações não hipertrofiados (deslocamento para cima da relação P-V durante a diástole e conseqüente aumento da derivada dP/dV do diagrama P-V, observada nas curvas E e E' da figura 1.8.C) (Edmunds, 1997; Opie, 1988). Aumento adicional da rigidez ventricular pode ocasionar disfunção do enchimento ventricular durante a diástole, comprometendo a sístole subsequente (Braunwald, 2001).

Braunwald (2001) relata que em casos de estenose aórtica observam-se correlações negativas entre 'tensão parietal e fração de ejeção' e 'tensão parietal e velocidade de encurtamento da fibra miocárdica'. Segundo este autor, a amplitude de encurtamento das fibras miocárdicas de indivíduos com estenose aórtica não se distingue na maioria dos casos da amplitude de encurtamento observada

nas fibras de indivíduos normais. Por outro lado, a redução da fração de ejeção (dada pela razão entre volume sistólico e volume diastólico final) e da velocidade de encurtamento das fibras está relacionada a distúrbio do esvaziamento ventricular, que pode, posteriormente, evoluir para disfunção sistólica. A disfunção sistólica durante a sobrecarga pressórica ocorre quando o grau de hipertrofia é insuficiente para compensar esta pós-carga. Isto aponta o grau de hipertrofia ventricular como um determinante crítico do desempenho do ventrículo no caso de sobrecarga pressórica; isto é, o mau desempenho cardíaco não é necessariamente causado por depressão intrínseca da contratilidade miocárdica, mas pode ser secundário a um grau inadequado de hipertrofia (Braunwald, 2001).

5.2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NA HIPERTROFIA

A contratilidade dos miócitos é determinada pela mobilização de Ca^{2+} citosólico durante a sístole, e também por características mecânicas passivas do miócito (e.g., aumento da rigidez) e alterações funcionais dos miofilamentos devidas a aumento da expressão das proteínas β -MHC, desmina e tubulina (Watkins et al, 1987; Watson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999).

Muitos são os estudos que enfocam a expressão de proteínas e a função contrátil de miócitos, sobretudo durante a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca ou a durante a insuficiência cardíaca. Menos numerosos são os estudos que abordam a fase de instalação da hipertrofia. Abaixo se encontra um pequeno compêndio de estudos que procuraram estabelecer uma relação entre a expressão/atividade de proteínas relacionadas ao transporte de Ca^{2+} e à contratilidade cardíaca e alterações observadas na hipertrofia.

Como mobilização de Ca^{2+} citosólico durante o processo de acoplamento excitação contração (ECC) depende do *trigger* Ca^{2+} e da liberação de Ca^{2+} do RS, e esta, por sua vez, da carga de Ca^{2+} do RS (Bers, 2001; Bers *et al.*, 1998; Bassani *et al.*, 1995a), convém considerar a regulação da função da *A-RS* durante a instalação/desenvolvimento da hipertrofia, já que esta é um dos determinantes da carga de Ca^{2+} do RS.

a) Serca2a e PLB

A isoforma predominante da *A-RS* no tecido cardíaco é a Serca2a (Loukianov *et al.*, 1998; Ver Heyen *et al.*, 2001; Vangheluwe *et al.*, 2003). A captação de Ca^{2+} pela *A-RS* é controlada pelo PLB, que exerce um controle negativo sobre a bomba (Santana *et al.*, 1997a e 1997b; Tada e Toyofuku, 1996; Tada *et al.*, 1998). A associação do PLB com a *A-RS* resulta em redução da afinidade da *A-RS* pelo Ca^{2+} (aumento da constante de Michaelis-Menten, $Km_{\text{Ca}^{2+}}$) (Hicks *et al.*, 1979; Inui *et al.*, 1986; Bers, 2001). Quando fosforilado pela PKA em resposta a catecolaminas (abundantes devido à ativação simpática durante a sobrecarga pressórica), o PLB dissocia-se da *A-RS*, resultando no aumento da afinidade da *A-RS* pelo Ca^{2+} (Kranias *et al.*, 1982; Kranias, 1985; Li *et al.*, 2000).

Nossa abordagem para estudar algumas das proteínas relacionadas à regulação do Ca^{2+} citosólico, o RT-PCR, nos permite comparar os níveis de mRNA transcritos para estas proteínas. O aumento do nível de um determinado mRNA não implica necessariamente em aumento dos níveis ou da função da proteína por ele codificada. O aumento da função de uma proteína requer sucesso no processo de translação (síntese protéica a partir de um mRNA), bem como em processos pós-translacionais, se requeridos. Mas o processo de translação está sujeito a alterações translacionais (*e.g.* mutações em seqüências na 3'-UTR que impeçam o início da tradução) que podem comprometer a função da proteína traduzida; além disto processos pós-translacionais também podem ser alterados comprometendo a função da proteína já traduzida (*e.g.* alteração da inserção da proteína no seu local de ação) (Day & Tuite, 1998). Entretanto, de modo geral, um aumento do nível de um mRNA pode servir como indício para um aumento correspondente do nível da proteína por ele codificada e possivelmente da atividade da mesma.

Em estudos sobre a transcrição da Serca2a *in vitro* (*nuclear run-on-assays*) 5 e 11 dias após coarctação aórtica em ratos, Ribadeau *et al.* (1997) apontaram uma redução de 37% do mRNA apenas após 11 dias de cirurgia, mas não após 5 dias (não foram feitos experimentos funcionais para correlacionar estes dados com a captação de Ca^{2+} pela *A-RS* ou com a função contrátil dos miócitos). Em resultados obtidos por Wong *et al.* (1997), 3 semanas após a coarctação aórtica em ratos, constataram-se disfunção do relaxamento e aumento da rigidez passiva associados à redução do mRNA da Serca2a e ao aumento da concentração de colágeno, respectivamente, em preparações de coração isolado. Após 4 semanas de coarctação da aorta, Kiss *et al.* (1995) constataram em cobaias sinais de hipertrofia compensada (aumento da massa do VE com manutenção da função ventricular

sistólica e ausência de congestão pulmonar); e, após 8 semanas, sinais de insuficiência cardíaca congestiva – *i.e.* redução da força de contração desenvolvida pelo VE; redução das velocidades de contração (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt); e congestão pulmonar (aumento da razão entre o peso dos pulmões e o peso corpóreo). Segundo Kiss *et al.* (1995), os sinais de insuficiência cardíaca 8 semanas após a coarctação estavam associados à redução de 85% e 65% dos níveis das proteínas Serca2a e PLB, respectivamente, redução da afinidade da *A-RS* pelo Ca^{2+} , bem como redução de 20% da taxa máxima de captação de Ca^{2+} pelo RS (V_{max}). Estes resultados foram corroborados por Ito *et al.* (2001), que não constataram após 4 semanas de coarctação aórtica, diferenças nos índices hemodinâmicos e ecocardiográficos de ratos, mas sim após 7 semanas de coarctação aórtica, quando observaram aumento da pressão diastólica final e da espessura da parede do VE e indícios de insuficiência cardíaca, evidenciada pela redução da reserva contrátil de miócitos em resposta aumento da frequência de estimulação, pela redução do pico do transiente de Ca^{2+} e da carga de Ca^{2+} do RS. Estes resultados foram associados à redução dos níveis de proteína da Serca2a, bem como aumento do PLB e NCX. Estas alterações não foram observadas 7 dias após coarctação aórtica em animais transgênicos que superexpressavam Serca2a. Estes animais também apresentaram uma redução da taxa de mortalidade, mesmo com um nível de hipertrofia da parede ventricular similar ao dos animais que não foram geneticamente manipulados (Ito *et al.*, 2001). A menor mortalidade destes animais transgênicos fala a favor do argumento de que a hipertrofia em si, não é deletéria (Branwald, 2001; Ito *et al.*, 2001). Ito *et al.* (2001) e sugerem a deficiência da função da Serca2a como um marco na transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca induzida por sobrecarga pressórica.

Resultados semelhantes (aumento da massa ventricular, redução da função contrátil sistólica e do relaxamento diastólico *in vivo* e redução de 50% dos níveis de proteína da Serca2a) foram obtidos 10 semanas após coarctação aórtica em ratos por Schultz *et al.* (2004), que sugeriram que a redução do nível da Serca2a potencializaria e aceleraria a transição da hipertrofia induzida por sobrecarga hemodinâmica para insuficiência cardíaca precoce. Em 1997, Qi *et al.* observaram que a disfunção contrátil 8 semanas após a coarctação aórtica em ratos precedia a redução da expressão/atividade da Serca2a e da recaptação de Ca^{2+} pelo RS, constatada somente 16 semanas após coarctação aórtica. Qi *et al.* (1997) atribuíram a redução contrátil ao aumento de colágeno e de β -MHC, mas sugeriram que a redução da expressão/atividade da Serca2a pudesse marcar a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca.

Baker *et al.* (1998) também sugeriram que a hipertrofia e a insuficiência cardíaca estivessem associadas a diferentes níveis de redução da atividade da *A-RS*, pois a superexpressão da Serca2a foi capaz de reverter os sinais da hipertrofia. Um aumento de 3 a 8 vezes dos níveis de mRNA correspondeu a aproximadamente 40% de aumento desta proteína, demonstrando a complexidade dos mecanismos transcricionais. A superexpressão da Serca2a resultou ainda em aumento de 37% da taxa máxima de captação de Ca^{2+} em homogenato de coração na presença de ATP, evidenciando uma relação entre expressão da Serca2a e atividade de captação de Ca^{2+} pelo RS (Baker *et al.*, 1998). Quanto à contratilidade nestes animais, houve aumento velocidade de contração (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt), bem como aumento do transiente de Ca^{2+} e da força gerada durante a sístole por preparações de trabéculas ventriculares (Baker *et al.*, 1998).

Miyamoto *et al.* (2000) também observaram que a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca em animais após 19-23 semanas após a cirurgia era passível de reversão por infecção dos animais com adenovírus portador do gen para Serca2a.

Esta relação entre redução da atividade da *A-RS* e disfunção cardíaca também foi observada em miócitos humanos provenientes de pacientes com insuficiência cardíaca. Dentre sinais comuns à hipertrofia relatados pela literatura, encontram-se redução da velocidade de relaxamento, da força sistólica em preparações multi-celulares, bem como uma relação negativa entre amplitude de contração e frequência de estimulação, resultados estes atribuídos à redução da carga de Ca^{2+} do RS e da liberação de Ca^{2+} desta organela (Gwathmey *et al.*, 1987; Kaprielian *et al.*, 2002). Miócitos hipertróficos apresentavam com frequência ainda outras alterações na homeostasia do Ca^{2+} , como aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica e redução da taxa de remoção do Ca^{2+} citosólico. Estes efeitos foram revertidos por ativação gênica da Serca2a por infecção dos miócitos com adenovírus portador do gen para Serca2a (Lorell, 1987; Kaprielian *et al.*, 2002).

Os estudos acima ilustram a importância da função da *A-RS* para a função do miócito e na função cardíaca. A grande maioria dos estudos concentra-se em fases tardias da hipertrofia, sobretudo na transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca ou na insuficiência cardíaca e defende que a Serca2a, isoforma cardíaca da *A-RS*, apresenta-se reduzida nestas fases (Qi *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2004). De modo geral, a redução da Serca2a é vista, por muitos autores, como marco na transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca (Feldmann *et al.*, 1993; Kiss *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 2004).

Quanto à expressão da Serca2a em fases precoces da hipertrofia ou durante o processo de instalação da mesma, não há um consenso. Calderone *et al.* (1995) constataram uma redução significativa do mRNA da Serca2a após 7 dias de coarctação aórtica. No entanto, Arai *et al.* (1996) afirmam que na hipertrofia suave há um aumento transitório do nível de mRNA da Serca2a, aumento da respectiva proteína e da capacidade de ligação de Ca^{2+} por homogenato de VE iniciada pela adição de ATP. Nediani *et al.* (2000) observaram, por meio de ensaios bioquímicos, aumento do mRNA, da proteína e da atividade da Serca2a com pico entre 6 e 24 horas após coarctação da aorta. Ohkusa *et al.* (1997) observaram um aumento da perda e captação de Ca^{2+} em microsossomos (frações enriquecidas de RS) obtidos de VE de ratos 10 dias e 4 semanas após a coarctação aórtica, mas redução após 8 semanas. Os achados são muitos e diversos, mas não se deve subestimar a importância dos mecanismos adaptativos iniciais durante instalação da hipertrofia na inauguração de ciclos viciosos, que podem ser decisivos em fases mais tardias deste processo patológico.

Nossos resultados obtidos em experimentos de RT-PCR para os níveis de mRNA de diversas proteínas relacionadas à homeostasia de Ca^{2+} (Serca2a, PLB, NCX, CSQ e RyR2) estão de acordo com a possibilidade de aumento de captação de Ca^{2+} pelo RS e/ou de extrusão de Ca^{2+} pela NCX. Os níveis de mRNA para todas as proteínas estudadas foram normalizados pelo mRNA da β -actina (Hurteau & Spivack, 2002; Lehnart *et al.*, 1998; Teramoto e Puri, 2001; Long *et al.*, 1989; Schwartzbauer e Robbins, 2001). Comparando os níveis de mRNA da Serca2a entre os grupos *Coa7* e *Sh7*, não observamos diferença significativa, embora o aumento observado no grupo *Coa7* estivesse próximo do limite de significância estatística ($p=0,053$).

Avaliando a *A-RS* e PLB como uma unidade funcional na captação de Ca^{2+} (Tada e Toyofuku, 1996), comparamos os níveis de mRNA da Serca2a normalizados pelos níveis de PLB (razão $\text{mRNA}_{\text{Serca2a}} / \text{mRNA}_{\text{PLB}}$) e constatamos um aumento significativo desta razão no grupo *Coa7* (vide tabela 4.2). O fato de termos observado um aumento da razão Serca2a/PLB não nos permite estabelecer uma relação definitiva entre nível de mRNA e expressão ou atividade destas proteínas.

No entanto, resultados funcionais em células intactas são compatíveis com a possibilidade de que as alterações dos níveis de mRNA sejam acompanhados pela expressão / atividade das respectivas proteínas, neste caso, pelo aumento da captação de Ca^{2+} pelo RS. Há relatos na literatura de aumento conjunto do nível de mRNA da Serca2a e da capacidade de captação de Ca^{2+} desta enzima (Arai *et al.*, 1996; Nediani *et al.*, 2000). O grande aumento da frequência de contrações espontâneas em diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_0$ pode ser resultante do aumento da carga de Ca^{2+} do RS, o qual, por

sua vez, poderia indicar um aumento da captação de Ca^{2+} pelo RS. Amplitudes das contraturas de Caf00 não se mostraram alterações significativas em diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$; ou seja, não se detectaram alterações da carga de Ca^{2+} do RS, mas convém lembrar que pequenas alterações da carga do RS podem exercer grande influência na liberação de Ca^{2+} a partir do RS (Bassani *et al.*, 1995a), mesmo quando não são detectáveis com contraturas de Caf00.

b) NCX

Paralelamente à redução da Serca2a, muitos estudos relatam aumento compensatório dos níveis de mRNA da NCX, da respectiva proteína (Kent *et al.*, 1993; Menick *et al.*, 1996; Studer *et al.*, 1997; Menick *et al.*, 2002) e da atividade da mesma durante a hipertrofia após 4 e 8 semanas de coarctação aórtica (Ahmmed *et al.*, 2000; Meszaros *et al.*, 2001). Quando comparamos os níveis de mRNA da NCX nos grupos *Sh7* e *Coa7*, não observamos diferença significativa (mas $p = 0,06$ para aumento de ~70% em *Coa7*). A literatura também traz resultados muito diversificados relacionados à expressão e à atividade da NCX. Nakanishi *et al.* (1989) observaram um pequeno aumento da atividade da NCX 7 dias após coarctação aórtica. McCall *et al.* (1998) observaram redução do mRNA da NCX após 16 semanas. Ito *et al.* (2000), constataram aumento da proteína NCX após 4 e 7 semanas de coarctação aórtica. Sipido *et al.* (2002) relatam grande variação dos níveis de proteína e da atividade da NCX em uma revisão sobre este trocador em diversos modelos animais e concluem que o aumento de expressão e/ou atividade da NCX não é uma característica geral obrigatória da hipertrofia ou da insuficiência cardíaca, mas ocorre com frequência. Estes autores ainda propõem que a ativação da NCX possa ser um mecanismo compensatório da freqüente redução da Serca2a, entretanto com efeitos colaterais como o aumento do risco de atividade espontânea e arritmias.

c) Substituição da Isoforma α -MHC pela isoforma lenta β -MHC

O progresso da hipertrofia também ocorre com modulação de proteínas constitutivas das fibras miocárdicas, e.g. substituição de uma isoforma por outra (freqüentemente isoformas típicas da fase fetais). Normalmente, no coração adulto, a isoforma ubíqua da cadeia pesada da miosina (MHC) é a α -MHC. Durante a hipertrofia esta é gradualmente substituída pela isoforma lenta desta proteína, a β -MHC (Lartaud-idjouadiene *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1992; Van Buren *et al.*, 1995). A β -MHC foi constatada em ratos 3 a 7 dias após coarctação da aorta (Dorn *et al.*, 1994; Schiaffino *et al.*,

1989), e manteve-se na hipertrofia crônica (Calderone *et al.*, 1995; Haddad *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1996).

Há relatos de que a substituição da isoforma α -MHC pela isoforma β -MHC, lenta, devida à hipertrofia, esteja associada ao prolongamento do relaxamento dos miócitos em resposta à estimulação elétrica (Schiaffino *et al.*, 1989; Dorn *et al.*, 1994; Calderone *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1996; Haddad *et al.*, 1995), embora miócitos expressando a β -MHC não apresentem diferença na sensibilidade ao Ca^{2+} quando comparados a miócitos expressando a α -MHC (Fitzsimons *et al.*, 1998).

Em corações normais de ratos, a proporção observada entre as isoformas α -MHC e β -MHC é de 8:2 (Fitzsimons *et al.*, 1998). Esta proporção se altera ao longo de processos patológicos como a hipertrofia, o que resulta redução do gasto de energia durante o processo contrátil (Metzger *et al.*, 1999). Dorn *et al.* (1994) atribuíram a redução da velocidade de contração observada em miócitos de ratos 7 dias após coarctação aórtica sobretudo ao aumento de 15% da isoforma β -MHC. Resultados semelhantes foram obtidos por Calderone *et al.* (1995) em ratos 7 dias após coarctação da artéria renal. Qi *et al.* (1997) também constataram prolongamento do tempo requerido para o relaxamento ventricular medido *in vivo* em ratos 8 e 16 semanas após coarctação da aorta, e atribuíram este prolongamento ao aumento da expressão de β -MHC e alteração do conteúdo ventricular de colágeno fibrilar. Entretanto, McCall *et al.* (1988), estudando miócitos isolados de ratos 16 semanas após coarctação da aorta abdominal, não constataram redução da velocidade de relaxamento dos miócitos. Estes autores observaram, porém, redução da amplitude da contração, resultado que foi atribuídos a fatores como aumento da rigidez celular e alterações dos microtúbulos (Tagawa *et al.*, 1996), embora aumento da β -MHC tivesse sido previamente constado neste modelo experimental por Qi *et al.* (1997). A substituição da isoforma α -MHC pela β -MHC parece ser comum na hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica e outros estímulos, e talvez contribua para alguns dos achados característicos desta condição – *i.e.* redução de velocidade de contração (Nadal-Ginard e Mahdavi, 1989; Swoap *et al.* 1995). Em nossos experimentos, não avaliamos a expressão da β -MHC, porém não devemos ignorar a possibilidade de sua influência sobre os resultados observados por nós – sobretudo a possível influência da β -MHC sobre o prolongamento do relaxamento do Tw e da CafNT no grupo *Coa7*.

5.3. CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DE MIÓCITOS

Neste contexto, avaliamos alguns aspectos do transporte de Ca^{2+} como possíveis mecanismos adaptativos ativados durante a instalação da hipertrofia por sobrecarga pressórica.

Uma de nossas abordagens, o estudo da *participação relativa dos transportadores de Ca^{2+}* (PR) no relaxamento de miócitos, fornece informações sobre o balanço dos fluxos de remoção de Ca^{2+} durante o relaxamento. Como a medida simultânea da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e encurtamento faz parte da rotina de muitos laboratórios que se ocupam do estudo da fisiologia de miócitos, consideramos interessantes estudar sob quais circunstâncias eram possíveis inferências sobre os fluxos de remoção de Ca^{2+} citosólico a partir de parâmetros da cinética de encurtamento – razão entre os $t_{1/2}$ s de relaxamento de diferentes tipos de contrações empregadas para o isolamento funcional dos transportadores durante o relaxamento. Para isto tivemos que estabelecer, numa certa faixa, uma relação entre relaxamento e queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para cada tipo de contração. A faixa na qual esta relação foi obtida estava compreendida entre 30% e 70% do relaxamento/queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a partir do encurtamento e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máximos. A fração do relaxamento, ΔL , foi relacionada à fração de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por meio de um coeficiente de acoplamento químico-mecânico que denominamos α . Uma condição para validade de nossa abordagem era que α fosse constante em todas as situações experimentais, ou seja, que o grupo experimental e que os tipos de contrações empregadas no isolamento funcional dos transportadores de Ca^{2+} não influenciassem a relação $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - ΔL . Quando avaliamos os valores de α entre os grupos experimentais não constatamos diferenças estatísticas. Entretanto, avaliando comparando valores de α obtidos para os diferentes tipos de contração, observamos que o ' α_{Caf00} ' não era significativamente diferente de α_{Tw} , mas era significativamente inferior a α_{CafNT} ($p < 005$). Talvez este fato possa ser explicado pelo efeito direto da cafeína sobre os miofilamentos, aumentando a sensibilidade destes ao Ca^{2+} (Wendt & Stephenson, 1983, O'Neill *et al.*, 1990). A contratura da CafNT é rápida e apresenta 2 componentes distintos – um componente fásico e rápido, associado à liberação de Ca^{2+} do RS, e outro, tônico e lento, que ocorre sem aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bassani *et al.*, 1993a). O componente tônico, de instalação mais lenta (1-3 s), é provavelmente devido à sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} (Wendt e Stephenson, 1983; O'Neill *et al.*, 1990). Já no caso da Caf00, o relaxamento do componente fásico é lento, pois os sistemas rápidos que atuam no relaxamento estão inibidos. Por isto, 50% do relaxamento ocorre mais de 5s após o pico, tempo no qual o componente tônico já se

encontra completamente instalado. Assim, em Caf00, mas não em CafNT, o $t_{1/2}$ de relaxamento é influenciado pelo efeito da cafeína sobre os miofilamentos.

Da variação dos α nos diferentes tipos de contração, pudemos concluir que o emprego de dados da cinética de relaxamento para inferências sobre o transporte de Ca^{2+} é possível, mas não sem restrições. A relação entre ΔL e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve ser conhecida em cada condição experimental empregada (Apêndice I). Os dados da cinética do relaxamento obtidos nestes experimentos e o α obtido experimentalmente e no modelo teórico de compartimentos foram empregados para estimar valores de PR para o RS, para a NCX e para os transportadores lentos. Estes valores de PR mostraram-se semelhantes em todos os grupos. Os valores de $t_{1/2}$ do relaxamento do Tw, CafNT e Caf00, foram corrigidos pelo α . As participações relativas dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento não se mostraram diferentes entre os grupos *Coa* e *Sh*, independente da correção dos $t_{1/2}$ s por α . Resultados semelhantes foram obtidos por McCall *et al.* (1988) em um estudo realizado 16 semanas após coarctação aórtica em ratos, que apresentaram uma redução proporcional da expressão / atividade da Serca2a (17 % do mRNA da Serca2a e 34 % da atividade da *A-RS*), redução do NCX (35% do mRNA do NCX e 10 % da captação de Ca^{2+} dependente de Na^+) e redução do PLB (17 % mRNA do PLB).

A manutenção do balanço dos fluxos de remoção de Ca^{2+} pelos transportadores *A-RS*, *NCX* e *LENTOS* não exclui a possibilidade de alteração destes fluxos em valor absoluto. Argumentos a favor desta possibilidade encontram-se em estudos que sugerem aumento da atividade da *A-RS* em fases precoces da hipertrofia, até 10 dias após início do estímulo (Limas *et al.*, 1980; Arai *et al.*, 1996; Ohkusa *et al.*, 1997; Nediani *et al.*, 2000). Estudos que mostram a tendência geral de aumento da expressão e da atividade da NCX também falam a favor desta hipótese (Kent *et al.*, 1993; Menick *et al.*, 1996; Studer *et al.*, 1997; Menick *et al.*, 2002; Ahmmed *et al.*, 2000; Meszaros *et al.*, 2001).

Estudando a atividade da NCX em animais após 4 ou 8 semanas de coarctação aórtica, Ahmmed *et al.* (2000) observaram aumento de uma corrente de entrada responsável por despolarizações tardias (I_{ti}) que atribuíram à NCX funcionando em seu modo direto. Estes achados foram acompanhados de aumento da $[\text{Na}^+]_i$, que também favorece o funcionamento da NCX em seu modo inverso (Ahmmed *et al.*, 2000).

Os resultados de Ahmmed *et al.* (2000) foram corroborados por Meszaros *et al.* (2001), que também observaram aumento desta corrente em ratos nos quais a hipertrofia foi induzida por

estimulação adrenérgica crônica (isoproterenol i.p. 5 mg/kg durante 7 dias), a qual é uma condição também presente na estenose aórtica (Siri, 1988; Akers *et al.*, 2000).

A manutenção das PRs dos transportadores de Ca^{2+} durante o relaxamento, juntamente com observações da literatura admitem a possibilidade de aumento da expressão e da atividade da *A-RS* e da NCX. Entretanto, quando avaliamos o relaxamento dos miócitos dos diversos grupos, observamos um aumento significativo do $t_{1/2}$ de relaxamento somente do Tw e da CafNT nos grupos *Coa*. As possíveis razões para este prolongamento não foram definidas experimentalmente. Alguns relatos da literatura comuns a casos de hipertrofia por coarctação aórtica – aumento da β -MHC na composição das fibrilas miocárdicas (Schiaffino *et al.*, 1989; Dorn *et al.*, 1994; Calderone *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1996; Haddad *et al.*, 1995), aumento da expressão de desmina e tubulina (Watkins *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999) – talvez possam servir para o entendimento deste prolongamento.

5.4. ATIVIDADE CONTRÁTIL DE MIÓCITOS EM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ DE 0,5MM, 1MM E 2MM

Em resultados obtidos em nosso laboratório, havíamos observado um aumento da atividade espontânea em resposta ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ em miócitos ventriculares de ratos (Bassani *et al.*, 2001). Nós havíamos observado também que a amplitude de contração evocada por estímulos elétricos apresentava uma relação direta com esta $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Bassani *et al.*, 2001). Entretanto Ito *et al.* (2000) apresentam resultados que mostram que esta relação deixa de existir com o progresso da hipertrofia. Neste estudo, Ito *et al.* (2000) mostraram que a amplitude de contração em resposta ao $[\text{Ca}^{2+}]_o$ era semelhante em miócitos de ratos controles e após 4 semanas de coarctação aórtica, mas apresentava-se deprimida 7 semanas após a cirurgia (redução da reserva contrátil).

Neste contexto, avaliamos a amplitude de contração evocada por estímulos elétricos na presença de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,5, 1 ou 2 mM) e observamos que a amplitude de *twitches* evocados por estimulação elétrica apresentava uma relação positiva com a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ mas não diferia significativamente entre os grupos *Sh* e *Coa* (tabela 4.4 e figura 4.4). Estes resultados são condizentes com relatos da literatura que descrevem manutenção da função contrátil durante a hipertrofia compensada (Canale *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 2000).

Sabe-se que a função contrátil está relacionada à mobilização de Ca^{2+} que ocorre no acoplamento excitação-contração, ocorrendo ganho no mecanismo de CICR.. Este ganho, por sua vez, depende do “gatilho” do CICR (I_{Ca}) e do conteúdo de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1995a). Estes autores comprovaram que alteração da amplitude de I_{Ca} ou da carga de Ca^{2+} do RS resulta em alterações estatisticamente significativas das frações de Ca^{2+} liberadas pelo RS durante uma contração. Em nossos experimentos não observamos alteração da amplitude das contrações de Caf00 observadas nos diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Portanto, este efeito inotrópico do $[\text{Ca}^{2+}]_o$ deve-se possivelmente ao aumento de I_{Ca} com o $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (Bassani *et al.*, 1995a).

5.5. PERDA DE Ca^{2+} DO RS DURANTE A PAUSA ESTIMULATÓRIA

Avaliando a frequência de contrações espontâneas durante pausa estimulatória em resposta à variação $[\text{Ca}^{2+}]_o$, observamos indistintamente nos grupos *Sh* e *Coa* uma relação positiva entre esta frequência e a $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Entretanto, a frequência de contrações espontâneas foi maior nos grupos *Coa* em todas as $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (vide tabela 4.8.A). Lukyanenko *et al.* (1999) determinaram a importância do conteúdo luminal de Ca^{2+} do RS para a perda espontânea de Ca^{2+} por esta organela. Embora não possamos fazer comparações do conteúdo de Ca^{2+} do RS entre os diferentes grupos, não constatamos nestes grupos variação significativa da carga de Ca^{2+} em função das $[\text{Ca}^{2+}]_o$, o que sugere que o Ca^{2+} perdido pelo RS durante a diástole possa ter sido recaptado (a variação da carga de Ca^{2+} do RS foi determinada pela amplitude da Caf00; tabela 4.7.A).

Para verificarmos se o maior aumento da frequência de contrações espontâneas em *Coa* poderia ser de fato atribuído à perda de Ca^{2+} do RS, analisamos a amplitude de Cf00s (índice de carga de Ca^{2+} do RS) antes e após pausa durante a qual foi favorecido efluxo de Ca^{2+} pela troca NCX. Durante a pausa estimulatória, a ausência de Ca^{2+} no meio extracelular favoreceu o funcionamento da NCX em seu modo direto e a extrusão de Ca^{2+} por este transportador (Bassani & Bers, 1994; Bers *et al.*, 1993; Ferraz *et al.*, 2001). A carga de Ca^{2+} remanescente no RS foi estimada pela razão de amplitudes das Cf00 pré- e pós-pausa. Os resultados obtidos mostraram que a redução da amplitude da Cf00 após a pausa foi maior nos grupos *Coa* do que nos grupos *Sh* e sugerem maior liberação espontânea diastólica de Ca^{2+} em miócitos de animais dos grupos *Coa* (tabela 4.9.A).

Alguns resultados da literatura falam a favor da hipótese de que miócitos expostos à sobrecarga pressórica requeiram maior mobilização de Ca^{2+} para manutenção da amplitude de contração e que esta mobilização esteja relacionada a um maior *turnover* deste íon (Shorofsky *et al.*, 1999). Um argumento direto que pode ser usado a favor desta hipótese encontra-se nos resultados obtidos *in vitro* por Ohkusa *et al.* (1997), que observaram aumento da perda e captação de Ca^{2+} em homogenatos de VE na presença de ATP 10 dias após a coarctação aórtica. Argumentos indiretos a favor do aumento da captação e perda de Ca^{2+} pelo RS podem ser encontrados em publicações que relatam aumento da atividade da A-RS (Arai *et al.*, 1996; Nediani *et al.*, 2000) e aumento da atividade espontânea na hipertrofia por sobrecarga pressórica ou em modelos transgênicos de hipertrofia (Bailey & Houser, 1993; Shorofsky *et al.*, 1999). Entretanto, o aumento da liberação espontânea de Ca^{2+} pelo RS não é de consenso na literatura, dependendo do modelo de hipertrofia e fase de evolução da mesma (Gomez *et al.*, 1997; Balke & Shorofsky, 1998).

Segundo Bers *et al.* (1998), a liberação espontânea de Ca^{2+} do RS depende, sobretudo da concentração de Ca^{2+} citosólica e da carga de Ca^{2+} do RS. Em nossos experimentos, a carga de Ca^{2+} do RS manteve-se constante diante de variações de $[\text{Ca}^{2+}]_o$, a liberação espontânea de Ca^{2+} foi analisada durante intervalos pré-determinados e não houve indícios de alteração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica (comunicação pessoal, Dra. Rosana Bassani). Tendo em vista as observações acima, buscamos explicações em mecanismos que alterem a ativação dos CLCR.

5.5.1. Fatores que influenciam a atividade dos CLCR

a) CSQ, RyR2

Os *canais de liberação de Ca^{2+} do RS* (CLCR) são tetrâmeros formados de quatro subunidades que contêm sítios receptores de rianodina, cuja isoforma cardíaca é RyR2 (Wagenknecht & Samso, 2002). A liberação de Ca^{2+} através destes canais é controlada por diversas proteínas do lado citosólico (FKBP12.6, PKA, e fosfatases (Marks, 2001) e, e do lado luminal (CSQ, junctina, triadina, Beard *et al.*, 2002). Quando ativados por Ca^{2+} (que adentra a célula principalmente via I_{Ca}), estes canais liberam Ca^{2+} para o citoplasma (CICR, *calcium induced calcium release*) (Fabiato, 1983, 1985).

A CSQ é uma proteína importante para o armazenamento de Ca^{2+} no RS (*buffer* de Ca^{2+}), mas tem também papel crucial no controle de estoque e na estabilização deste estoque (Beard et al; 2002;

Terentyev *et al.*, 2003). Terentyev *et al.* (2003) associam a redução da concentração intra-reticular de CSQ ao aumento de perda de Ca^{2+} do RS e ao aumento da probabilidade de arritmias. No entanto, não observamos no presente estudo diferenças significativas entre os níveis de mRNA de CSQ e RyR2 dos grupos *Coa* e *Sh*. Há na literatura relatos de que a superexpressão de CSQ pode resultar em hipertrofia e cardiomiopatia (Schmidt *et al.*, 2000; Linck *et al.*, 2000; Knollmann *et al.*, 2000). Entretanto há muitos casos de hipertrofia nos quais se observam níveis inalterados de CSQ em (Takahashi *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1996; Shorofsky *et al.*, 1999).

Embora grande parte da literatura relate casos de aumento dos níveis de mRNA da RyR2 em resposta de estímulos hipertróficos (Cadre *et al.*, 1998; Lehnart *et al.*, 1998), há também resultados que mostram redução ou ainda ausência de alteração destes níveis (McCall *et al.*, 1998; Shorofsky *et al.*, 1999; Kogler *et al.*, 2003). Não há, portanto, uma relação rígida entre expressão da RyR2 e hipertrofia. Quando avaliamos a expressão do RyR normalizada pela da β -actina, não observamos diferença significativa entre *Sh7* e *Coa7*.

b) FKBP12.6

Marks (2001) e Marks *et al.* (2002a, b) atribuem o aumento da atividade espontânea observada em casos de hipertrofia e insuficiência cardíaca à alteração do controle exercido pela FKBP12.6 sobre os CLCR. A FKBP12.6 é uma proteína regulatória que estabiliza o CLCR. Quando RyR2 é fosforilado pela PKA, FKBP12.6 dissocia-se dos RyR2, tornando instáveis os CLCR, que apresentam aberturas frequentes a valores diastólicos de $[\text{Ca}^{2+}]$, em estados de subcondutância, favorecendo a perda de Ca^{2+} (Marx *et al.*, 2000). Segundo Marks *et al.* (2002a, b), a ativação adrenérgica e situações que indiretamente favoreçam o aumento do tônus adrenérgico, favorecem também o aumento da probabilidade de abertura dos CLCR e perda de Ca^{2+} do RS. Entretanto, não podemos afirmar que este argumento caiba em nossa situação experimental (miócitos isolados em perfusão), pois não há experimentos que comprovem a manutenção da fosforilação dos CLCR após o isolamento. No entanto, alguns autores contestam que o aumento da frequência de *sparks* em miócitos sob estimulação beta-adrenérgica seja devido à fosforilação de RyR2 por PKA e conseqüente dissociação da FKBP12.6 (Jiang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Stange *et al.*, 2003). Li *et al.* (2002) atribuíram o aumento da atividade espontânea sob estimulação adrenérgica somente ao aumento da carga de Ca^{2+} do RS e conseqüente vazamento de Ca^{2+} , decorrente de fosforilação do PLB, que resulta em aumento da captação de Ca^{2+} pelo RS. No entanto, novas evidências para a

fosforilação direta do RyR decorrente da atividade adrenérgica foram apresentadas por Wehrens *et al.* (2004). Estes autores confirmaram que a fosforilação dos RyR pela PKA (no resíduo serina 2809) leva a dissociação da FKBP12.6 e transição dos CLCR para um estado de subcondutância.

c)CamKII

Um dos mecanismos de regulação da probabilidade de abertura do CLCR é a fosforilação deste pela *proteína quinase ativada por calmodulina*, CaMKII. A fosforilação de RyR e PLB, substratos desta enzima, está associada respectivamente a uma maior liberação e maior recaptação de Ca^{2+} pelo RS (Davis *et al.*, 1983; Witcher *et al.*, 1991; Hain *et al.*, 1995; Maier & Bers, 2002; Maier *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Currie *et al.*, 2004; Maier & Bers, 2002; Wehrens *et al.* 2004).

Bassani *et al.* (1995b) mostraram que a inibição tanto da CaMKII quanto da PKA promoviam redução significativa da taxa da queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e prolongamento do relaxamento mecânico em miócitos ventriculares intactos. Há evidências experimentais de que a CaMKII fosforila o PLB e reduz seu efeito inibitório sobre a captação de Ca^{2+} pela ATPase do RS. Hagemann *et al.* (2000) mostraram que PLB pode ser fosforilado na Thr-17 pela CaMKII independente da fosforilação da Ser-16 pela PKA e mostraram também que o nível de fosforilação do PLB na Thr-17 pela CaMKII está relacionado a uma maior taxa de relaxamento. Ao contrário do efeito da fosforilação de PKA, atribuído à redução do $Km_{\text{Ca}^{2+}}$, a fosforilação do PLB pela CaMKII resulta em aumento da velocidade máxima de transporte da A-RS (Kranias, 1985; Li *et al.*, 1998; Hagemann *et al.*, 2000).

Muitas evidências falam a favor de um aumento da expressão e da função da CaMKII δ , isoforma cardíaca dominante da CaMKII, em resposta à sobrecarga pressórica aguda e durante a hipertrofia e insuficiência cardíaca (Boknik *et al.*, 2001; Colomer *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Colomer *et al.* (2003) observaram aumento da quantidade e da atividade da CaMKII 7 dias após coarctação aórtica em ratos. Estes resultados foram corroborados e estendidos por Zhang *et al.* (2003), que demonstraram, não somente aumento dos níveis de proteína da isoforma cardíaca CamKII δ_C , mas também de sua atividade de auto-fosforilação 2 e 7 dias após a coarctação da aorta, situação na qual também havia aumento da fosforilação de PLB e RyR.

O aumento da expressão da CaMKII na hipertrofia e da sua atividade sobre a A-RS e PLB, faz com que ela talvez possa ser considerada para explicação de nossa hipótese sobre um maior *turnover* de Ca^{2+} entre o citosol e o RS.

d) Sorcina

Outra proteína citosólica com atividade sobre os CLCR é a sorcina, ubíqua em diversos tecidos, inclusive o cardíaco, onde se localiza preferencialmente nas proximidades dos túbulos-T (Meyers *et al.*, 1995). Assim como a FKBP12.6, a sorcina inibe a abertura do CLCR e liberação de Ca^{2+} pelo mesmo, um efeito que é neutralizado quando a esta proteína é fosforilada pela PKA (Lokuta *et al.*, 1997). Mesmo sob carga de Ca^{2+} do RS constante, a liberação de Ca^{2+} pelos CLCR pode ser aumentada pela fosforilação da sorcina pela PKA (Lokuta *et al.*, 1997; Farell *et al.*, 2003).

Segundo Meyers *et al.* (2003), a sorcina também se encontra associada aos canais de Ca^{2+} do tipo L. A superexpressão da sorcina, observada em miócitos de animais transgênicos, acelera a inativação da corrente de Ca^{2+} do tipo L, o que foi observado pela redução da constante de tempo desta corrente. Em experimentos realizados em ratos de linhagem que desenvolve hipertensão arterial espontânea (SHR), estes autores observaram redução no grau de co-localização normalmente existente de sorcina e RyR2, e redução do efeito inibitório da sorcina sobre o RyR2. Estes autores também apresentam resultados que mostram que a superexpressão de sorcina reduz o influxo de Ca^{2+} via canais do tipo L. Estes resultados sugerem que uma redução da atividade da sorcina é compatível com aumento da liberação de Ca^{2+} pelo RS e do influxo de Ca^{2+} (I_{Ca}). Entretanto, esta hipótese não foi avaliada experimentalmente em nosso trabalho.

5.5.2. Hipertrofia e Susceptibilidade à Arritmias

Considerando a manutenção das $\text{PR}_{\text{A-RbS}}$ nos grupos *Sh* e *Coa*, a maior perda de Ca^{2+} pelo RS nos grupos *Coa*, e a possibilidade de maior captação de Ca^{2+} neste grupo, sugerimos a possibilidade de um aumento do *turnover* de Ca^{2+} entre citosol e RS. Uma vez que a PR_{NCX} é semelhante entre os grupos, então devemos também admitir a possibilidade de aumento do *turnover* de Ca^{2+} entre citosol e meio extra-celular.

Durante a liberação espontânea de Ca^{2+} sob manutenção do E_m em -80 mV, Trafford *et al.* (1995) observaram um acúmulo transitório de Ca^{2+} no espaço submembranar. O acúmulo do Ca^{2+} perdido pelo RS (ou não captado por esta organela) em regiões próximas ao sarcolema aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no espaço submembranar, estimulando a extrusão de Ca^{2+} via I_{NCX} (Lipp e Pott 1988a, b; Huser *et al.*, 1988; Schlotthauer e Bers, 2000; Trafford *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2002). Como esta

extrusão de Ca^{2+} gera uma corrente iônica de entrada de cátions, este mecanismo pode favorecer atividade espontânea e arritmias (DADs, *delayed after depolarizations*) (Bers, 2002).

Alterações eletrofisiológicas observadas durante a hipertrofia, como o aumento da duração do potencial de ação e alterações das propriedades cinéticas das correntes de potássio responsáveis pela repolarização inicial durante o potencial de ação (corrente transiente de saída (I_{to})) e de correntes K^+ ativas na repolarização tardia, bem como da corrente retificadora de entrada (I_{K1}), são potencialmente arritmogênicas.

I_{K1} estabiliza o E_m diastólico em valores próximos ao potencial de equilíbrio do potássio (E_K), pois a membrana apresenta alta condutância a este íon durante a diástole. Isto dificulta a despolarização da membrana, sobretudo, por requerer correntes despolarizantes de maior magnitude para levar o E_m até o limiar de estimulação. Desta forma, uma maior I_{K1} protege contra a ocorrência de arritmias (Bers, 2001). Por outro lado, o decréscimo de I_{K1} resulta em maior instabilidade de E_m diastólico, maior excitabilidade celular e propensão a arritmias, que são favorecidas por despolarizações secundárias a perda de Ca^{2+} pelo RS (Bers, 2002). Volk *et al.* (2001) constataram todas estas alterações – aumento da duração do potencial de ação e redução de correntes repolarizantes de K^+ – em miócitos de ratos após 7 dias de coarctação aórtica.

5.6. HIPERTROFIA E REATIVIDADE ADRENÉRGICA (MODULAÇÃO B-ADRENÉRGICA)

Um outro mecanismo adaptativo potencialmente relevante na hipertrofia consiste na modulação (regulação da densidade, desensitização) dos receptores β -adrenérgicos durante a evolução da hipertrofia. Neste período ocorrem mudanças na sinalização adrenérgica – redução da densidade de receptores adrenérgicos β_1 e alteração da razão entre receptores β_1/β_2 . Ao longo da instalação da hipertrofia até a insuficiência cardíaca, há relatos de redução crescente dos receptores β_1 . Na insuficiência cardíaca crônica, há redução da densidade dos receptores adrenérgicos β_1 atinge os 50% (Bristow *et al.*, 1982, 1986). Como os receptores β_1 constituem de 75 a 80% da população de receptores adrenérgicos cardíacos (Vogelsang *et al.*, 1992), a importância relativa dos receptores β_2 no controle da função cardíaca cresce consideravelmente nesta situação. Zhou *et al.* (1999, 2000) sugerem que o número de receptores β_2 espontaneamente ativados poderia ser maior em casos de superexpressão deste receptor e que um de seus efeitos é o aumento do *turnover* de Ca^{2+} com

finalidade de manter a contratilidade, tendo como efeito paralelo o aumento da liberação espontânea de Ca^{2+} do RS. Entretanto, não há relatos da literatura sobre diminuição da densidade de receptores adrenérgicos $\beta 1$ e/ou aumento de receptores $\beta 2$ após a coarctação aórtica, para que admitamos a hipótese de a atividade espontânea observada em nossos animais *Coa2* e *Coa7* seja atribuída ao aumento da população de receptores $\beta 2$.

Akers *et al.* (2000), estudando o curso temporal da hipertrofia cardíaca induzida por coarctação aórtica, não observaram alteração da densidade ou proporção dos receptores $\beta 1$ ou $\beta 2$ no período estudado (3 a 60 dias). Entretanto, Communal *et al.* (1998) observaram redução da densidade de receptores $\beta 1$ 4 semanas após a coarctação aórtica, e Moalic *et al.* (1993), 3 semanas após a coarctação aórtica e hipertrofia compensada.

A eventual contribuição de uma possível modulação dos receptores β -adrenérgicos para os efeitos observados na função cardíaca e de miócitos durante as diferentes fases da hipertrofia não deve ser desconsiderada.

Considerando nossos resultados em conjunto, observamos nos grupos *Coa* maior atividade espontânea diastólica, maior perda de Ca^{2+} do RS durante a pausa sob estimulação da NCX, manutenção da $\text{PR}_{\text{A-RS}}$ e aumento da razão dos mRNAs de Serca2a/PLB. Tais achados sugerem um aumento do *turnover* de Ca^{2+} entre citosol e possivelmente maior mobilização de Ca^{2+} durante o regime estacionário. Como a PR_{NCX} é semelhante para os grupos *Coa* e *Sh*, e há indícios de aumento do mRNA da NCX ($p = 0,068$), é possível que também haja um aumento do *turnover* de Ca^{2+} entre citosol e meio extracelular. Resultados que sugerem maior mobilização de Ca^{2+} durante a hipertrofia também foram obtidos por Shorofsky *et al.* (1999) em ratos espontaneamente hipertensos. Estes autores observaram que, para desenvolver uma mesma amplitude de contração, miócitos de ratos espontaneamente hipertensos requeriam maiores transientes de Ca^{2+} do que miócitos controle.

Em conjunto, nossos resultados estão em concordância com observações anteriores que apontam para a existência de uma maior mobilização de Ca^{2+} associada à manutenção da função contrátil frente ao aumento de pós-carga. Por outro lado, o aumento da mobilização de Ca^{2+} pode funcionar como um fator desencadeante de para a atividade espontânea, tendo como causa primária a perda de Ca^{2+} a partir do RS durante a diástole.

6. Conclusões

Nossos experimentos de biologia molecular apontam para um aumento da razão entre os mRNAs da Serca2a/PLB no grupo *Coa7*, resultados compatíveis a possibilidade de maior captação de Ca^{2+} pelo RS neste grupo durante o relaxamento dos miócitos. Os níveis de mRNA para a NCX também se mostraram aumentados, admitindo a possibilidade de aumento da extrusão de Ca^{2+} seja durante o relaxamento ou durante a pausa estimulatória.

Avaliando a participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} durante o relaxamento de miócitos isolados, não constatamos diferenças entre os grupos *Sh* e *Coa*, o que aponta para uma manutenção do balanço dos fluxos de remoção de Ca^{2+} durante o relaxamento. No entanto, observamos um prolongamento do curso temporal do relaxamento da contração evocada por estímulos elétricos e da contratura de cafeína em NT, prolongamento que não pôde ser atribuído à redistribuição dos fluxos de remoção de Ca^{2+} citosólico.

Comparando os cálculos da participação relativa a partir dos $t_{1/2}$ s do relaxamento com cálculos obtidos a partir de $t_{1/2}$ s do curso temporal da queda da concentração de Ca^{2+} citosólico, concluímos que a primeira abordagem é possível, embora requeira cautela, pois a relação entre encurtamento e queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ser considerada linear apenas em uma determinada faixa destes parâmetros e sob determinadas circunstâncias.

O aumento da frequência da atividade contrátil espontânea em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+} extracelular foi observado em ambos os grupos, *Sh* e *Coa*. No entanto os animais do grupo *Coa* apresentaram maior aumento da frequência basal da atividade espontânea do que os animais *controle* (*Sh*). Uma possível explicação para a atividade espontânea durante a pausa é a perda de cálcio do RS. O aumento da perda de Ca^{2+} pelo RS não é descartado, pois durante pausa sob estimulação da NCX em seu modo direto, observamos maior redução do conteúdo de Ca^{2+} do RS nos grupos *Coa*.

Em conjunto estes resultados sugerem um maior *turnover* de Ca^{2+} entre RS e citosol e manutenção da resposta contrátil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDLEY DJ. The Physiology of Excitable Cells. 4th Ed. Cambridge University Press, 1998.

AHMED GU, DONG PH, SONG G, BALL NA, XU Y, WALSH RA, CHIAMVIMONVAT N. Changes in Ca^{2+} cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.*; 86: 558-570, 2000.

AKERS WS, CROSS A, SPETH R, DWOSKIN LP, CASSIS LA. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol.)*; 279: H2797-H2806, 2000.

AKHTER SA, LUTTRELL LM, ROCKMAN HA, IACCARINO G, LEFKOWITZ RJ, KOCH WJ. Targeting the receptor-G(q) interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*; 280:574-577, 1998.

ANVERSA P, VITALI-MAZZA L, GANDOLFI A, LOUD AV. Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. A light microscopic study. *Lab Invest.*; 33: 125-9, 1975.

ANVERSA P, LOUD AV, VITALI-MAZZA L. Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. An electron microscopic study. *Lab Invest.*; 35, 475-483, 1976.

ANVERSA P, LOUD AV, GIACOMELLI F, WIENER J. Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. *Lab Invest.*; 38: 597-609, 1978.

ANVERSA P, RICCI R, OLIVETTI G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol.*; 7: 1140-9, 1986.

ANVERSA P, PALACKAL T, SONNENBLICK EH, OLIVETTI G, CAPASSO JM. Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Invest.*; 85: 994-7, 1990.

ANVERSA P, CAPASSO JM, OLIVETTI G, SONNENBLICK EH. Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens.*; 5(10):758-70, 1992.

APSTEIN CS, LORELL BH. The physiological basis of left ventricular diastolic dysfunction. *J Card Surg.*; 3: 475-85, 1988.

ARAI M, SUZUKI T, NAGAI R. Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but downregulated in severe cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 28; 1583-1590, 1996.

AZAD AA. Cytoplasmic RNA from hen reticulocytes, mouse sarcoma 180 ascites cells, rat liver and barley embryos. Their preparation and purification by a standard procedure and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis. *Comp Biochem Physiol B.*; 61:213-8, 1978.

BACKX P H, DE TOMBE PP, VAN DEEN JHK, MULDER BJM, TER KEURS HEDJ. A model of propagating Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by diffusion. *J. Gen. Physiol.* 93: 963-977, 1989.

BADENHORST D, MASEKO M, TSOTETSI OJ, NAIDOO A, BROOKSBANK R, NORTON GR, WOODIWISS AJ. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res.*; 57: 632-41, 2003.

BAILEY, B. A., DIPLA, K., LI, S., AND HOUSER, S. R. Cellular basis of contractile derangements of hypertrophied feline ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 29: 1823–1835, 1997.

BAILEY BA, HOUSER SR. Sarcoplasmic reticulum-related changes in cytosolic calcium in pressure-overload-induced feline LV hypertrophy. *Am J Physiol. (Circ. Physiol.)*; 265: H2009-16, 1993.

BAKER DL, HASHIMOTO K, GRUPP IL, JI Y, REED T, LOUKIANOV E, GRUPP G, BHAGWHAT A, HOIT B, WALSH R, MARBAN E, PERIASAMY M. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res.*; 83: 1205-14, 1998.

BALKE CW, SHOROFISKY SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.*; 37: 290-9, 1998.

BASSANI JWM, BASSANI RA, BERS DM. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol (London).*; 460: 603-21, 1993a.

BASSANI JMW, BASSANI RA, BERS DM. Twitch-dependent SR Ca^{2+} accumulation and release in rabbit cardiac myocytes. *Am J. Physiol., Cell Physiol.*; 265: C533-C540, 1993b.

BASSANI JWM, YUAN W, BERS DM. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*; 268: C1313-C1329, 1995a.

BASSANI RA, BASSANI JW, BERS DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.*; 453:591-608, 1992.

BASSANI RA, BASSANI JWM, BERS DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.*; 476: 279-293, 1994a.

BASSANI RA, BASSANI JW, BERS DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *J Physiol.*; 476: 295-308, 1994b.

BASSANI RA, MATTIAZZI A, BERS DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.(Heart and Circ. Physiol.)*; 268: H703-12, 1995b.

BASSANI RA, BASSANI JWM. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am J Physiol. (Heart Circ Physiol.)*; 282: H2406-13, 2002.

BASSANI RA, BASSANI JW, LIPSIOUS SL, BERS DM. Diastolic SR Ca efflux in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes. *Am J Physiol. (Circ Physiol.)*; 273: H886-92, 1997.

BASSANI RA, BERS DM. Na-Ca Exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 26: 1335-1347, 1994.

BASSANI RA, BERS DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 68: 2015-2022, 1995.

BASSANI RA, CARVALHO BMR, BASSANI, JWM. Encurtamento de miócitos ventriculares: dependência da concentração extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Anais, Vol. 1, pp.281-281, 2001.

BEARD NA, SAKOWSKA MM, DULHUNTY AF, LAVER DR. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys. J.*; 82: 310-320, 2002.

BERS DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

BERS DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res.*; 90: 14-17, 2002.

BERS DM, BASSANI JW, BASSANI RA. Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.*; 27: 1772-7, 1993.

BERS DM, BRIDGE JH, MACLEOD KT. The mechanism of ryanodine action in rabbit ventricular muscle evaluated with Ca-selective microelectrodes and rapid cooling contractures. *Can J Physiol Pharmacol.*; 65(4): 610-8, 1987.

BERS DM, LI L, SATOH H, MCCALL E. Factors that control sarcoplasmic reticulum release in intact ventricular myocytes. *Ann NY Acad Sci.*; 853: 157-177, 1998.

BEHR TM, NERURKAR SS, NELSON AH, COATNEY RW, WOODS TN, SULPIZIO A, CHANDRA S, BROOKS DP, KUMAR S, LEE JC, OHLSTEIN EH, ANGERMANN CE, ADAMS JL, SISKI J, SACKNER-BERNSTEIN JD, WILLETTE RN. Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation.*; 104: 1292-8, 2001.

BIDASEE K, DINÇER D, BESCH HR JR. Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Pharmacol.*; 60 :1356–1364, 2001.

BLAUSTEIN MP, LEDERER WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Reviews*; 79: 763-837, 1999.

BOKNIK P, HEINROTH-HOFFMAN I, KIRCHHEFER U, KNAPP J, LINCK B, LUSS H, MULLER T, SCHMITZ W, BRODDE OE, NEUMANN J. Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc Res.*; 51: 717–728, 2001.

BRAUNWALD E. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine (Single Volume)*. Braunwald E, Zipes DP. Libby P, editores. Saunders Co, 6a Ed., Philadelphia, 2001.

BUENO OF, DE WINDT LJ, LIM HW, TYMITZ KM, WITT SA, KIMBALL TR, MOLKENTIN JD. The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res.*; 88: 88-96, 2001.

BRISTOW MR, GINSBURG R, MINOBE W, CUBICCIOTTI RS, SAGEMAN WS, LURIE K, BILLINGHAM ME, HARRISON DC, STINSON EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.*; 307: 205–211, 1982.

BRISTOW MR, GINSBERG R, UMANS V, FOWLER M, MINOBE W, RASMUSSEN R, ZERA P, MENLOVE R, SHAH P, JAMIESON S. $\beta 1$ – and $\beta 2$ adrenergic receptor sub-populations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective $\beta 1$ -receptor downregulation in heart failure. *Circ Res.*; 59: 297–309, 1986.

BRITTSAN AG, GINSBURG KS, CHU G, YATANI A, WOLSKA BM, SCHMIDT AG, ASAHIM, MACLENNAN DH, BERS DM, KRANIAS EG. Chronic SR Ca^{2+} -ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca^{2+} transport. *Circ Res.*; 92: 769-76, 2003.

BUSCA R, ABBE P, MANTOUX F, ABERDAM E, PEYSSONNAUX C, EYCHENE A, ORTONNE JP, BALLOTTI R. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J*; 19: 2900-2910, 2000.

CADRE BM, QI M, EBLE DM, SHANNON TR, BERS DM, SAMAREL AM. Cyclic stretch down-regulates calcium transporter gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.*; 30: 2247-59, 1998.

CALDERONE A, TAKAHASHI N, IZZO NJ JR, THAIK CM, COLUCCI WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circ.*; 92: 2385-90, 1995.

CAMARGO AC. Centro de Tratamento e Pesquisa do hospital do Câncer - <http://www.hcanc.org.br/outrasinfs/ensaios/colest2.html>. Acessado em 10 de dezembro de 2003.

CAMPBELL SE, KORECKY B, RAKUSAN K. Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res.*; 68: 984-96, 1991.

CANALE ED, CAMPBELL GR, SMOLICH JJ, CAMPBELL JH, OKSCHE A, VOLLRATH L. Cardiac Muscle.(Handbook of Microscope Anatomy, VII).Springer-Verlag, Berlin; p.27-43, 190-191, 1986.

CANNELL, M. B., CHENG, H. & LEDERER, W. J. Spatial nonuniformities in $[Ca^{2+}]_i$ during excitation contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophysical Journal* 67, 1942—1956, 1994.

CHENG H, LEDERER MR, LEDERER WJ, CANNELL MB. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol. (Cell Physiol.)*; 270: C148-59, 1996.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*; 162: 156-9, 1987.

CHU G, KRANIAS EG. Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models. *Basic Res Cardiol.*; 97 (Suppl 1): I43-8, 2002.

CINGOLANI OH, YANG XP, LIU YH, VILLANUEVA M, RHALEB NE, CARRETERO OA. Reduction of cardiac fibrosis decreases systolic performance without affecting diastolic function in hypertensive rats. *Hypertension.* 43: 1067-1073, 2004.

COLOMER JM, MAO L, ROCKMAN HA, MEANS AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol.*; 17: 183-92, 2003.

COMMUNAL C, RIBUOT C, DURAND A, DEMENGE P. Myocardial beta-adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Fundam Clin Pharmacol.*; 12: 590-8, 1998.

COOPER G. Load and length regulation of cardiac energetics. *Annu Rev Physiol* 52: 505–22, 1990.

COOPER G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 48: 13–23, 1997.

CORNEA RL, AUTRY JM, CHEN Z, JONES LR. Reexamination of the role of the leucine/isoleucine zipper residues of phospholamban in inhibition of the Ca^{2+} pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*; 275: 41487-94, 2000.

CROZATIER B. Stretch-induced modifications of myocardial performance: from ventricular function to cellular and molecular mechanisms. *Cardiovasc Res.*; 32: 25-37, 1996.

CURRIE S, LOUGHREY CM, CRAIG MA, SMITH GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J.*; 377: 357-66, 2004.

DAVIA K, DAVIES CH, HARDING SE. Effects of inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. *Cardiovasc. Res.* 33; 88-97, 1997.

DAVIS BA, SCHWARTZ A, SAMAHA FJ, KRANIAS EG. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium/calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.*; 258: 13587-13591, 1983.

DAY DA, TUIE MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol.*; 157: 361-71, 1998.

DE LA BASTIE D, LEVITSKY D, RAPPAPORT L, MERCADIER JJ, MAROTTE F, WISNEWSKY C, BROVKOVICH V, SCHWARTZ K, LOMPRES AM. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res.*; 66: 554-64, 1990.

DE OLIVEIRA CF, CINTRA KA, TEIXEIRA SA, DE LUCA IM, ANTUNES E, DE NUCCI G. Development of cardiomyocyte hypertrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. *Eur J Pharmacol.*; 391: 121-6, 2000.

DELBRIDGE, LMD; SATOH, H, YUAN, W, BASSANI, JWM, QI, M, GINSBURG, KS; SAMAREL, AM & BERS, DM. Cardiac volume, Ca²⁺ fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overloaded hypertrophy. *Am. J. Physiol.*; 272: H2425-35, 1997.

DERUMEAUX G, MULDER P, RICHARD V, CHAGRAOUI A, NAFEH C, BAUER F, HENRY JP, THUILLIEZ C. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation.*; 105: 1602-8, 2002.

DI FUSCO F, ANAND-SRIVASTAVA MB. Enhanced expression of Gi proteins in non-hypertrophic hearts from rats with hypertension-induced by L-NAME treatment. *J Hypertens.*; 18: 1081-90, 2000.

DOMINGOS PP, FONSECA PM, NADRUZ W JR., FRANCHINI KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*; 282: H556–H564, 2002.

DORN GW 2ND, ROBBINS J, BALL N, WALSH RA. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol (Circ.Physiol.)*; 267: H400-5, 1994.

EDMUNDS LH Jr. Cardiac Surgery in the Adult. Editor EDMUNDS LH Jr. Mc Graw Hill, New York, NY., 1997.

ELEFThERIADES, E. G., J. B. DURAND, A. G. FERGUSON, L. ENGELMANN, S. B. JONES, AND A. M. SAMAREL. Regulation of procollagen metabolism in the pressure-overloaded rat heart. *J. Clin. Invest.* 91: 1113-1122, 1993.

http://ajpheart.physiology.org/cgi/external_ref?access_num=8450041&link_type=MED.

ESPOSITO G, PRASAD SV, RAPACCIUOLO A, MAO L, KOCH WJ, ROCKMAN HA. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation*; 103: 1453–1458, 2001.

ESPOSITO G, RAPACCIUOLO A, PRASAD SVN, ROCKMAN HA. Cardiac hypertrophy: role of G Protein–Coupled Receptors. *Journal of Cardiac Failure*; 8 (6 Suppl), 2002.

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

FABIATO A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol.*; 85: 247-89, 1985.

FARELL EF, ANTARAMIAN A, RUEDA A, GÓMEZ AM, VALDIVIA HH. Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *J. BIOL. CHEM.*; 278: 34660–34666, 2003.

FELDMAN AM, WEINBERG EO, RAY PE, LORELL BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res.*; 73: 184-92, 1993.

FERRAZ SA, BASSANI JWM, BASSANI RA. Rest-dependence of twitch amplitude and sarcoplasmic reticulum cCalcium cContent in the developing rat myocardium. *J. Mol Cell Cardiol* 33: 711-722, 2001.

FITZSIMONS DP, PATEL JR, MOSS RL. Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium. *J Physiol.*; 513: 171-83, 1998.

FLESCH M, SCHWINGER RHG, SCHIFFER F, FRANK K, SÜDKAMP M, KUHN-REGNIER F, ARNOLD G, BÖHM M. Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circ.*; 94: 992-1002, 1996.

FLESCH M, SCHIFFER F, ZOLK O, PINTO Y, ROSENKRANZ S, HIRTH-DIETRICH C, ARNOLD G, PAUL M, BOHM M. Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension.*; 30: 383-91, 1997.

FRANCHINI KG. *Biologia Molecular. Mecanismos moleculares na hipertrofia cardíaca. Estímulos hipertróficos. Hipertensão.* 5: 112-117, 2002.

FRANCHINI KG, TORSONI AS, SOARES PHA, SAAD MJA. Early Activation of the multicomponent signaling Complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.*; 87: 558-565, 2000.

FRANK KF, BOLCK B, BRIXIUS K, KRANIAS EG, SCHWINGER RH. Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol.*; 97 Suppl 1: I72-8, 2002.

FREUDENRICH CC. <http://health.howstuffworks.com/muscle3.htm>, acessado em 10/04/2004.

FUCHS F, SMITH SH. Calcium, cross-bridges and the Frank-Starling relationship. *News Physiol. Sci.*; 16: 5-10, 2001.

FULLER SJ, GILLESPIE-BROWN J E SUGDEN PH. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol. Chem.*; 273: 18146-18152, 1998.

FUSTER V, ALEXANDER RW, O'ROURKE RA, ROBERTS R, KING III SB, WELLENS HJJ. Molecular and cellular control of cardiac growth and hypertrophy. In: **Hurst's The Heart.** by

Valentin Fuster (Editor), R. Wayne Alexander, Fuster Alexander, Hein J. J. Wellens. McGraw-Hill Professional; 10th Ed., 2000.

GANIM JR, LUO W, PONNIAH S, GRUPP I, KIM HW, FERGUSON DG, KADAMBI V, NEUMANN JC, DOETSCHMAN T, KRANIAS EG. Mouse phospholamban gene expression during development in vivo and in vitro. *Circ. Res.*; 71: 1021-1030, 1992.

GARDNER, ERNEST DEAN, GRAY, DONALD JAMES, O' RAHILLY, ROMAN. *Anatomia: estudo regional do corpo humano*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

Gen Bank Access code. National Institute of Health (NIH). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>

GOLDMAN DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J.Gen.Physiol.*; 27: 37-60, 1943.

GOMES PAP. Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de $[Ca^{2+}]_i$ e limiar de estimulação. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e Ciências de Computação da Universidade Estadual de Campinas (FEEC / UNICAMP), pág. 46, 1997.

GÓMEZ AM, VALDIVIA HH, CHENG H, LEDERER MR, SANTANA LF, CANNELL MB, MCCUNE SA, ALTSCHULD RA, LEDERER WJ. Defective Excitation-Contraction Coupling in Experimental Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Sci*. 276: 800-806, 1997.

GRAY, HENRY. *Tratado de Anatomia Humana*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GRAY H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918. 20th ed revised and re-edited by Warren H. Lewis; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/. ON-LINE ED.:Published May 2000 by Bartleby.com.Inc © , 2000.

GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT, LEVONTIN RC, GELBART WM. An Introduction to Genetic Anaysis. 7th. W. H. Freeman and Company, New York, pags. 388-390, 2000.

GROSSMAN W. Diastolic dysfunction and congestive heart failure. *Circulation.*; 81(2 Suppl): III 1-7, 1990.

GUYTON, AC. Membrane Potentials and Action Potentials. Em: Textbook of Medical Physiology. Guyton, AC (ed). 7^a ed. Philadelphia, W.B.Saunders Co. Chap. 10, 1986.

GUYTON, AC. Fisiologia Humana. (Seção III: Músculo; Seção V: O Sistema Cardiovascular). Guyton, AC (ed). 6^a ed. Rio de Janeiro.Guanabara Koogan, 1988.

GWATHMEY JK, COPELAS L, MACKINNON R, SCHOEN FJ, FELDMAN MD, GROSSMAN W, MORGAN JP. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61: 70–6, 1987.

HADDAD F, BODELL PW, BALDWIN KM. Pressure-induced regulation of myosin expression in rodent heart. *J Appl Physiol.*; 78: 1489-95, 1995.

HAGEMANN D, KUSCHEL M, KURAMOCHI T, ZHU W, CHENG H, XIAO RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.*; 275: 22532-6, 2000.

HAIN J, ONOUE H, MAYRLEITNER M, FLEISCHER S, SCHINDLER H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*; 270: 2074-2081, 1995.

HICKS MJ, SHIGEKAWA M, KATZ AM. Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.*; 44: 384-91, 1979.

HO PD, ZECHNER DK, HE H, DILLMANN WH, GLEMBOTSKI CC, MCDONOUGH PM. The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*; 273: 21730–21735, 1998.

HOBAL IA, O'ROURKE B. Enhanced Ca^{2+} -Activated Na^{+} - Ca^{2+} exchange activity in canine Pacing-induced heart failure. *Circ Res.*; 87:690-698, 2000.

HROPOT M, GROTSCH H, KLAUS E, LANGER KH, LINZ W, WIEMER G, SCHOLKENS BA. Ramipril prevents the detrimental sequels of chronic NO synthase inhibition in rats: hypertension, cardiac hypertrophy and renal insufficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; 350: 646-52, 1994.

HUGGINS CE, DOMENIGHETTI AA, PEDRAZZINI T, PEPE S, DELBRIDGE LM. Elevated intracardiac angiotensin II leads to cardiac hypertrophy and mechanical dysfunction in normotensive mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 4: 186-90, 2003.

HURTEAU GJ, SPIVACK SD. mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. *Anal Biochem.*; 307: 304-15, 2002.

HUSER J, BERS DM, BLATTER LA. Subcellular properties of $[Ca^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. *Am J Physiol. (Circ. Physiol.)*; 274: H1800-11, 1988.

INUI M, CHAMBERLAIN BK, SAITO A, FLEISCHER S. The nature of the modulation of Ca^{2+} transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*; 261: 1794-800, 1986.

ISHIBASHI Y, TSUTSUI H, YAMAMOTO S, TAKAHASHI M, IMANAKA-YOSHIDA K, YOSHIDA T, URABE Y, SUGIMACHI M, TAKESHITA A. Role of microtubules in myocyte contractile dysfunction during cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol. (Heart Circ Physiol.)* 271: H1978-H1987, 1996.

ITO K, YAN X, TAJIMA M, SU Z, BARRY WH, LORELL BH. Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts. *Circ Res.*; 87: 588-95, 2000.

ITO K, YAN X, FENG X, MANNING WJ, DILLMANN WH, LORELL BH. Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res.*; 89: 422-9, 2001.

ITO Y, EBISAWA K, KIRA Y, KOIZUMI T. Turnover rates and synthesis of cardiac structural proteins in normal and hypertrophied heart. *Adv Myocardiol.*; 1: 509-18, 1980.

JIANG MT, LOKUTA AJ, FARRELL EF, WOLFF MR, HAWORTH RA, VALDIVIA HH. Abnormal Ca^{2+} release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.*; 91: 1015-22, 2002.

JUNQUEIRA JR LF. Uma síntese sobre os fundamentos da insuficiência cardíaca: das alterações fisiopatológicas básicas à síndrome clínica. *In: RECOC-Revista Centro-Oeste de Cardiologia*; 4: 19-26, 1997.

KAPRIELIAN R, DEL MONTE F, HAJJAR RJ. Targeting Ca^{2+} cycling proteins and the action potential in heart failure by gene transfer. *Basic Res Cardiol.*; 97 Suppl 1: I136-45, 2002.

KATZ AM. *Physiology of the heart*. 2nd Ed. Raven Press. NY. 1992.

KLABUNDE RE. *Cardiovascular Physiology Concepts*.
<http://cvphysiology.com/Cardiac%20Function/CF008.htm>, acessado em 10/03/2004).

KENT RL, ROZICH JD, MCCOLLAM PL, MCDERMOTT DE, THACKER UF, MENICK DR, MCDERMOTT PJ, COOPER G 4TH. Rapid expression of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in response to cardiac pressure overload. *Am J Physiol. (Circ Physiol.)*; 265: H1024-9, 1993.

KENT RL, MCDERMOTT PJ. Passive load and angiotensin II evoke differential responses of gene expression and protein synthesis in cardiac myocytes. *Circ. Res.*; 78: 829-838, 1996.

KIMURA Y, KURZYDŁOWSKI K, TADA M, MACLENNAN DH. Phospholamban regulates the Ca^{2+} -ATPase through intramembrane interactions. *J Biol Chem.*; 271: 21726-31, 1996.

KISS E, BALL NA, KRANIAS EG, WALSH RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} -ATPase protein levels. Effects on Ca^{2+} transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res.*; 77: 759-64, 1995.

KNOWLTON KU, MICHEL MC, ITANI M, SHUBEITA HE, ISHIHARA K, BROWN JH, CHIEN KR. The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*; 268: 15374–15380, 1993.

KNOLLMANN BC, KNOLLMANN-RITSCHER BE, WEISSMAN NJ, JONES LR, MORAD M. Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol.*; 525: 483-98, 2000.

KORECKY B, RAKUSAN K. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. *Am J Physiol. (Circ Physiol)*; 234: H123-8, 1978.

KRANIAS EG. Regulation of Ca^{2+} Transport by cyclic 3',5'-AMP-dependent phosphorylation and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*; 844: 193-199, 1985.

KRANIAS EG, SOLARO RJ. Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature*; 298: 182-184, 1982.

KOGLER H, HARTMANN O, LEINEWEBER K, NGUYEN VAN P, SCHOTT P, BRODDE OE, HASENFUSS G. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res.*; 93: 230-7, 2003.

KUHN HJ, BLETZ C, RUEGG JC. Stretch-induced increase in the Ca^{2+} sensitivity of myofibrillar ATPase activity in skinned fibres from pig ventricles. *Pflugers Arch.*; 415: 741-6, 1990.

KUWAHARA F, KAI H, TOKUDA K, KAI M, TAKESHITA A, EGASHIRA K, IMAIZUMI T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation.*; 106: 130-5, 2002.

LANGTON P. University of Bristol, Department of Physiology. Great Britain, <http://www.bris.ac.uk/Depts/Physiology/ugteach/ugindex/>. Acessado em 20 de dezembro de 2003.

LARTAUD-IDJOUADIENE I, LOMPRES AM, KIEFFER P, COLAS T, ATKINSON J. Cardiac consequences of prolonged exposure to an isolated increase in aortic stiffness. *Hypertension.*; 34: 63-9, 1999.

LECARPENTIER Y, WALDENSTROM A, CLERGUE M, CHEMLA D, OLIVIERO P, MARTIN JL, SWYNGHEDAUW B. Major alterations in relaxation during cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis in guinea pig. *Circ Res.*; 61: 107-16, 1987.

LEHNART SE, SCHILLINGER W, PIESKE B, PRESTLE J, JUST H, HASENFUSS G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 16; 853: 220-30, 1998.

LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling *Journal of Cardiac Failure*; 8 (6 Suppl.): S518-S525, 2002.

LI L, CHU G, KRANIAS EG, BERS DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol. (Circ Physiol.)*; 274: H1335-H1347, 1998.

LI L, DESANTIAGO J, CHU G, KRANIAS EG, BERS DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol. (Heart Circ Physiol.)*; 278: H769-79, 2000.

LI Y, KRANIAS EG, MIGNERY GA, BERS DM. Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res*; 90: 309-316, 2002.

LIAO JK. Shedding growth factors in cardiac hypertrophy. *Nature*. 8: 20 – 21, 2002.

LIMAS CJ, SPIER SS, KAHN J. Enhanced calcium transport by sarcoplasmic reticulum in mild cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.*; 12: 1103–1116, 1980.

LINCK B, BOKNIK P, HUK S, KIRCHHEFER U, KNAPP J, LUSS H, MULLER FU, NEUMANN J. Tanriseven Z, Vahlensieck U, Baba HA, Jones LR, Philipson KD, Schmitz W. Functional properties of transgenic mouse hearts overexpressing both calsequestrin and the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *J Pharmacol Exp Ther.*; 294: 648-57, 2000.

LIPP P, POTT L. Transient inward current in guinea-pig atrial myocytes reflects a change of sodium-calcium exchange current. *J Physiol.*; 397: 601-30, 1988a.

LIPP P, POTT L. Voltage dependence of sodium-calcium exchange current in guinea-pig atrial myocytes determined by means of an inhibitor. *J Physiol.*; 403: 355-66, 1988b.

LITWIN SE, BRIDGE JH. Enhanced $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in the infarcted heart. Implications for excitation-contraction coupling. *Circ Res.*; 81:1083-93, 1997.

LOKUTA AJ, MEYERS MB, SANDER PR, FISHMAN GI, VALDIVIA HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J Biol Chem.*; 272: 25333-25338, 1997.

LONG CS, ORDAHL CP, SIMPSON PC. Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest.*; 83: 1078–1082, 1989.

LORELL BH. Diastolic dysfunction in pressure-overload hypertrophy and its modification by angiotensin II: current concepts. *Basic Res Cardiol.*; 87 (Suppl 2): 163-72, 1987.

LORELL BH. Diastolic dysfunction in pressure-overload hypertrophy and its modification by angiotensin II: current concepts. *Basic Res Cardiol.*; 87 (Suppl 2): 163-72, 1992.

LOUD AV, ANVERSA P, GIACOMELLI F, WIENER J. Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size. *Lab Invest.*; 38: 586-96, 1978.

LOUKIANOV E, JI Y, BAKER DL, REED T, BABU J, LOUKIANOVA T, GREENE A, SHULL G, PERIASAMY M. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoforms and their role in muscle physiology and pathology. *Ann N Y Acad Sci.*; 853: 251-9, 1998.

LUKYANENKO V, SUBRAMANIAN S, GYÖRKE I, WIESNER TF, GYÖRKE S. The role of luminal Ca^{2+} in the generation of Ca^{2+} waves in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology.* 518: 173-186, 1999.

LUKYANENKO V, VIATCHENKO-KARPINSKI S, SMIRNOV A, WIESNER TF, GYORKE S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and release by luminal Ca^{2+} -sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J.*; 81: 785-98, 2001.

MACLENNAN DH, KRANIAS EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 4: 566-77, 2003.

MAIER L, BERS DM. Calcium, calmodulin and calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol. Cell. Cardiol.* 34: 919-939, 2002.

MAIER LS, ZHANG T, CHEN L, DESANTIAGO J, BROWN JH, BERS DM. Transgenic CaMKII δ overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca^{2+} handling: reduced SR Ca^{2+} load and activated SR Ca^{2+} release. *Circ Res.*; 92: 904-11, 2003.

MARKS AR. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol.*; 33: 615–624, 2001.

MARKS AR, PRIORI S, MEMMI M, KONTULA K, LAITINEN PJ. Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J. Cell. Physiol. (Rev)* 190: 1-6, 2002a.

MARKS AR, REIKEN S, MARX SO. Progression of heart failure. Is Protein Kinase A hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation*; 105: 272-275, 2002b.

MARX SO, REIKEN S, HISAMATSU Y, JAYARAMAN T, BURKHOF D, ROSEMBLIT N, MARKS AR. PKA Phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*; 101: 365–376, 2000.

MCCALL E, GINSBURG KS, BASSANI RA, SHANNON TR, QI M, SAMAREL AM, BERS DM. Ca flux, contractility, and excitation-contraction coupling in hypertrophic rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 274: H1348-H1360, 1998.

MEDUGORAC I. Characteristics of the hypertrophied left ventricular myocardium in Goldblatt rats. *Basic Res Cardiol.*; 72: 261-7, 1977.

MENICK DR, BARNES KV, THACKER UF, DAWSON MM, MCDERMOTT DE, ROZICH JD, KENT RL, COOPER G 4TH. The exchanger and cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci.*; 779: 489-501, 1996.

MENICK DR, XU L, KAPPLER C, JIANG W, WITHERS PR, SHEPHERD N, CONWAY SJ, MÜLLER JG. Pathways regulating $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression in the heart. *Ann NY Acad Sci.* 976: 237-247, 2002.

MESZAROS J, KHANANSHVILI D, HART G. Mechanisms underlying delayed afterdepolarizations in hypertrophied left ventricular myocytes of rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol.)*; 281: H903–H914, 2001.

METZGER JM, WAHR PA, MICHELE DE, ALBAYYA F, WESTFALL MV. Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca^{2+} -activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Circ Res.*; 84: 1310-7, 1999.

MEYERS MB, PICKEL VM, SHEU SS, SHARMA VK, SCOTTO KW, FISHMAN GI. Association of the sorcin with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*; 270: 26411–26418, 1995.

MEYERS MB, FISCHER A, SUN YJ, LOPES CMB, ROHACS T, NAKAMURA TY, ZHOU YY, LEE PC, ALTSCHULD RA, MCCUNE SA, COETZEE WA, FISHMAN GI. Sorcin Regulates Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *J. Biol. Chem.*; 278: 28865–28871, 2003.

MISQUITTA CM, SING A, GROVER AK. Control of sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pump expression in cardiac and smooth muscle. *Biochem. J.*; 338: 167–173, 1999.

MOALIC JM, BOURGEOIS F, MANSIER P, MACHIDA CA, CARRE F, CHEVALIER B, PITARQUE P, SWYNGHEDAUW B. Beta-1 adrenergic receptor and G alpha s mRNAs in rat heart as a function of mechanical load and thyroxine intoxication. *Cardiovasc Res.*; 27: 231-7, 1993.

MOLKENTIN KD, E DORN GW II. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 391-426, 2001.

MORGAN HE, BAKER KM. Cardiac hypertrophy. *Circ.* 83: 13-25, 1991.

MORI N, MIZUNO D, GOTO S. Increase in the ratio of 18S RNA to 28S RNA in the cytoplasm of mouse tissues during aging. *Mech Ageing Dev.*; 8: 285-97, 1978.

MOSCHELLA MC, MARKS AR. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol.*; 120: 1137-46, 1993.

MIYAMOTO MI, DEL MONTE F, SCHMIDT U, DISALVO TS, KANG ZB, MATSUI T, GUERRERO JL, GWATHMEY JK, ROSENZWEIG A, HAJJAR RJ. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 793-8, 2000.

NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J. Clin. Invest.* 84: 1693-1700, 1989.

NADRUZ WJR, KOBARG CB, KOBARG J, FRANCHINI KG. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol.)*; 286: H760-7, 2004.

NAKAYAMA H, OTSU K, YAMAGUCHI O, NISHIDA K, DATE MO, HONGO K, KUSAKARI Y, TOYOFUKU T, HIKOSO S, KASHIWASE K, TAKEDA T, MATSUMURA Y, KURIHARA S,

HORI M, TADA M. Cardiac-specific overexpression of a high Ca^{2+} affinity mutant of SERCA2a attenuates in vivo pressure overload cardiac hypertrophy. *FASEB J.*; 17: 61-3, 2003.

NAKANISHI H, MAKINO N, HATA T, MATSUI H, YANO K, YANAGA T. Sarcolemmal Ca^{2+} transport activities in cardiac hypertrophy caused by pressure overload. *Am J Physiol. (Circ Physiol.)*; 257: H349-56, 1989.

NEDIANI C, FORMIGLI L, PERNA AM, IBBA-MANNESCHI L, ZECCHI-ORLANDINI S, FIORILLO C, PONZIANI V, CECCHI C, LIGUORI P, FRATINI G, NASSI P. Early Changes Induced in the Left Ventricle by Pressure Overload. An Experimental Study on Swine Heart. *J Mol Cell Cardiol.*; 32: 131-142, 2000.

OHKUSA T, HISAMATSU Y, YANO M, KOBAYASHI S, TATSUNO H, SAIKI Y, KOHNO M, MATSUZAKI M. Altered cardiac mechanism and sarcoplasmic reticulum function in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Mol Cell Cardiol.*; 29: 45-54, 1997.

OJAMAA K, PETRIE JF, BALKMAN C, HONG C, KLEIN I. Posttranscriptional modification of myosin heavy-chain gene expression in the hypertrophied rat myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 91: 3468-72, 1994.

O'NEILL SC, DONOSO P, EISNER DA. The role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{caffeine}]_i$. *J Physiol.* 425: 55-70, 1990.

OPIE LH. The Heart: Physiology from Cell to Circulation. 3^o ed. Philadelphia, Lippincott- Raven Publ., 1998.

OHTANI S, FUJIWARA H, HASEGAWA K, DOYAMA K, INADA T, TANAKA M, FUJIWARA T, SASAYAMA S. Up-regulated expression of angiotensin II type 1 receptor gene in human pathologic hearts. *J Card Fail.*; 3: 303-10, 1997.

PACCA SR, DE AZEVEDO AP, DE OLIVEIRA CF, DE LUCA IM, DE NUCCI G, ANTUNES E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 39: 201-7, 2002.

PALMER S, KENTISH JC. The role of troponin C in modulating the Ca^{2+} sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J Physiol.*; 480: 45-60, 1994.

QI M, SHANNON TR, EULER DE, BERS DM, SAMAREL AM. Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol)*; 272: H2416 – 2424, 1997.

QIN W, RUDOLPH AE, BOND BR, ROCHA R, BLOMME EA, GOELLNER JJ, FUNDER JW, MCMAHON EG. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res.*; 93: 69-76, 2003.

RAKUSAN K, HRDINA PW, TUREK Z, LAKATTA EG, SPURGEON HA, WOLFORD GD. Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. *Basic Res Cardiol.*; 79: 389-95, 1984.

RAPACCIUOLO A, ESPOSITO G, CARON K, MAO L, THOMAS SA, ROCKMAN HA. Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure overload cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.*; 38: 876-82, 2001.

REDDY DS, SINGH M, GHOSH S, GANGULY NK. Role of cardiac renin-angiotensin system in the development of pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats with abdominal aortic constriction. *Mol Cell Biochem.*; 155: 1-11, 1996.

REILLY AM, PETROU S, PANCHAL RG, WILLIAMS DA. Restoration of calcium handling properties of adult cardiac myocytes from hypertrophied hearts. *Cell Calcium.*; 30: 59-66, 2001.

REINECKE H, VETTER R, DREXLER H. Effects of alpha-adrenergic stimulation on the sarcolemmal $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in adult rat ventricular cardiocytes. *Cardiovasc Res.*; 36: 16-22, 1997.

REN J, HINTZ KK, ROUGHHEAD ZK, DUAN J, COLLIGAN PB, REN BH, LEE KJ, ZENG H. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol. (Heart Circ Physiol.)*; 284: H1800-7, 2003.

RIBADEAU DUMAS A, WISNEWSKY C, BOHELER KR, TER KEURS H, FISZMAN MY, SCHWARTZ K. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene is regulated at the transcriptional level during compensated left ventricular hypertrophy in the rat. *C R Acad Sci III.*; 320: 963-9, 1997.

ROBINSON MJ, COBB MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.*; 9: 180–186, 1997.

ROCHA E SILVA JR. M. Fisiologia da Circulação. 1ª Ed. EDART, São Paulo, 1973.

RODRIGUEZ MM, CHEN CH, SMITH BL, MOCHLY-ROSEN D. Characterization of the binding and phosphorylation of cardiac calsequestrin by epsilon protein kinase C. FEBS Lett.; 454: 240-246, 1999.

ROUSSEAU E, MEISSNER G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel: Activation by caffeine. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.); 256: H328-H333, 1989.

SADOSHIMA J, JAHN L, TAKAHASHI T, KULIK TJ, IZUMO S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. J. Biol. Chem.; 267: 10551-10560, 1992.

SADOSHIMA J, IZUMO S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. Circ Res; 73: 413-423, 1993.

SADOSHIMA J, IZUMO S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev. Physiol.; 59: 551-571, 1997.

SAIKI Y, IKEMOTO N. Fluorescence probe study of the luminal Ca^{2+} of the sarcoplasmic reticulum vesicles during Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release. Biochem Biophys Res Commun.; 241: 181-6, 1997.

SANTANA LF, GOMEZ AM, KRANIAS EG, LEDERER WJ. Amount of calcium in the sarcoplasmic reticulum: influence on excitation-contraction coupling in heart muscle. Heart Vessels; Suppl 12: 44-9, 1997a.

SANTANA LF, KRANIAS EG, LEDERER WJ. Calcium sparks and excitation-contraction coupling in phospholamban-deficient mouse ventricular myocytes. J Physiol.; 503: 21-9, 1997b.

SCHIAFFINO S, SAMUEL JL, SASSOON D, LOMPRES AM, GARNER I, MAROTTE F, BUCKINGHAM M, RAPPAPORT L, SCHWARTZ K. Nonsynchronous accumulation of alpha-skeletal actin and beta-myosin heavy chain mRNAs during early stages of pressure-overload-induced cardiac hypertrophy demonstrated by in situ hybridization. Circ Res.; 64: 937-48, 1989.

SCHLOTTHAUER K, BERS DM. Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release Causes Myocyte Depolarization. Underlying Mechanism and Threshold for Triggered Action Potentials. *Circ Res.*; 87:774–780, 2000.

SCHMIDT AG, EDES I, KRANIAS EG. Phospholamban: a promising therapeutic target in heart failure? *Cardiovasc Drugs Ther.*; 15: 387-96, 2001.

SCHMIDT AG, KADAMBI VJ, BALL N, SATO Y, WALSH RA, KRANIAS EG, HOIT BD. Cardiac-specific overexpression of calsequestrin results in left ventricular hypertrophy, depressed force-frequency relation and pulsus alternans in vivo. *J Mol Cell Cardiol.*; 32: 1735-44, 2000.

SCHEUER J, BHAN AK. Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function. *Circ. Res.*, 45: 1-12, 1979.

SCHULTZ JEJ, GLASCOCK BJ, WITT SA, NIEMAN ML, NATTAMAI KJ, LIU LH, LORENZ JN, SHULL GE, KIMBALL TR, PERIASAMY M. Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol.)*; 286: H1146 – 1153, 2004.

SCHWARTZ K, CARRIER L, LOMPRES AM, MERCADIER JJ, BOHELER KR. Contractile proteins and sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase gene expression in the hypertrophied and failing heart. *Basic Res Cardiol.*; 87 (Suppl 1): 285-90, 1992.

SCHWARTZBAUER G, ROBBINS J. The Tumor Suppressor Gene *PTEN* Can Regulate Cardiac hypertrophy and survival. *J. Biol. Chem.*; 276: 35786–35793, 2001.

SCOPACASA BS, TEIXEIRA VPA, FRANCHINI KG. Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. *J Appl Physiol.*; 94: 1627–1633, 2003.

SHANNON TR, GINSBURG KS, BERS DM. Quantitative assessment of the SR Ca^{2+} leak-load relationship. *Circ Res.*; 91:594-600, 2002.

SHAM JS, HATEM SN, MORAD M. Species differences in the activity of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J. Physiol. (London)*; 488: 623-631, 1995.

SHOROFKY SR, AGGARWAL R, CORRETTI M, BAFFA JM, STRUM JM, AL-SEIKHAN BA, KOBAYASHI YM, JONES LR, WIER WG, BALKE CW. Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res.*; 84: 424-34, 1999.

SIDDIQ T, PATEL VB, SHERWOOD R, RICHARDSON PJ, PREEDY VR. In vivo protein synthetic rates of atrial, ventricular, and pulmonary tissue proteins in aortic constriction, goldblatt, and bromoethylamine models of hypertension. *Exp Mol Pathol.*; 70: 19-30, 2001.

SIPIDO KR, VOLDERS PG, VOS MA, VERDONCK F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res.*; 53: 782-805, 2002.

SIRI FM. Sympathetic changes during development of cardiac hypertrophy in aortic-constricted rats. *Am J Physiol. (Heart Circ Physiol.)*; 255: H452–H457, 1988.

SMITH SH, FUCHS F. Length-dependence of cross-bridge mediated activation of the cardiac thin filament. *J Mol Cell Cardiol.*; 32: 831-8, 2000.

SNYDER SM, PALMER BM, MORRE RL. A mathematical model of cardiocyte Ca^{2+} dynamics with a novel representation of sarcoplasmic reticular Ca^{2+} control. *Biophys. J.* 79: 94-115, 2000.

STANGE M, XU L, BALSHAW D, YAMAGUCHI N, MEISSNER G. Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. *J Biol Chem.*; 278: 51693-702, 2003.

STATA MANUAL, StataCorp. Stata Statistical Software: Release 6.0. College Station, TX, USA. Stata Press, 1999.

STUDER R, REINECKE H, BILGER J, ESCHENHAGEN T, BOHM M, HASENFUSS G, JUST H, HOLTZ J, DREXLER H. Gene expression of the cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res.*; 75: 443-53, 1994.

STUDER R, REINECKE H, VETTER R, HOLTZ J, DREXLER H. Expression and function of the cardiac $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.*; 92 (Suppl 1): 53-8, 1997.

SUGDEN PH, BOGOYEVITCH MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res.*; 30: 478–492, 1995.

SWOAP SJ, BODDELL P, BALDWIN KM. Interaction of hypertension and caloric restriction on cardiac mass and isomyosin expression. *Am J Physiol. (Reg Integrative Comp Physiol.)*; 268: R33-9, 1995.

TADA M, TOYOFUKU T. SR Ca^{2+} -ATPase/phospholamban in cardiomyocyte function. *J Card Fail.*; 2 (4 Suppl): S77-85, 1996.

TADA M, YABUKI M, TOYOFUKU T. Molecular regulation of phospholamban function and gene expression. *Ann NY Acad Sci.*; 853: 116-29, 1998.

TADA M. Calcium cycling proteins of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ J.*; 67: 729-37, 2003.

TAGAWA H, ROZICH JD, TSUTSUI H, NARISHIGE T, KUPPUSWAMY D, SATO H, MCDERMOTT PJ, KOIDE M, AND COOPER G IV. Basis for increased microtubules in pressure-hypertrophied cardiocytes. *Circulation* 93: 1230–1243, 1996.

TAGAWA H, WANG N, NARISHIGE T, INGBER DE, ZILE MR, AND COOPER G IV. Cytoskeletal mechanics in pressure overload cardiac hypertrophy. *Circ Res* 80: 281–289, 1997.

TAGAWA H, KOIDE M, SATO H, ZILE MR, CARABELLO BA, AND COOPER G IV. Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ Res* 82: 751–761, 1998.

TAKAHASHI T, SCHUNKERT H, ISOYAMA S, WEI JY, NADAL-GINARD B, GROSSMAN W, IZUMO S. Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J Clin Invest.*; 89: 939-46, 1992.

TAKEISHI Y, BHAGWAT A, BALL NA, KIRKPATRICK DL, PERIASAMY M, WALSH RA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. *Am J Physiol. (Circ Physiol)*; 276: H53-62, 1999.

TAVI P, HAN C, WECKSTROM M. Mechanisms of stretch-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat atrial myocytes: role of increased troponin C affinity and stretch-activated ion channels. *Circ Res.*; 83: 1165-77, 1998.

TERAMOTO H, PURI P. Gene expression of insulin-like growth factor-1 and epidermal growth factor is downregulated in the heart of rats with nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.*; 17: 284-7, 2001.

TERENTYEV D, VIATCHENKO-KARPINSKI S, GYORKE I, VOLPE P, WILLIAMS SC, GYORKE S. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 100: 11759-64, 2003.

TORSONI AS, CONSTANCIO SS, NADRUZ W JR, HANKS SK, FRANCHINI KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.*; 93: 140-147, 2003a.

TORSONI AS, FONSECA PM, CROSARA-ALBERTO DP, FRANCHINI KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol. (Cell Physiol.)*; 284: C1411–C1419, 2003b.

TRAFFORD AW, DIAZ ME, O'NEILL SC, EISNER DA. Comparison of subsarcolemmal and bulk calcium concentration during spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes. *J Physiol.*; 488: 577–586, 1995.

TRAFFORD AW, SIBBRING GC, DÍAZ ME, EISNER DA. The effects of low concentrations of caffeine on spontaneous Ca release in isolated rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*; 28: 269–276, 2000.

TSUTSUI H, ISHIHARA K, AND COOPER G IV. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science* 260: 682–687, 1993.

TSUTSUI H, TAGAWA H, KENT RL, MCCOLLAM PL, ISHIHARA K, NAGATSU M, AND COOPER G IV. Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation* 90: 533–555, 1994.

VAN BUREN P, HARRIS D E, ALPERT NA, WARSHAW DM. Cardiac V1 and V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro. *Circ. Res.*; 77, 439 - 444. 1995.

VAN DER LAARSE A, VLIEGEN HW, VAN DER NAT KH, HOLLAAR L, EGAS JM, SWIER GP, VAN DEN BROEK AJ. Comparison of myocardial changes between pressure induced hypertrophy and normal growth in the rat heart. *Cardiovasc Res.*; 23: 308-14, 1989.

VANGHELUWE P, LOUCH WE, VER HEYEN M, SIPIDO K, RAEYMAEKERS L, WUYTACK F. Ca^{2+} transport ATPase isoforms SERCA2a and SERCA2b are targeted to the same sites in the murine heart. *Cell Calcium*; 34: 457–464, 2003.

VARANDA WA, CHAVES LAP, BAPTISTA V. <http://rfi.fmrp.usp.br/~cverao/POTENCIAL-ACAO.PDF> (site acessado em 12 de maio de 2004).

VER HEYEN M, HEYMANS S, ANTOONS G, REED T, PERIASAMY M, AWEDE B, LEBACQ J, VANGHELUWE P, DEWERCHIN M, COLLEN D, SIPIDO K, CARMELIET P, WUYTACK F. Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase Isoform SERCA2a by the Nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart. *Circ Res.*; 89: 838-846, 2001.

VOLK T, NGUYEN THD, SCHULTZ JH, FAULHABER J; EHMKE H. Regional alterations of repolarizing K^{+} currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *Journal of Physiology.(Lond)*, 530: 443–455 443, 2001.

VOGELSANG M, KUNDE K, HILLEMANN S, BROEDE A, ZERKOWSKI H, BRODDE O. Receptor systems in the human heart mediating increases in force of contraction. *Circulation*; **86** (suppl I): I–622, 1992.

WAGENKNECHT T, SAMSO M. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci.*; 7: d1464-74, 2002.

WANG J, FLEMAL K, QIU Z, ABLIN L, GROSSMAN W, MORGAN JP. Ca^{2+} handling and myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in ferret cardiac myocytes with pressure-overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **267**, H918–H924, 1994.

WANG YP, FUCHS F. Length, force, and Ca^{2+} -troponin C affinity in cardiac and slow skeletal muscle. *Am. J. Physiol (Cell Physiol).*; 266: C1077-1082, 1994.

WANG Y, HUANG S, SAH VP, ROSS J JR, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 2161–2168, 1998.

WANG X, LI F, CAMPBELL SE, GERDES AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: II. Cytoskeletal remodeling. *J Mol Cell Cardiol.*; 31: 319-31, 1999.

WANKERL M, SCHWARTZ KJ. Calcium transport proteins in the nonfailing and failing heart: gene expression and function. *J. Mol. Med.*; 73: 487–496, 1995.

WATKINS SC, SAMUEL JL, MAROTTE F, BERTIER-SAVALLE B, RAPPAPORT L. Microtubules and desmin filaments during onset of heart hypertrophy in rat: a double immunoelectron microscope study. *Circ Res.*; 60: 327-36, 1987.

WATSON PA. Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J.*; 5: 2013-2019, 1991.

WATSON PA, HANNAN R, CARL LL, GIGER KE. Desmin gene expression in cardiac myocytes is responsive to contractile activity and stretch. *Am J Physiol. (Cell Physiol)* ; 270: C1228-35, 1996.

WEBER CR, PIACENTINO VIII, GINSBURG KS, HOUSER SR, BERS DM. Na^+ - Ca^{2+} Exchange Current and Submembrane $[\text{Ca}^{2+}]$ During the Cardiac Action Potential *Circ Res.*; 90: 182-189, 2002.

WEHRENS XH, LEHNART SE, REIKEN SR, MARKS AR. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.*; 94(6): e61-70, 2004.

WENDT IR, STEPHENSON DG. Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the rat. *Pflügers Archiv.*; 398: 210-216, 1983.

WESTRA HG, BERDEN JA, PASMAN WJ, POOL I, VAN DOORN JE. A model for regulation of the Mg^{2+} -stimulated acto-myosin-ATPase activity: inhibition of the formation of actin-myosin complex and the Mg^{2+} -stimulated acto-myosin-ATPase activity by IMP and AMP. *Arch Physiol Biochem.*; 109: 316-22, 2001.

WIER WG, BALKE CW. Ca^{2+} release mechanisms, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.*; 85: 770-776, 1999.

WITCHER DR, KOVACS RJ, SCHULMAN H, CEFALI DC, JONES LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem.*; 266: 11144-11152, 1991.

WONG K, BOHELER KR, PETROU M, YACOUB MH. Pharmacological modulation of pressure-overload cardiac hypertrophy: changes in ventricular function, extracellular matrix, and gene expression. *Circulation.*; 96: 2239-46, 1997.

WRIGHT CE, BODELL PW, HADDAD F, QIN AX, BALDWIN KM. In vivo regulation of the beta-myosin heavy chain gene in hypertensive rodent heart. *Am J Physiol. (Cell Physiol.)*; 280: C1262-76, 2001.

YAMAZAKI T, YAZAKI Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z Kardiol.*; 89: 1-6, 2000.

YOUNG ME, OKERBERG KA, WILSON CR, DEFERRARI DA, YING J, GUTHRIE P, RAZEGHI P, CLUBB FJ JR, TAEGTMEYER H. Calcitonin gene-related peptide is not essential for the development of pressure overload-induced hypertrophy in vivo. *Mol Cell Biochem.*; 225: 43-9, 2001.

ZECHNER D, THUERAUF D, HANFORD DS, MCDONOUGH PM, GLEMBOTSKI CC. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression *J. Cell Biol.* 139, 115–127, 1997.

ZHANG T, MAIER LS, DALTON ND, MIYAMOTO S, ROSS J JR, BERS DM, BROWN JH. The δ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.*; 92: 912-9, 2003.

ZHOU YY, SONG LS, LAKATTA EG, XIAO RP, CHENG H. Constitutive β 2-adrenergic signalling enhances sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling to augment contraction in mouse heart. *Journal of Physiology*, 521: 351-361, 1999.

ZHOU YY, YANG D, ZHU WZ, ZHANG SJ, WANG DJ, ROHRER DK, DEVIC E, KOBILKA BK, LAKATTA EG, CHENG H, XIAO RP. Spontaneous activation of beta(2)- but not beta(1)-adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from beta(1)beta(2) double knockout mice. *Mol Pharmacol.*; 58: 887-94, 2000.

ZILE MR, KOIDE M, SATO H, ISHIGURO Y, CONRAD CH, BUCKLEY JM, MORGAN JP, AND COOPER G IV. Role of microtubules in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *J Am Coll Cardiol* 33: 250–260, 1999.

ZOLK O, QUATTEK J, SEELAND U, EL-ARMOUCHE A, ESCHENHAGEN T, BOHM M. Activation of the cardiac endothelin system in left ventricular hypertrophy before onset of heart failure in TG(mREN2)27 rats. *Cardiovasc Res.*; 53: 363-71, 2002.

APÊNDICE I:

Estudo do Relaxamento de Miócitos segundo a Análise Compartmental

ABREVIATURAS – APÊNDICES I E II

<i>Sh</i>	grupos de animais controle submetidos cirurgia sem coarctação da aorta (<i>Coa2</i> , <i>Coa7</i>)
<i>Coa</i>	grupos de animais empregados após 2 ou 7 dias de coarctação da aorta (<i>Coa2</i> , <i>Coa7</i>)
<i>Tw</i>	Contração evocada por estimulação elétrica
<i>CafNT</i>	Contratura evocada por cafeína dissolvida em solução de Tyrode normal
<i>Caf00</i>	Contratura evocada por cafeína dissolvida em solução de ‘Tyrode 0Na ⁺ e 0Ca ²⁺ ’
$t_{1/2}^{c,\Delta L}$	tempo de meia-vida do relaxamento ($t_{1/2}^{Tw,\Delta L}$, $t_{1/2}^{CafNT,\Delta L}$ ou $t_{1/2}^{Caf00,\Delta L}$)
$t_{1/2}^{c,[Ca]_i}$	tempo de meia-vida do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ ($t_{1/2}^{Tw,[Ca]_i}$, $t_{1/2}^{CafNT,[Ca]_i}$ ou $t_{1/2}^{Caf00,[Ca]_i}$)
K_{A-RS}	constante de taxa de transporte de Ca ⁺² para o RS
K_{NCX}	constante de taxa de transporte de Ca ⁺² do cisosol para o MEC pelo NCX
K_{LENTOS}	constante de taxa de transporte de Ca ⁺² pelos transportadores lentos
$k_{oc}(g)$	coeficiente linear da regressão: $\Delta L = k_{oc}(g) + \alpha_{c(g)}[Ca]_i$
α	coeficiente de acoplamento químico-mecânico (coeficiente angular da reta que relaciona nível de contração remanescente e nível de $[Ca^{2+}]_i$ remanescente durante o relaxamento)
$[Ca^{2+}]_i$	concentração citosólica de Ca ²⁺
MEC	meio extra-celular

I- Modelo Compartimental de Fluxos de Ca^{2+} Durante o Relaxamento

Em estudos prévios, Bassani *et al.* (1992, 1994) apresentaram estimativas da participação relativa dos transportadores de cálcio (Ca^{2+}) no fluxo total de remoção de Ca^{2+} citosólico durante o relaxamento de miócitos cardíacos isolados (PR). Estes autores observaram que, numa aproximação de primeira ordem, a estimativa da PR calculada por integração dos fluxos de Ca^{2+} podia ser obtida a partir das razões dos $t_{1/2}$ s de relaxamento usando curvas de encurtamento celular.

Sabe-se entretanto, que a relação entre encurtamento e concentração de cálcio citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no relaxamento não é uma função linear do nível de cálcio intracelular e que o encurtamento pode ser alterado por diversas condições que modifiquem a sensibilidade de miofilamentos ao Ca^{2+} (Bers, 2001; Gambassi *et al.*, 1992; Spurgeon *et al.*, 1992).

Por esta razão, apresentamos um modelo matemático que tem como objetivo verificar sob quais condições parâmetros cinéticos do encurtamento de miócitos ventriculares seriam válidos para inferir a participação relativa (PR) dos principais transportadores de Ca^{2+} na remoção do Ca^{2+} citosólico.

Os transportadores analisados foram: – *ATPase do retículo sarcoplasmático (A-RS)*, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX*), *ATPase do sarcolema* e uniporter mitocondrial; estes dois últimos denominados em conjunto de *LENTOS*, por serem mecanismos lentos de transporte comparados aos dois primeiros e contribuírem com uma pequena parcela no transporte de remoção de Ca^{2+} citosólico (vide detalhes no item 3.6.1).

Nosso modelo matemático foi baseado em análise compartimental (Enderle *et al.*, 1999; Cobelli *et al.*, 1995; Shepard Riggs, 1970). A análise compartimental é uma abordagem frequentemente usada em ciências biológicas, na farmacologia e na fisiologia—para o estudo da distribuição de solutos e fármacos no organismo. No presente trabalho, um modelo de compartimentos foi adaptado para o estudo do relaxamento de miócitos, modelados como um sistema multicompartimental. Em laboratório, realizamos experimentos empregando um protocolo que nos permitia isolar funcionalmente diferentes transportadores de Ca^{2+} , de modo a obter o sistema estudado. As premissas da análise compartimental adotadas em nossa análise e o desenvolvimento do modelo estão apresentados a seguir. A solução de algumas equações do modelo encontram-se no Apêndice II.

I-1. *Protocolo experimental*

Como o relaxamento depende da queda da $[Ca^{2+}]_i$, empregamos dados da cinética de relaxamento de diferentes contrações ($t_{1/2}$ s do relaxamento) para fazer inferências sobre a contribuição dos transportadores de Ca^{2+} operantes em cada uma destas contrações. Estas contrações – Tw, CafNT e Caf00 – nos permitiram isolar funcionalmente os transportadores de Ca^{2+} durante a queda da $[Ca^{2+}]_i$ e relaxamento. Durante o Tw, a queda da $[Ca^{2+}]_i$ e o relaxamento devem-se aos quatro transportadores de Ca^{2+} operando em conjunto; na CafNT, ao NCX e aos transportadores LENTOS; e na Caf00, somente aos transportadores LENTOS (Bassani *et al.*, 1992, 1994, 2002).

Passaremos a denominar as *participações relativas* dos transportadores de Ca^{+2} – A-RS, NCX e LENTOS – durante o relaxamento de miócitos simplesmente PR_{A-RS} , PR_{NCX} , PR_{LENTOS} . O protocolo experimental empregado para isolar funcionalmente os transportadores foi apresentado na figura I-1. Miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo foram inicialmente perfundidos com solução de Tyrode Normal (NT) e estimulados eletricamente a 0,5 Hz, intensidade 20% acima de seu limiar de estimulação, por aproximadamente 15 minutos, até atingirem o regime estacionário (*steady state*). Somente então iniciamos os experimentos. Os cursos temporais do relaxamento em resposta à estimulação elétrica (Tw em NT) e à estimulação química por cafeína -10 mM de cafeína em NT (CafNT) ou 10 mM de cafeína em Tyrode $0Ca^{2+}/0Na^{+}$ - foram registradas com o auxílio de um Detector de Borda de Sinal de Vídeo; os $t_{1/2}$ s do relaxamento – $t_{1/2 Tw}$, $t_{1/2 CafNT}$ e $t_{1/2 Caf00}$ – foram determinados com o auxílio de um osciloscópio.

Os dados obtidos da cinética do relaxamento foram empregados no cálculo da PR. Após elaboração do modelo teórico de compartimentos, estabelecemos uma relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ que pôde ser testada empiricamente a partir de dados pareados de encurtamento e dados de $[Ca^{2+}]_i$ obtidos com o mesmo protocolo experimental. Também estabelecemos uma relação entre o curso temporal do relaxamento e o curso temporal da queda da $[Ca^{2+}]_i$. A seguir, corrigimos a PR estimada a partir de dados do relaxamento.

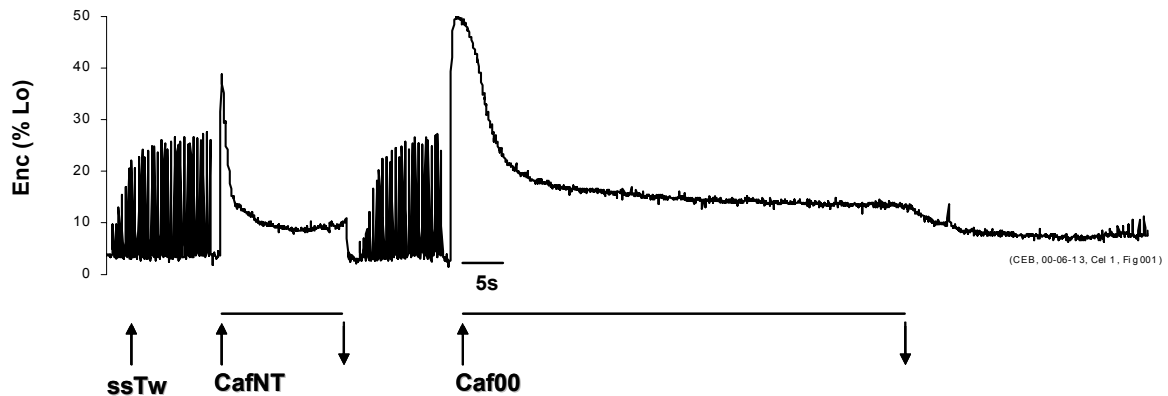


Figura I-1: Protocolo experimental para estudo da cinética de relaxamento de miócitos cardíacos. Registro de encurtamento celular de um miócito ventricular de rato (expresso como porcentagem do comprimento da célula em repouso, L_0) durante protocolo experimental empregado para avaliação da participação relativa dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento. Inicialmente, o miócito foi estimulado eletricamente a 0,5 Hz até estabilização das contrações (Tw). Em seguida, a estimulação elétrica foi interrompida e aplicou-se solução NT contendo cafeína, que evocou uma contratura (CafNT), após a qual, cafeína foi removida e o RS foi novamente recarregado por meio de estímulos elétricos. Após estabilização das contrações, o miócito foi perfundido com solução de Tyrode $0Na^+/0Ca^{2+}$ por 20 s, seguidos de mudança do perfusato para mesma solução contendo cafeína, a qual evocou uma contratura lenta (Caf00). Os períodos de aplicação de cafeína estão indicados por linhas horizontais e setas, abaixo do traçado.

I-2. Análise Compartmental: Descrição do modelo básico e suas premissas

A premissa fundamental da análise de compartimentos é, obviamente, a existência de compartimentos. Premissas adicionais usualmente adotadas são a homogeneidade destes compartimentos e a estacionariedade do sistema (Enderle *et al.*, 1999). Certas premissas matemáticas são adotadas para dar origem a representações algébricas por meio de equações diferenciais ordinárias, que não somente possuem soluções conhecidas, mas também podem ser avaliadas por testes empíricos e costumam representar bem muitos fenômenos fisiológicos.

Em nosso modelo de análise compartmental, adotamos as seguintes premissas:

1. *Existência de Compartimentos*: o protocolo experimental apresentado na figura I-1 permite a distinção dos seguintes compartimentos (figura I-3) isolados funcionalmente por contrações:
 - a. compartimento anatômico representado pelo retículo sarcoplasmático (RS), para onde flui o íon Ca^{2+} sob ação da ATPase de Ca^{2+} do RS (*A-RS*);
 - b. compartimento anatômico representado pelo meio extracelular (MEC), cujo acesso se faz pelo efeito do *NCX*; e
 - c. compartimento lógico composto de meio extracelular e interior das mitocôndrias, delimitado pela função dos transportadores *LENTOS*.
2. *Homogeneidade dos Compartimentos*: a distribuição dos íons cálcio dentro de cada compartimento é homogênea em todos os momentos e as mudanças de concentração são instantâneas.
3. *Estacionariedade do Sistema*: os volumes dos compartimentos e temperaturas nos mesmos permanecem constantes ao longo do tempo.
4. *Conservação das Massas*: a massa de cálcio no sistema é preservada durante seu intercâmbio entre os diferentes compartimentos.
5. *Independência entre os fluxos*: os fluxos de remoção de Ca^{2+} são independentes entre si, mas dependem de uma variável comum, a concentração de Ca^{2+} , que por sua vez é função do tempo - $[Ca^{2+}]_i(t)$.
6. *Linearidade*: Mudanças absolutas ou relativas seguem funções lineares de níveis atuais (dos solutos na célula ou do encurtamento mecânico). Em nosso contexto, mudanças absolutas são os fluxos de cálcio $d[Ca^{2+}]_i(t)$ e a mudança do encurtamento $d\Delta L(t)$ (relaxamento $d\Delta L(t) < 0$) em um instante t . Mudanças relativas são os fluxos de cálcio relativos aos níveis atuais de cálcio no compartimento citosol $d[Ca^{2+}]_i(t)/[Ca^{2+}]_i(t)$ e as mudanças do encurtamento relativas aos níveis atuais de encurtamento $d\Delta L(t)/\Delta L(t)$ em um instante t .

Esta última premissa de linearidade é adotada para facilitar o modelamento matemático. Sob a premissa de linearidade, as funções algébricas representando a queda da $[Ca^{2+}]_i$ nos diferentes tipos de contração – Tw, CafNT e Caf00 – aproximam-se de curvas empíricas (Vide registro experimental, figura I-2 e simulação, figura I-4). Quando se adota linearidade como premissa em análise compartimental, considera-se freqüentemente que todos os fluxos em valor absoluto sejam governados por funções lineares de estoques ou de outros fluxos também expressos em valores absolutos. Para dar um nome a este conceito, chamamos esta premissa usual de *linearidade estrita ou absoluta*. Em nosso contexto, porém, também precisamos de relacionar o encurtamento remanescente da célula $\Delta L(t)$ à $[Ca^{2+}]_i(t)$ remanescente;

ou a mudança no encurtamento $d\Delta L(t)$, ao fluxo de cálcio $d[Ca^{2+}]_i(t)$. Podemos diminuir o rigor desta premissa, *linearidade estrita*, e manter a restrição de que a mudança relativa do encurtamento $d\Delta L(t)/\Delta L(t)$ seja função linear de fluxos relativos de cálcio $d[Ca^{2+}]_i(t)/[Ca^{2+}]_i(t)$ num instante t . Denominamos esta premissa *linearidade fraca*. *Linearidade estrita* implica que a premissa de *linearidade fraca* tenha sido satisfeita,¹ mas o conjunto de funções que segue a linearidade fraca é mais amplo e inclui funções que não satisfazem a *linearidade estrita*. As derivações neste apêndice ilustram este fato com um exemplo. A análise subsequente do relaxamento em função da $[Ca^{2+}]_i$ mostra que a *linearidade fraca* possibilita representações matemáticas mais atraentes do que a *linearidade estrita* e cabíveis em todas as situações, enquanto que a *linearidade estrita* deve ser rejeitada em vários casos.

Em nosso modelo adotamos *linearidade estrita* quando assumimos que, durante o relaxamento, fluxos absolutos de remoção de Ca^{+2} ($d[Ca^{2+}]_i(t) < 0$) são funções lineares de estoques absolutos de Ca^{2+} citosólico (equação 1). Mas a análise empírica da relação entre $d\Delta L(t)$ e $d[Ca^{2+}]_i(t)$ mostrou que a hipótese de *linearidade estrita* teve que ser rejeitada em favor de uma generalização. A generalização adotada foi a de *linearidade fraca*.

Quando relacionamos a mudança absoluta do encurtamento $d\Delta L(t)$ ao fluxo absoluto de $d[Ca^{2+}]_i(t)$ citosólico durante o relaxamento do miócito, a premissa de *linearidade estrita* foi violada. A análise empírica mostrou que a mudança no encurtamento $d\Delta L(t)$ (relaxamento, $d\Delta L(t) < 0$) não é função linear da mudança na concentração de cálcio (fluxo de saída de Ca^{2+} do citosol, $d[Ca^{2+}]_i(t) < 0$). Porém os achados empíricos foram consistentes com o fato de que o encurtamento relativo, $d\Delta L(t)/\Delta L(t)$, é relacionado à mudança relativa na $[Ca^{2+}]_i$, $d[Ca^{2+}]_i(t)/[Ca^{2+}]_i(t)$, de uma forma linear. Neste sentido, nós adotamos e conseguimos manter a premissa de *linearidade fraca* como uma abordagem adequada para relacionar ΔL e $[Ca^{2+}]_i$, enquanto que a *linearidade estrita ou absoluta* teve que ser rejeitada.²

¹ Para confirmar isto, dividem-se valores absolutos por níveis atuais, assim transformando expressões que satisfazem linearidade estrita em expressões que satisfazem linearidade fraca.

² O encurtamento absoluto não é uma função invariável da concentração absoluta de $[Ca^{2+}]_i$ citosólico; $\alpha_c(g) \neq 1$). Vide equações 10 e 10a.

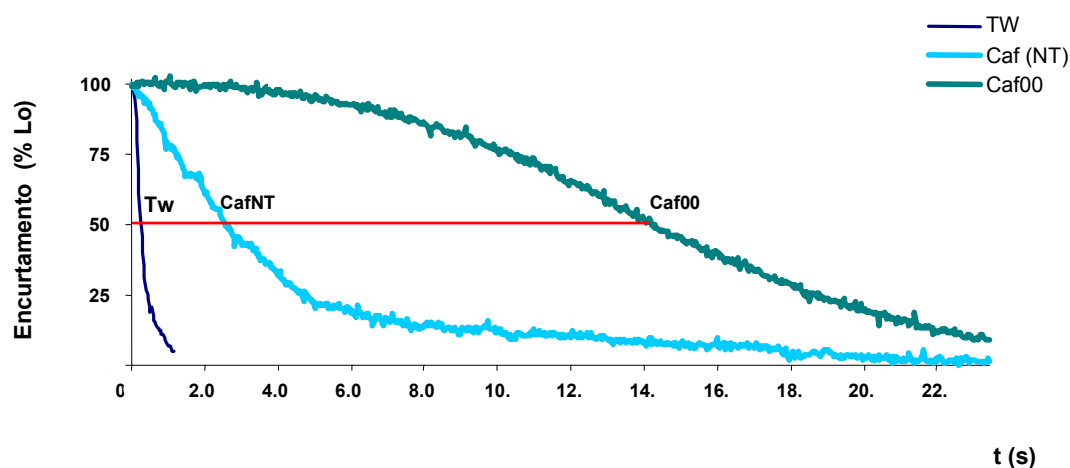


Figura I-2: Curso temporal do relaxamento de diferentes contrações / contraturas - Tw, CafNT e Caf00 – que nos permitiram isolar a função dos transportadores de Ca^{2+} . O relaxamento do Tw decorre da participação conjunta de todos os fluxos – ATPase de Ca^{2+} do RS (*A-RS*), *NCX* e transportadores lentos; o relaxamento da contratura de CafNT deve-se a *NCX* e *LENTOS*; enquanto que o relaxamento da contratura de Caf00 pode ser atribuída somente aos transportadores *LENTOS*.

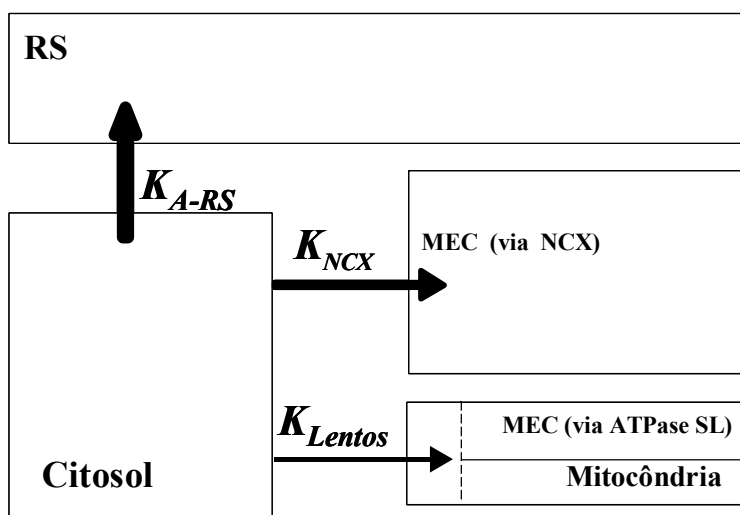


Figura I-3.: Representação dos compartimentos isolados pelas contrações do tipo Tw, CafNT e Caf00 e dos fluxos de Ca^{2+} durante o relaxamento segundo a análise compartimental. Representação de como os três transportadores – ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (*A-RS*), trocador Na^+/Ca^{2+} (*NCX*) e mecanismos lentos (*LENTOS*, i.e., combinação de ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial) contribuem para a remoção de Ca^{2+} do citosol e para os compartimentos vizinhos: meio extracelular (MEC), retículo sarcoplásmico (RS), e para um compartimento lógico composto de MEC e matriz mitocondrial, respectivamente. A espessura das setas é proporcional a valores da contribuição relativa estimada por Bassani *et. al.* (1994).

I-3. Linhas Básicas para o modelamento da queda de $[Ca^{2+}]_i$ durante o relaxamento

O fluxo de Ca^{2+} mediado por cada transportador é definido como função da sua respectiva constante de taxa de transporte (K_{A-RS} , K_{NCX} , e K_{LENTOS} , respectivamente, Figura I-3.) O fluxo total de Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i(t)$ durante o relaxamento foi descrito como a composição linear dos fluxos parciais de Ca^{2+} pelos diferentes transportadores (Bassani *et al.*, 1994):

$$d[Ca^{2+}]_i(t) = -J_{A-RS}(t) dt - J_{NCX}(t) dt - J_{LENTOS}(t)dt \quad (1)$$

onde J_n corresponde ao fluxo de remoção de Ca^{2+} do citosol mediado pelo transportador n . Aplicando a premissa 6 em sua forma de *linearidade estrita* para fluxos de cálcio em função da concentração remanescente de cálcio no compartimento citosol, esta equação (1) pode ser reescrita sob a seguinte forma:

$$d[Ca^{2+}]_i(t) = -K_{A-RS}(g) [Ca^{2+}]_i(t) dt - K_{NCX}(g) [Ca^{2+}]_i(t) dt - K_{LENTOS}(g) [Ca^{2+}]_i(t) dt, \quad (2)$$

onde K_{A-RS} , K_{NCX} e K_{LENTOS} são constantes positivas que representam as taxas de remoção do Ca^{2+} citosólico pelos transportadores $A-RS$, NCX e $LENTOS$. Estas taxas de remoção de Ca^{2+} podem depender dos grupos ($Sh2$, $Sh7$, $Coa2$ e $Coa7$) e são taxas resultantes, pois correspondem ao transporte líquido de remoção do Ca^{2+} citosólico por cada transportador, descontado de seu respectivo contra-transporte.

Como abordamos apenas o relaxamento, a condição inicial para esta equação diferencial é:

$$[Ca^{2+}]_i(0) = [Ca^{2+}]_{i,max} . \quad (3).$$

A equação (2) foi resolvida empregando a solução padrão de uma equação diferencial ordinária, considerando a condição inicial apresentada em (3) (vide Apêndice II, A e B). A solução mostra que o nível remanescente de Ca^{2+} citosólico a cada momento t é:

$$[Ca^{2+}]_i(t) = [Ca^{2+}]_{i,max} \cdot e^{-[K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)]t} \quad (4),$$

que satisfaz a condição inicial $[Ca^{2+}]_i(0) = [Ca^{2+}]_{i,max}$.

I-3.1. Participações Relativas dos Transportadores de Ca^{2+} no relaxamento

Da representação matemática acima, pudemos definir matematicamente PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{LENTOS} na remoção de Ca^{2+} citosólico – como:

$$PR_{A-RS}(g) \equiv \frac{K_{A-RS}(g)}{K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)} \quad (5-a)$$

$$PR_{NCX}(g) \equiv \frac{K_{NCX}(g)}{K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)} \quad (5-b)$$

$$PR_{LENTOS}(g) \equiv \frac{K_{Slow}(g)}{K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)} \quad (5-c)$$

O bloqueio seletivo de um transportador n ($A-RS$, NCX e $LENTOS$) no relaxamento, corresponde matematicamente a igualarmos sua constante de taxa K_n a zero. Nos três tipos de contração estudada a – Tw, CafNT e Caf00 – a queda da $[Ca^{2+}]_i$ pode ser expressa por:

1. *Tw*: evocado por estimulação elétrica (desencadeada por potencial de ação). Nesta condição, a queda da $[Ca^{2+}]_i$ ocorre com a participação de todos os transportadores de Ca^{2+} , assim

$$[Ca^{2+}]_i^{Tw}(t) = [Ca^{2+}]_{i,max} \cdot e^{-[K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)]t} \quad (6-a)$$

2. *CafNT*: a cafeína ativa o canal de liberação de Ca^{2+} do *RS*, provocando liberação maciça de Ca^{2+} a partir deste e aumentando sua sensibilidade ao Ca^{2+} e sua probabilidade de abertura (Rousseau & Meissner, 1989), de modo que o fluxo líquido de recaptção de Ca^{2+} pelo *RS* torna-se nulo, pois todo o

Ca^{2+} recaptado flui novamente para o *citosol*. A remoção de Ca^{2+} do citosol deve-se portanto ao NCX e aos transportadores *LENTOS*.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{CafNT}}(t) = [\text{Ca}^{2+}]_{i,\max} e^{-[K_{\text{NCX}}(g) + K_{\text{LENTOS}}(g)]t} \quad (6-b)$$

3. *Caf00* : na contratura evocada pela aplicação de cafeína diluída em Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{+2}$ não somente o fluxo de recaptção de Ca^{2+} para o *RS* encontra-se inibido, mas também a extrusão de Ca^{2+} para o MEC via NCX. Neste caso, a remoção de Ca^{+2} deve-se somente a *LENTOS*.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i^{\text{Caf00}}(t) = [\text{Ca}^{2+}]_{i,\max} \cdot e^{-K_{\text{LENTOS}}(g)t} \quad (6-c)$$

Demonstramos no Apêndice II,C que o tempo de meia-vida de uma variável regida por uma função exponencial do tipo e^{-kt} é dado por

$$t_{1/2} = (\ln 2) / k. \quad (7)$$

Os valores de $t_{1/2}$ do curso temporal da queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos três tipos de contração (Tw, CafNT e Caf00) são dados por:

1. Tw:

$$t_{1/2}^{\text{Tw}, [\text{Ca}^{2+}]_i}(g) = \frac{\ln 2}{K_{A-RS}(g) + K_{\text{NCX}}(g) + K_{\text{LENTOS}}(g)} \quad (8-a)$$

2. CafNT:

$$t_{1/2}^{\text{CafNT}, [\text{Ca}^{2+}]_i}(g) = \frac{\ln 2}{K_{\text{NCX}}(g) + K_{\text{LENTOS}}(g)} \quad (8-b)$$

3. Caf00 :

$$t_{1/2}^{\text{Caf00}, [\text{Ca}^{2+}]_i}(g) = \frac{\ln 2}{K_{\text{LENTOS}}(g)} \quad (8-c)$$

Substituindo as equações (8-a) a (8-c) nas equações (5-a) a (5-c), podemos redefinir as participações relativas dos transportadores de Ca^{2+} em função dos $t_{1/2}$ conforme abaixo:

$$PR_{A-SR}(g) = 1 - \frac{t_{1/2}^{Tw, [Ca^{2+}]_i}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, [Ca^{2+}]_i}(g)} \quad (9-a)$$

$$PR_{NCX}(g) = \frac{t_{1/2}^{Tw, [Ca^{2+}]_i}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, [Ca^{2+}]_i}(g)} - \frac{t_{1/2}^{Tw, [Ca^{2+}]_i}(g)}{t_{1/2}^{Caf^{00}, [Ca^{2+}]_i}(g)} \quad (9-b)$$

$$PR_{LENTOS}(g) = \frac{t_{1/2}^{Tw, [Ca^{2+}]_i}(g)}{t_{1/2}^{Caf^{00}, [Ca^{2+}]_i}(g)} \quad (9-c)$$

I-4. Relação entre concentração remanescente de Ca^{2+} e contração remanescente

Como visávamos avaliar a *participação relativa* de cada transportador a partir de dados do curso temporal do relaxamento de miócitos ($t_{1/2}$ s do encurtamento), necessitávamos estabelecer uma relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$, passível de ser testada empiricamente. Esta relação devia ser suficientemente geral para acomodar a possibilidade de mudanças não-lineares de $\Delta L(t)$ em função de $[Ca^{2+}]_i(t)$ e para permitir testes empíricos:

$$\Delta L(t) = k_c(g) \cdot ([Ca^{2+}]_i(t))^{\alpha_c(g)} \quad (10)$$

onde

- $\Delta L(t)$: encurtamento bilateral durante a contração do miócito, medido como a diferença entre o comprimento de repouso (L_R) e o comprimento do miócito no pico da contração (L_C), $\Delta L \equiv L_R - L_C$. (Nos experimentos, as medidas de encurtamento foram unilaterais. Isto implica uma constante k_0 dividida por um fator de 2 mas não afeta as derivações.)
- $k_C(g)$: coeficiente linear da relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$, sendo $k_C(g) \in \mathbb{R}^+$. Convém não confundir $k_C(g)$ (coeficiente linear da regressão entre $\ln \Delta L$ e $\ln [Ca^{2+}]_i$) com as constantes de taxas de remoção do Ca^{2+} transportadores, K_n .
- $\alpha_C(g)$: coeficiente de *acoplamento químico-mecânico* entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$. A literatura relata diversas condições que alteram a relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$. Dentre estas condições podemos mencionar a ativação α e β adrenérgica (Spurgeon *et al.*, 1992; Gambassi *et al.*, 1992, Bers, 2001) e a cafeína, que aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (Palmer & Kennish 1990, Wendt & Stephenson, 1983). Por esta razão analisamos possíveis diferenças entre os $\alpha_C(g)$, que podem depender do tipo de contração C (i.e., Tw, CafNT ou Caf00) e dos grupos g (i.e. *Sh2*, *Coa2*, *Sh7*, *Coa7*) (itens I-4.4 e I-4.5).

Não podemos excluir a possibilidade de que α dependa dos grupos g (*Sh2*, *Coa2*, *Sh7*, ou *Coa7*). Não está bem estabelecido na literatura se a deficiência contrátil observada em casos de patologia – i.e. hipertrofia cardíaca progressiva – pode ser atribuída a outras causas que não alterações dos transportes de Ca^{2+} . Uma possível explicação para deficiência contrátil em condições não fisiológicas (i.e. hipertrofia, insuficiência cardíaca) seria uma alteração na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , questão para qual não há um resultado unânime. Medidas da sensibilidade de miofibrilas ao Ca^{2+} têm sido associadas a resultados contraditórios, que indicam ora ausência de alteração da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (Kagaya *et al.*, 1996, Perreault *et al.*, 1992, O’Leary *et al.*, 1997, Kinugawa *et al.*, 1999), ora redução da sensibilidade ao Ca^{2+} (Bailey *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1994), ou ainda aumento da sensibilidade (Wolff *et al.*, 1995 e 1996). A possível influência dos tipos de grupos g sobre α , ou em outras palavras, a influência da instalação da hipertrofia sobre o *acoplamento químico-mecânico* entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ será verificada quando discutimos as hipóteses de igualdades entre os $\alpha_C(g)$.

A interpretação da relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ da equação (10) é intuitiva: para $k_{C,g} > 0$, e $\alpha_C(g) > 0$, um menor nível de $[Ca^{2+}]_i$ citosólico corresponde a uma contração menor ou a um maior relaxamento, nisto consiste o processo básico do relaxamento. Esta interpretação de que a mudança do encurtamento relativo (mudança do $\Delta L(t)$ relativa ao $\Delta L(t)$ instantâneo) seja proporcional à mudança

relativa da $[Ca^{2+}]_i(t)$ (mudança da $[Ca^{2+}]_i(t)$ relativa à $[Ca^{2+}]_i(t)$ instantânea) a cada momento foi abordada na premissa 6 como *linearidade fraca*. Desta premissa resulta uma relação direta entre os $t_{1/2}$ s do relaxamento e os $t_{1/2}$ s da queda da $[Ca^{2+}]_i$. Os dois tempos de meia-vida relacionam-se através de $\alpha_c(g)$. O caso particular da premissa da *linearidade fraca* é corroborado por resultados empíricos apresentados posteriormente. Diferenciamos a equação (10) com relação ao tempo (vide desenvolvimento no Apêndice II, D):

$$\frac{d\Delta L(t)}{\Delta L(t)} = \alpha_c(g) \frac{d[Ca^{2+}]_i(t)}{[Ca^{2+}]_i(t)}, \quad (10-a)$$

Esta equação (10-a) expressa uma relação linear entre queda relativa da concentração de Ca^{2+} citosólica e aumento relativo do comprimento celular. De modo equivalente, a solução geral da equação diferencial ordinária (10-a), que obedece a premissa da *linearidade fraca*, é a equação (10).

Para que a premissa de *linearidade absoluta* fosse satisfeita, seria necessário que o coeficiente de *acoplamento químico-mecânico* entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ seja igual a $\alpha_c(g) = 1$ para qualquer tipo de contração C ou grupo g ($\alpha = 1$). Para satisfazer a premissa de *linearidade relativa*, bastaria que $\alpha_c(g) \neq 0$. Sob *linearidade relativa* o coeficiente de *acoplamento químico-mecânico* pode ser função de contrações C ou grupos g . Desta forma não assumimos que a relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ fosse incondicionalmente linear.

Os achados experimentais permitem manter a hipótese de que a queda *relativa* da $[Ca^{2+}]_i(t)$ seja função linear do relaxamento mecânico *relativo* (vide: I-2, premissa 6). Estimamos os $\alpha_c(g)$ ($\alpha_c(g) \neq 0$). Nossa abordagem completa permite o cálculo de correções necessárias para avaliar as participações relativas dos transportadores de Ca^{2+} a partir de parâmetros cinéticos de ΔL , mesmo para $\alpha_c(g)$ dependente das condições experimentais empregadas, ou seja, tipos de contração C ou grupos g .

I-4.1. Modelamento do relaxamento em função das constantes de transporte

Do *acoplamento químico-mecânico* entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ na equação (10), podemos derivar uma equação que expresse $\Delta L(t)$ em função das taxas de remoção de $Ca^{2+} - K_{A-RS}(g)$, $K_{NCX}(g)$, $K_{LENTOS}(g)$. A

equação a ser derivada possibilita a determinação das *participações relativas* dos três transportadores em função da variação do comprimento celular durante o relaxamento. Substituindo (4) em (10):

$$\Delta L(t) = \Delta L_{\max} \cdot e^{-\alpha_C(g) \cdot [K_{A-SR}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)] \cdot t} \quad (11)$$

Para nossas medições do curso temporal do relaxamento mecânico (estimado por $t_{1/2}$ de relaxamento), foi usado um protocolo experimental (para Tw, CafNT e Caf00) idêntico ao empregado para medição de $[Ca^{2+}]_i(t)$ (vide Bassani *et al.*, 1994). O bloqueio seletivo de transportadores n individuais implica, matematicamente em igualarmos sua constante K_n a zero. Empregando a equação (11), podemos expressar o $t_{1/2}$ do encurtamento dos diferentes tipos de contração como funções das constantes de transportadores de Ca^{2+} .

1. Tw:

$$t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g) = \frac{\ln 2}{\alpha_{Tw}(g) \cdot [K_{A-SR}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)]} \quad (12-a)$$

2. CafNT:

$$t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g) = \frac{\ln 2}{\alpha_{CafNT}(g) \cdot [K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)]} \quad (12-b)$$

3. Caf00 :

$$t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g) = \frac{\ln 2}{\alpha_{Caf00}(g) \cdot K_{LENTOS}(g)} \quad (12-c)$$

De modo geral:

$$t_{1/2}^{C, [Ca^{2+}]_i}(g) = \alpha_C \cdot t_{1/2}^{C, \Delta L}(g) \text{ para } C \in \{Tw, CafNT, Caf00\}. \quad (13)$$

A figura I-4 mostra a influência de α , constante para todos os tipos de contração C (Tw , $CafNT$ e $Caf00$), sobre o curso temporal do relaxamento do miócito em um grupo g qualquer. O tempo de relaxamento é inversamente proporcional ao α , sendo que um maior α acelera o relaxamento.

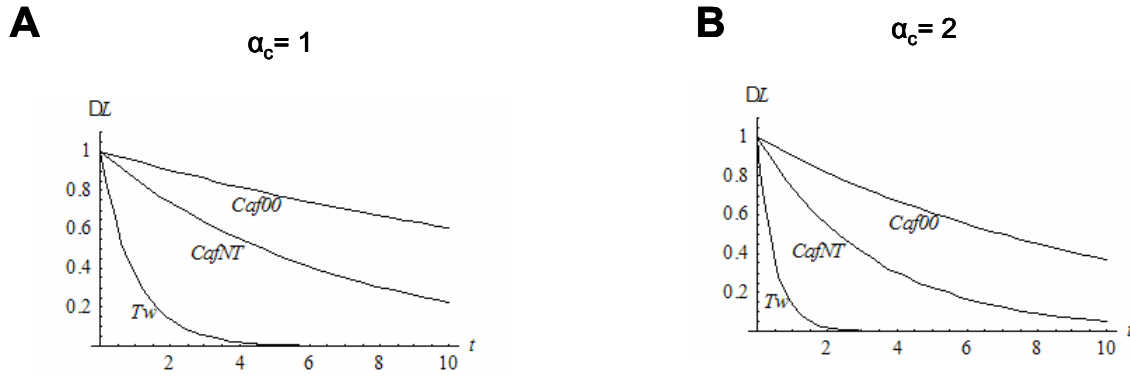


Figura I-4: Simulação do curso temporal do relaxamento nos três tipos de contrações - Tw , $CafNT$ e $Caf00$. Os parâmetros escolhidos para esta simulação foram: $\Delta L_{\max}=1$, $K_{A-RS}=0.85$; $K_{NCX}=0.10$; $K_{LENTOS}=0.05$. Um valor maior de α acelera o relaxamento, sem alterar a contribuição relativa dos três transportadores de Ca^{2+} no relaxamento.

I-4.2. Participações Relativas dos Transportadores de Ca^{+2} com dados do encurtamento

A partir das equações (12-a) a (12-c) e (5-a) a (5-c), PR_{A-RS} , PR_{NCX} e PR_{LENTOS} podem ser expressas por:

$$PR_{A-RS}(g) = 1 - \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{CafNT}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)} \quad (14-a)$$

$$PR_{NCX}(g) = \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{CafNT}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)} - \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{Caf00}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g)} \quad (14-b)$$

$$PR_{LENTOS}(g) = \frac{\alpha_{Tw}(g)}{\alpha_{Caf00}(g)} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g)} \quad (14-c)$$

de modo análogo às equações (9-a) a (9-c). Assim, a participação relativa PR_n de cada transportador n no fluxo total de remoção de Ca^{2+} citosólico poderia ser obtida a partir de $t_{1/2}^{[Ca]_i}$ ou $t_{1/2}^{\Delta L}$. Entretanto, isto é possível se o valor de α for conhecidamente igual para todas as condições experimentais empregadas, ou então necessitamos corrigir os $t_{1/2}^{\Delta L}$ empregando as fórmulas apresentadas em (14-a) a (14-c).

I-4.3. Determinação de α em função de ‘grupos experimentais’ (g) e ‘tipos de contração’ (C)

A equação (10) pode ser empregada para testar experimentalmente a relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$. Para tal, convinha aplicar o logaritmo com a finalidade de linearizar esta relação e facilitar a análise:

$$\ln \Delta L(t) = \ln k_C(g) + \alpha_C(g) \cdot \ln [Ca^{2+}]_i(t). \quad (10-b)$$

Em experimentos complementares realizados em nosso laboratório, foram obtidos dados pareados de $[Ca^{2+}]_i$ e relaxamento mecânico (ΔL) em células carregadas com o indicador de Ca^{2+} indo-1. Nestes experimentos padronizamos a faixa de variação de $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ entre a unidade e zero. O $\Delta L(t)$ varia entre a unidade ($\Delta L(0)$ comprimento mínimo ou pico da contração, correspondente à unidade) e zero ($\Delta L(\infty)$, comprimento diastólico, contração nula). A $[Ca^{2+}]_i(t)$ varia também entre a unidade ($[Ca^{2+}]_i(0)$ sistólica ou pico da $[Ca^{2+}]_i$) e zero ($[Ca^{2+}]_i(\infty)$ diastólico).

Foram obtidas medidas pareadas para mudanças relativas de $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ na faixa entre 30 e 70% de queda de $\Delta L_{\max}$ e $[Ca^{2+}]_{i,\max}$, durante o relaxamento nos três tipos de contração C e em miócitos dos quatro grupos experimentais g estudados. Por exemplo, a queda para 50% de $[Ca^{2+}]_{i,\max}$, a partir do respectivo pico correspondia a queda de $x\%$ de ΔL a partir de $\Delta L_{\max}$. A estimativa da relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ requer a identificação de dois parâmetros: $k_C(g)$ e $\alpha_C(g)$. Generalizamos a equação (10-b) para os nossos dados de células j e repetições r para vários níveis de $[Ca^{2+}]_i$ e ΔL correspondente, nos diferentes tipos de contração C e diferentes grupos g . Chegamos a equação de estimativa:

$$\ln \Delta L_{jr} = \ln k_C(g) + \alpha_C(g) \cdot [Ca^{2+}]_{i,jr} + \varepsilon_{jr}, \quad (10-c)$$

onde o ε_{jr} explicita o erro, possivelmente correlacionado entre tipos de contração C e repetições. A razão para esta possível correlação é que as observações são pareadas para tipos de contração C e que obtemos

da mesma células dados repetidos de ΔL remanescente e de $[Ca^{2+}]_i$ remanescente. Empregando o método dos mínimos quadrados (*Ordinary Least Square Regressions*) a estimativa de (10-c) foi conduzida por regressões separadas para cada tipo de contração C e para cada grupo g . A tabela I-1 mostra os resultados.

Tabela I-1.: α calculado por regressões com o método dos mínimos quadrados para os diferentes grupos C ($Sh2$, $Sh7$, $Coa2$ e $Coa7$) e tipos de contração g (Tw , $CafNT$ e $Caf00$).

ARQUIVO: 5b) ALFA-REGRESSOES COMPLETAS(TIPO BIA).DO

$C \backslash g$	Tw		$CafNT$		$Caf00$	
	$\ln k_C(g)$	$\alpha_C(g)$	$\ln k_C(g)$	$\alpha_C(g)$	$\ln k_C(g)$	$\alpha_C(g)$
Sh2	-0,050 + 0,04	0,874 + 0,05	-0,062 + 0,13	1,33 + 0,16	0,220 + 0,14	0,988 + 0,17
Coa2	-0,464 + 0,25	0,728 + 0,43	-0,398 + 0,17	0,911 + 0,28	0,116 + 0,16	0,813 + 0,20
Sh7	0,090 + 0,23	1,37 + 0,33	-0,144 + 0,21	1,21 + 0,28	-0,001 + 0,21	0,670 + 0,26
Coa7	-0,065 + 0,18	1,37 + 0,30	-0,077 + 0,12	1,45 + 0,22	0,118 + 0,14	0,844 + 0,18
Total	-0,201 + 0,11	0,966 + 0,16	-0,203 + 0,17	1,17 + 0,08	0,100 + 0,08	0,810 + 0,10

A seguir, diferenças entre os $\alpha_C(g)$ dos diferentes grupos g ($Coa2$, $Coa7$, $Sh2$, $Sh7$) e dos diferentes tipos de contração C (Tw , $CafNT$ e $Caf00$) foram testadas após análise *Seemingly Unrelated Regression* (SURE; Zellner 1962 e 1963) pelo teste *post hoc Wald*, segundo as hipóteses apresentadas abaixo. Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizadas no programa *Intercooled STATA 7* (College Station, Texas, USA).

Ainda analisando a equação (10-c), convém considerar o significado de $k_C(g)$ para nosso estudo. Sob a nossa padronização de que $[Ca^{2+}]_{i,max} = \Delta L_{max} = 100\% = 1$, a equação (10) implica que $k_C(g) = 1$ para qualquer valor de $\alpha_C(g)$. Assim, necessitamos $\ln k_C(g) = 0$. De fato, a tabela I-1 mostra que a hipótese de que $\ln k_C(g) = 0$ não pode ser rejeitada em quase todos os casos (exceto $C=Caf00$ e $g=Sh2$). Este achado corrobora a validade do modelo teórico.

I-4.4. Hipóteses sobre o coeficiente de ‘acoplamento químico-mecânico’ – $\alpha_C(g)$:

O modelo e os dados experimentais permitem três tipos de hipóteses a serem derivadas da relação aqui em termos gerais. Segundo a equação (13) temos:

$$t_{1/2}^{Tw,\Delta L}(g) = \frac{1}{\alpha_{Tw}(g)} t_{1/2}^{Tw,[Ca]i}(g) \quad (15-a)$$

$$t_{1/2}^{CafNT,\Delta L}(g) = \frac{1}{\alpha_{CafNT}(g)} t_{1/2}^{CafNT,[Ca]i}(g) \quad (15-b)$$

$$t_{1/2}^{Caf00,\Delta L}(g) = \frac{1}{\alpha_{Caf00}(g)} t_{1/2}^{Caf00,[Ca]i}(g) \quad (15-c)$$

Tais resultados permitem testes imediatos dos processos por trás do relaxamento:

- **Hipótese 1:** ΔL e $[Ca^{2+}]_i$ relacionam-se por *linearidade estrita*.

Inicialmente, poderíamos testar se a hipótese nula conjunta abaixo é satisfeita:

$$\mathbf{H_0:} \quad t_{1/2}^{Tw,\Delta L} = t_{1/2}^{Tw,[Ca]i} \quad \text{e} \quad t_{1/2}^{CafNT,\Delta L} = t_{1/2}^{CafNT,[Ca]i} \quad \text{e} \quad t_{1/2}^{Caf00,\Delta L} = t_{1/2}^{Caf00,[Ca]i}$$

Se esta H_0 fosse aceita, $\alpha_C = 1$ para todas as concentrações e a relação entre ΔL e $[Ca^{2+}]_i$ seria regida por uma relação linear e simples. Se esta H_0 fosse rejeitada, $\alpha_C \neq 1$, significaria que, na relação entre ΔL e $[Ca^{2+}]_i$, a linearidade deveria ser rejeitada em favor de uma relação não-linear entre ΔL e $[Ca^{2+}]_i$.

Os nossos dados não incluem medidas diretas de $t_{1/2}^{C,\Delta L}$ e $t_{1/2}^{C,[Ca]i}$ e testes diretos da hipótese 1 não foram possíveis. Porém, resultados do teste da hipótese 3 abaixo mostram que os $\alpha_C(g)$ dependem das contrações C . Isto implica que $\alpha_C(g) \neq 1$ em pelo menos um caso.

- **Hipótese 2:** A relação entre ΔL e $[Ca^{2+}]_i$ não depende dos grupos.

Nosso modelo matemático descreve completamente o relaxamento (sob o aspecto de controle da $[Ca^{2+}]_i$ e sob aspecto mecânico) nas equações (2) e (10). O modelo foi elaborado de forma que $\alpha(g)$ pudesse ser função dos grupos g . Podemos testar se $\alpha(g)$ é realmente função de grupos g . Fazendo um *pool* de todas as observações dos diferentes tipos de contrações em quatro conjuntos de dados segundo os grupos g (*Sh2*, *Coa2*, *Sh7*, *Coa7*), podemos testar (após análise SURE) se os $\alpha(g)$ realmente dependem dos grupos g :

$$H_0: \quad \alpha(Sh2) = \alpha(Coa2) = \alpha(Sh7) = \alpha(Coa7)$$

Nossos testes mostram que a igualdade acima não pôde ser rejeitada e g pode não ser considerado um fator determinante de α .

- **Hipótese 3:** A relação entre ΔL e $[Ca^{2+}]_i$ não depende das contrações.

De modo semelhante, podemos testar se α_C é realmente função de contrações C . Fazendo um *pool* de todas as observações dos diferentes grupos g em três conjuntos de dados para os tipos de contração C (*Tw*, *CafNT* e *Caf00*), podemos testar (após análise SURE) se α realmente depende de C (hipótese empiricamente confirmada).

$$H_0: \quad \alpha_{Tw} = \alpha_{CafNT} = \alpha_{Caf00}$$

A igualdade acima foi rejeitada e C é considerado um fator determinante de α .

Uma forma equivalente do teste, mas não exequível com os nossos dados, seria

$$H_0: \quad \alpha = \frac{t_{1/2}^{Tw, [Ca]_i}}{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}} = \frac{t_{1/2}^{CafNT, [Ca]_i}}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}} = \frac{t_{1/2}^{Caf00, [Ca]_i}}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}}$$

I-4.5. Testes de Significância dos $\alpha_C(g)$ (SURE & Wald)

a) Valores de $\alpha_C(g)$ apresentados em função de grupos g e tipos de contração C .

As estimativas de $\alpha_C(g)$ em função de cada grupo g e tipo de contração C são relatados na tabela I-1 (obtidos por regressão linear pelo método dos quadrados mínimos *Ordinary least square regressions* de níveis de $\ln \Delta L$ remanescente por $\ln [Ca^{2+}]_i$ remanescente). As estimativas foram analisadas por *Seemingly unrelated regressions (SURE)* e as hipóteses 2 ou 3 (item I-4.4) são testadas *post hoc* por um teste de *Wald*.

b) SURE – Seemingly Unrelated Regression

Devemos lembrar que os estimadores de $\alpha_C(g)$ não podem ser testados por testes de significância ordinários. A razão é que as observações de $\ln \Delta L_{jr}$ e $\ln [Ca^{2+}]_{i,jr}$ são interdependentes, pois as mesmas células foram submetidas a diferentes tipos de contração C e obtivemos diversos pares de dados de ΔL remanescente e $[Ca^{2+}]_i$ remanescente a partir de uma mesma célula. Esta interdependência introduz uma possível correlação entre os erros ε_{jr} e, conseqüentemente, entre os estimadores de $\alpha_C(g)$. Neste caso, a abordagem mais adequada para testar diferenças entre $\alpha_C(g)$ é a *Seemingly Unrelated Regression* (SURE, Zellner 1962, 1963).

SURE consiste de um sistema de equações aparentemente não relacionadas entre si (regressões lineares), mas de fato a SURE permite que estas equações sejam interdependentes através da correlação entre os erros ε_{jr} . A SURE calcula a covariância dos resíduos $\hat{\varepsilon}_{jr}$ para estimar a correlação entre os erros ε_{jr} . O cálculo da covariância dos resíduos $\hat{\varepsilon}_{jr}$ requer um número de observações igual para todos os tipos de contração C (painel balanceado), mas as regressões pelo método dos mínimos quadrados (Ordinary least Square – OLS) na SURE continuam fornecendo estimativas consistentes de $\alpha_C(g)$.

Nós queríamos testar as hipótese 2 e 3 (item I-4.4) de que o $\alpha_C(g)$ diferia entre os grupos g e entre os diferentes tipos de contração C . Após a análise SURE estimamos a covariância entre os erros através de uma matriz de correlações dos resíduos e empregamos um teste Breusch-Pagan para confirmar se as correlações são significativas (programa estatístico Intercooled Stata, College Station, TX, USA e STATA Manual, Release 6, 1999). O coeficiente de correlação representa a covariância por uma escala

que varia de “0 a 1”, sendo “0” correlação nula e “1” correlação máxima. Os resultados obtidos desta análise mostraram grande covariância entre os tipos de contração C .

As causas desta correlação podem provir de

- erros sistemáticos: resultantes de características inerentes ao sistema testado (mesmas células submetidas a diferentes tratamentos), causando uma correlação entre as regressões;
- erro sistemático de variável omitida: cuja causa de variação é dificilmente definida, pode se dever a variações das condições do ambiente (diferenças na solução de perfusão das células, que embora padronizadas podem apresentar leves variações);
- ruídos.

c) Teste de Wald

O teste de Wald é um teste post-hoc adequado para avaliar diferenças significativas entre estimadores passíveis de apresentar covariância, como os $\alpha_C(g)$ entre tipos de contração C (que apresentaram covariância significativa quando analisados por SURE). A estatística do teste de Wald (Wald 1943) é dada pela fórmula abaixo e distribuída χ^2 com GL graus de liberdade (GL é igual ao número de restrições no teste, ou seja o número de igualdades impostas no teste acumulado):

$$W = \frac{\hat{\alpha}_1 - \hat{\alpha}_2}{Var(\hat{\alpha}_1) - 2Cov(\hat{\alpha}_1, \hat{\alpha}_2) + Var(\hat{\alpha}_2)} \sim \chi^2(GL)$$

O teste de Wald assume que quaisquer grupos de variáveis podem covariar entre si, enquanto que outros testes de contraste padrão (exemplo teste t) assumem que a covariância seja nula ($Cov(\hat{\alpha}_1, \hat{\alpha}_2) = 0$). A hipótese nula é de que $\alpha_1 - \alpha_2 = 0$, $W = 0$. Enquanto que a estatística simples de Wald é aplicável quando a variância dos estimadores é conhecida, toda estimativa nesta dissertação é baseada em variâncias desconhecidas. Portanto, generalizamos os testes de Wald para o caso de variâncias desconhecidas, empregando o teste F , correspondente ao teste de Wald acima. A estatística de F foi calculada por:

$$F = (1/q) \cdot W \sim F(q, d)$$

onde q é o número de GL do teste; W , a estatística de Wald e d , o número de graus de liberdade do denominador. Esta estatística de F é distribuída com a distribuição de F de Snedecor.

Teste Wald para 'Grupos':

A hipótese de que $\alpha(\text{Coa2}) = \alpha(\text{Coa7}) = \alpha(\text{Sh2}) = \alpha(\text{Sh7})$ é testada pela verificação das igualdades simultâneas:

$$(1) \alpha(\text{Coa2}) = \alpha(\text{Coa7})$$

$$(2) \alpha(\text{Coa2}) = \alpha(\text{Sh2})$$

$$(3) \alpha(\text{Coa2}) = \alpha(\text{Sh7})$$

$$F(3, 136) = 0.51$$

$$\text{Prob} > F = 0.6781$$

RESULTADO: Não podemos rejeitar que os ' α ' ENTRE OS GRUPOS sejam iguais

Teste Wald para tipos de contrações C:

A hipótese de que $\alpha_{Tw} = \alpha_{CafNT} = \alpha_{Caf00}$ é testada pela verificação das igualdades simultâneas:

$$(1) \alpha_{Tw} = \alpha_{CafNT}$$

$$(2) \alpha_{Tw} = \alpha_{Caf00}$$

$$F(2, 144) = 4.23$$

$$\text{Prob} > F = 0.0164 \text{ (esta igualdade deve ser rejeitada)}$$

- Teste de Wald para as contrações: Tw vs. CafNT

Testando a hipótese $\alpha_{Tw} = \alpha_{CafNT}$ vimos que :

$$F(1, 144) = 1.82$$

$$\text{Prob} > F = 0.1792 \text{ (esta igualdade não pôde ser rejeitada)}$$

- Teste de Wald para as contrações: Tw vs. Caf00

Testando a hipótese $\alpha_{Tw} = \alpha_{Caf00}$, vimos que:

$$F(1, 144) = 0.03$$

$$\text{Prob} > F = 0.8724 \text{ (esta igualdade também não pode ser rejeitada)}$$

- Teste de Wald para as contrações: CafNT vs. Caf00

Testando a hipótese $\alpha_{CafNT} = \alpha_{Caf00}$, vimos que:

$$F(1, 144) = 7.99$$

$$\text{Prob} > F = 0.0054 \quad (\text{esta igualdade teve que ser rejeitada}).$$

Estes resultados mostram que α_{Caf00} difere claramente de α_{CafNT} . A ausência de significância entre α_{Tw} e α_{Caf00} deve ser relacionada à falta de poder do teste estatístico, dado o ruído e o pequeno número de observações, mas não necessariamente em função de falta de diferença entre α_{Tw} e α_{Caf00} .

Nós concluímos a partir dos testes de significância que:

Hipótese 2, $H_0: \alpha(\text{Sh2}) = \alpha(\text{Coa2}) = \alpha(\text{Sh7}) = \alpha(\text{Coa7})$ - não rejeitada

Hipótese 3, $H_0: \alpha_{Tw} = \alpha_{CafNT} = \alpha_{Caf00}$ - rejeitada após SURE

d) Correções para adequação do modelo à relação temporal entre a queda de $[Ca^{2+}]_i$ e relaxamento

Como observamos diferenças significativas entre os α_C , podemos concluir que a hipótese 3 deve ser rejeitada. Neste caso, não é possível que os α_C sejam todos ao mesmo tempo iguais a 1 e diferentes entre si. Conseqüentemente, temos que rejeitar a hipótese 1.

Isto mostra uma mudança no coeficiente de acoplamento químico-mecânico em função dos tipos de contração durante o relaxamento.

Como discutido no item I-4.2, a alteração de α em função das condições experimentais empregadas (tipos de contração C) requer que a estimativa das PR_n sejam corrigidas adequadamente, conforme mostraram as equações (14-a) a (14-c). Nós empregamos as estimativas de $\hat{\alpha}_{Tw}$, $\hat{\alpha}_{CafNT}$ e $\hat{\alpha}_{Caf00}$ da tabela I-1 para calcular os PR_n da seguinte forma:

$$PR_{A-RS}(g) = 1 - \frac{\hat{\alpha}_{Tw}}{\hat{\alpha}_{CafNT}} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)} \quad (14-a')$$

$$PR_{NCX}(g) = \frac{\hat{\alpha}_{Tw}}{\hat{\alpha}_{CafNT}} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{CafNT, \Delta L}(g)} - \frac{\hat{\alpha}_{Tw}}{\hat{\alpha}_{Caf00}} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw, \Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00, \Delta L}(g)} \quad (14-b')$$

$$PR_{LENTOS}(g) = \frac{\hat{\alpha}_{Tw}}{\hat{\alpha}_{Caf00}} \cdot \frac{t_{1/2}^{Tw,\Delta L}(g)}{t_{1/2}^{Caf00,\Delta L}(g)} \quad (14-c')$$

I-5. Conclusões

Nós concluímos que a abordagem de compartimentos é válida para a avaliação da relação entre nível contração remanescente e nível de $[Ca^{2+}]_i$ remanescente e que esta relação fornece informações sobre o acoplamento químico-mecânico durante o relaxamento. O fato de termos observado diferenças entre os α_c sugere alteração deste acoplamento (relação $[Ca^{2+}]_i$ - ΔL) em função do tratamento com cafeína em Tyrode $0Na^+.0Ca^{2+}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

– MODELO DE COMPARTIMENTOS:

BAILEY BA, DIPLA K, LI S, HOUSER SR. Cellular basis of contractile derangements of hypertrophied feline ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*;29:1823–1835, 1997.

BASSANI RA, BASSANI JW, BERS DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*;453:591-608, 1992.

BASSANI RA, BASSANI JWM AND BERS DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 476 (2): 279-293, 1994.

BASSANI RA AND BASSANI JWM. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun;282(6):H2406-13, 2002.

BERS, D. M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 283-284, 2001.

COBELLI C; SACCOMANI MP. Compartmental models of physiologic systems. In. BRONZINO, Joseph D. (Ed.). The biomedical engineering handbook. USA: CRC Press, p. 2375-2385, 1995.

ENDERLE JD, BLANCHARD SM, BRONZINO JD. Introduction to Biomedical Engineering. Academic Press, 2000.

GAMBASSI G, SPURGEON HA, LAKATTA EG, BLANK PS, CAPOGROSSI MC. Different effects of alpha- and beta-adrenergic stimulation on cytosolic pH and myofilament responsiveness to Ca^{2+} in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1992 Oct;71(4):870-82.

KAGAYA Y, HAJJAR RJ, GWATHMEY JK, BARRY WH, LORELL BH. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril improves depressed responsiveness to Ca in myocytes from aorticbanded rats. *Circulation*; 94:2915–2922, 1996.

KINUGAWA S, TSUTSUI H, SATOH S, TAKAHASHI M, IDE T, IGARASHISAITO K, ARIMURA K, EGASHIRA K, TAKESHITA A. Role of Ca availability to myofilaments and their sensitivity to Ca in myocyte contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovascular Research* 44, 398–406, 1999.

LI P, HOFMANN PA, LI B, MALHOTRA A, CHENG W, SONNENBLICK EH, MEGGS LG, ANVERSA P. Myocardial infarction alters myofilament calcium sensitivity and mechanical behavior of myocytes. *Am J Physiol*; 272: H360-70, 1997.

- PALMER S & KENNTISH JC. Effect of caffeine and pH on Ca binding to isolated troponin. C. Biophysical Journal 57, 147a, 1990.
- PERREAULT CL, SHANNON RP, KOMAMURA K, VATNER SF, MORGAN JP. Abnormalities in intracellular calcium regulation and contractile function in myocardium from dogs with pacing-induced heart failure. J Clin Invest; 89:932–938, 1992.
- O’LEARY E, COLSTON J, FREEMAN G. Maintained length-dependent Enantioactivation of skinned myocardial fibers in tachycardia heart failure. Circulation; 86:I–284, 1992.
- ROUSSEAU E, MEISSNER G. *Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel: Activation by caffeine.* Am. J. Physiol. 256: H328-H333, 1989.
- SHEPARD RIGGS D. Transfer of Substances between Biological Compartments. General Kinetics (Cap 8). In: The Mathematical Approach to Physiological Problems : A Critical Primer. The MIT Press, 2a Ed., February, 1970.
- SPURGEON HA, DUBELL WH, STERN MD, SOLLITT SJ, ZIMAN BD, SILVERMAN HS, CAPOGROSSI MC, TALO A, LAKATTA EG. Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. J Physiol.; 447:83-102, 1992.
- Stata Manual, StataCorp. Stata Statistical Software: Release 6.0. College Station, TX, USA. Stata Press, 1999.
- ZELLNER, A. In: An efficient method of estimating seeming unrelated regressions and tests for aggregation bias, Journal of the American Statistical Association 57: 348-68, 1962.
- ZELLNER, A. Estimators for seemingly unrelated regression equations: Some exact finite sample results, Journal of the American Statistical Association 58: 977-92, 1963.
- WALD, A. “Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large”, Transactions of the American Mathematical Society 54(3), 426-482, 1943.
- WENDT IR & STENPHENSON DG. Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the rat. Pflügers Archiv 398, 210-216, 1983.
- WANG J, FLEMAL K, QIU Z ET AL.. Ca handling and myofibrillar Ca sensitivity in ferret cardiac myocytes with pressure-overload hypertrophy. Am J Physiol; 267:H918–H924, 1994.
- WOLFF MR, WHITESELL LF, MOSS RL. Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure. Circ Res; 76:781–789, 1995.
- WOLFF MR, BUCK SH, STOKER SW, GREASER ML, MENTZER RM. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered b-adrenergically mediated protein phosphorylation. J Clin Invest; 98:167–176, 1996.

APÊNDICE II:

Algumas Equações do Modelo de Compartimentos adaptado para o estudo do Relaxamento de Miócitos

Apêndice II

A. Solução da equação (2)

A equação ordinária diferencial (1) pode ser reescrita como

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i(t)}{[Ca^{2+}]_i(t)} = -K_{A-RS}(g) \cdot dt - K_{NCX}(g) \cdot dt - K_{LENTOS}(g) \cdot dt$$

Integrando ambos os lados

$$\int \frac{d[Ca^{2+}]_i(t)}{[Ca^{2+}]_i(t)} = -\int K_{A-RS}(g) \cdot dt - \int K_{NCX}(g) \cdot dt - \int K_{LENTOS}(g) \cdot dt + C$$

temos

$$\ln[Ca^{2+}]_i(t) = -K_{A-RS}(g) \cdot t - K_{NCX}(g) \cdot t - K_{LENTOS}(g) \cdot t + C$$

sendo $C \in \mathbf{R}$, esta equação equivale à:

$$[Ca^{2+}]_i(t) = [Ca^{2+}]_{i,\max} \cdot e^{-[K_{A-RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{LENTOS}(g)] \cdot t + C}.$$

B. $[Ca^{2+}]_i(t)$ expresso em função da condição inicial $[Ca^{2+}]_{i,\max}$ e de K_n :

Como “ e^c ” corresponde a condição inicial da análise, ou seja, $[Ca^{2+}]_i$ de pico. Neste caso resolvemos a equação (1), sendo $e^c \equiv [Ca]_{i,\max}$:

$$[Ca^{2+}]_i = e^{-K_{A-RS}(g) \cdot t - K_{NCX}(g) \cdot t - K_{Slow}(g) \cdot t} \cdot e^C$$

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{i,\max} \cdot e^{-[K_{RS}(g) + K_{NCX}(g) + K_{Slow}(g)]t}$$

C. Tempo de meia-vida em uma função “ e ”

O tempo de meia-vida de uma variável $X(t)$ é definido como o tempo compreendido entre o momento t_1 e o momento t_2 , sendo X reduzido à sua metade: $X(t_2) = \frac{1}{2} X(t_1)$. O tempo de meia-vida é representados por $t_{1/2} \equiv t_2 - t_1$

Consideremos a função $X(t) = e^{-kt}$. Então

$$X(t_1) = e^{-kt_1} \quad \text{e} \quad X(t_2) = e^{-kt_2} = \frac{1}{2} X(t_1)$$

Deste modo,

$$2 = \frac{X(t_1)}{X(t_2)} = \frac{e^{-kt_1}}{e^{-kt_2}} = e^{-k(t_2 - t_1)}$$

e

$$\ln 2 = k(t_2 - t_1) .$$

Portanto,

$$t_{1/2} = t_2 - t_1 = \frac{\ln 2}{k}$$

D. Derivação da relação entre $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ com relação ao tempo

$$\Delta L(t) = k_c(g) \cdot ([Ca^{2+}]_i(t))^{\alpha_c(g)} \quad (10)$$

Como $\Delta L(t)$ e $[Ca^{2+}]_i(t)$ são funções do tempo t , aplicamos a regra da cadeia, $dg(f(x)) = g'(f(x)) \cdot f'(x) \cdot dx$, para derivar a equação (10) com relação ao tempo,:

$$d\Delta L(t) = \alpha_c(g) \cdot k_c(g) \cdot ([Ca^{2+}]_i(t))^{\alpha_c(g)-1} \cdot d[Ca^{2+}]_i(t)$$

$$d\Delta L(t) = \alpha_c(g) \cdot k_c(g) \cdot \frac{([Ca^{2+}]_i(t))^{\alpha_c(g)}}{[Ca^{2+}]_i(t)} \cdot d[Ca^{2+}]_i(t)$$

Como $k_c(g) \cdot ([Ca^{2+}]_i(t))^{\alpha_c(g)} = \Delta L(t)$ na equação (10), então

$$d\Delta L(t) = \alpha_c(g) \cdot \frac{\Delta L(t)}{[Ca^{2+}]_i(t)} \cdot d[Ca^{2+}]_i(t)$$

e

$$\frac{d\Delta L(t)}{\Delta L(t)} = \alpha_c(g) \frac{d[Ca^{2+}]_i(t)}{[Ca^{2+}]_i(t)}. \quad (10-a)$$

9. APÊNDICE III –

BANCO DE DADOS

TABELAS COM DADOS INDIVIDUAIS

- DADOS INDIVIDUAIS**
- MÉDIAS + EPM**
- RESULTADOS DAS ESTATÍSTICAS**

Convenções:

- Protocolo: tipo de protocolo experimental adotado nos experimentos de fisiologia
 Prot. 1: participação relativa, conforme a figura 3.#
 Prot. 2: resposta do miócito à variação da concentração externa de cálcio
 Prot. 3: perda de cálcio do RS durante pausa sob estímulo da troca NCX
 PT-PCR
- grupo: tipo de grupo
- ID Rato identificação do rato
- ID Cel. identificação da célula
- indpair experimentos pareados
- $[Ca]_o$: concentração de cálcio extracelular utilizada no ‘Prot. 2’ ($[Ca^{+2}]_o$)
- Tw amplitude do Tw (ΔL_{Tw})
- Cafnt amplitude da contratura de CafNT (ΔL_{CafNT})
- Caf00 amplitude da contratura de Caf00 (ΔL_{Caf00})
- ttptw amplitude de contração do Tw pós-pausa
- $t_{1/2Tw}$ $t_{1/2}$ do relaxamento do Tw
- $t_{1/2CafNT}$ $t_{1/2}$ do relaxamento da CafNT
- $t_{1/2Caf00}$ $t_{1/2}$ do relaxamento da Caf00

1) DADOS REFERENTES AOS ANIMAIS:

1.1. Animais usados no RT-PCR

Grupo	Lote	ID Rato	Pressão Sistólica Carótida (mmHg)	Pressão Diastólica Carótida (mmHg)	Pressão Sistólica Femoral (mmHg)	Pressão Diastólica Femoral (mmHg)	Gradiente Sistólico (mmHg)	Pressão Arterial Média (mmHg)	Frequência Cardíaca (bat/min)
Coa7	L1	1	174	118	139	104	35	120	423
Coa7	L2	3	159	101	119	84	40	103	400
Coa7	L5	1	172	110	135	102	37	119	401
Coa7	L5	2	173	113	132	108	41	120	387
Coa7	L6	3	160	107	126	104	34	117	412
Coa7	L7	4	167	112	127	109	40	117	390
Coa7	L7	5	177	113	137	106	40	120	363
Coa7	L7	6	179	111	132	106	47	119	404
Sh7	L1	1	116	95	_____	_____	_____	107	420
Sh7	L2	4	122	104	_____	_____	_____	115	360
Sh7	L5	1	128	98	_____	_____	_____	114	380
Sh7	L5	2	115	89	_____	_____	_____	102	410
Sh7	L6	3	129	107	_____	_____	_____	117	426
Sh7	L6	4	126	98	_____	_____	_____	109	340
Sh7	L7	5	129	91	_____	_____	_____	110	360
Sh7	L7	6	130	106	_____	_____	_____	119	385
Sh7	L7	7	118	88	_____	_____	_____	103	360
Sh7	L7	8	130	104	_____	_____	_____	112	400

Notas:

- cada observação é definida por 'grupo', 'lote' e 'ID Rato'

1.2. ANIMAIS USADOS NOS EXPERIMENTOS DE FISILOGIA

Grupo	ID Rato	Pressão Sistólica Carótida (mmHg)	Pressão Diastólica Carótida (mmHg)	Pressão Sistólica Femoral (mmHg)	Pressão Diastólica Femoral (mmHg)	Gradiente Sistólico (mmHg)	Pressão Arterial Média (mmHg)	Razão VE/VD ^a	Frequência Cardíaca (bat/ min)
Coa2	01-10-19.	161	106	120	95	41	133	1.41	420
Coa2	01-11-28.	161	106	120	95	41	131	1.38	420
Coa2	02-01-25.	173	119	133	110	40	122	2.00	397
Coa2	02-02-22.	167	114	127	105	40	116	2.58	406
Coa2	02-03-08.	163	103	122	92	41	108	1.15	393
Coa2	02-04-26.	176	109	133	98	43	117	1.54	412
Coa2	02-05-24.	167	114	126	104	41	116	1.32	433
Coa2	02-09-04.	164	109	124	98	40	111	1.35	376
Coa2	02-09-25.	179	108	135	104	44	120	1.31	387
Coa2	02-12-05.	182	118	136	108	49	122	1.26	347
Coa2	03-01-08.	169	115	128	112	41	120	1.29	400
Coa2	03-02-06.	167	118	124	110	43	118	2.32	401
Coa2	03-02-13.	161	126	113	101	48	108	2.03	367
Coa7	02-01-30.	173	115	139	114	34	126	2.20	380
Coa7	02-01-31.	172	113	137	112	35	124	2.05	412
Coa7	02-03-13.	167	112	137	109	40	123	2.10	332
Coa7	02-05-03.	169	101	128	98	41	113	2.89	330
Coa7	02-08-27.	173	119	132	109	41	120	1.89	416
Coa7	02-10-29.	164	105	118	112	46	111	1.94	406
Coa7	03-01-16.	162	103	120	100	44	110	2.21	397
Coa7	03-01-23.	170	120	132	110	38	120	2.61	342
Sh2	01-11-09.	131	95	—	—	—	114	1.38	396
Sh2	01-12-05.	131	108	—	—	—	120	1.47	488
Sh2	02-04-03.	131	107	—	—	—	121	1.71	330
Sh2	02-05-16.	138	102	—	—	—	118	1.46	420
Sh2	02-05-23.	126	102	—	—	—	114	1.42	410
Sh2	02-10-16.	129	101	—	—	—	115	2.00	426
Sh2	02-10-30.	118	91	—	—	—	109	1.12	360
Sh2	02-12-18.	130	107	—	—	—	115	1.32	416
Sh2	03-01-29.	128	108	—	—	—	118	1.46	376
Sh7	01-11-13.	132	101	—	—	—	118	2.10	363
Sh7	02-02-26.	138	106	—	—	—	122	2.24	350
Sh7	02-05-28.	141	100	—	—	—	120	1.31	412
Sh7	02-05-29.	130	107	—	—	—	120	1.26	332
Sh7	02-08-16.	123	98	—	—	—	112	1.33	400
Sh7	02-09-20.	130	103	—	—	—	118	1.44	400
Sh7	02-10-15.	130	107	—	—	—	120	1.63	419
Sh7	02-10-23.	131	104	—	—	—	118	1.24	358
Sh7	02-12-10.	132	98	—	—	—	115	1.18	396
Sh7	03-01-30.	131	96	—	—	—	114	1.23	402
Sh7	03-02-12.	134	103	—	—	—	119	1.60	397
Sh7	03-02-21.	130	111	—	—	—	120	1.21	431

a) Razão entre as massas dos ventrículos esquerdo e direito.

2) EXPERIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR – RT-PCR (ITEM 3.6)

RNA _m	Produto (bp)	RNA _m / β-actina								$\frac{Coa7}{Sh7}$	Teste-t p< 0,05	Teste-MW p< 0,05
		(média ± sem (n))										
		Sh7				Coa7						
Serca2a	196 bp	0.75	±	0,075	(3)	1.15	±	0.16	(5)	1.53	0,0750	0.0526
PLB	126 bp	2.43	±	Ns	(4)	1.45	±	0.17	(5)	0.59	0.2119	0.2207
Serca2a/PLB	--	0.40	±	*	(3)	1.03	±	0.17	(5)	2.57	0.0480 *	0.0253 *
CSQ	980 bp	1.61	±	0.058	(2)	2.13	±	0.89	(3)	1.32	0.05644	0.5637
RyR ₂	620 bp	1.45	±	ns	(2)	2.13	±	0.95	(5)	1.46	0.5176	1.0000
NCX	826 bp	0.98	±	0.058	(5)	1.69	±	0.27	(6)	1.69	0.0589	0.0679

Notas:

1) Em função de nossas amostras serem pequenas, realizamos um teste normalidade (Shapiro-Francia) e observamos que estas não apresentavam distribuição normal (Serca2a, CSQ e RyR₂). Por esta razão, além do teste t empregamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (Mann-Whitney Test).

2) Tanto a Serca2a quanto PLB foram normalizados pela β -actina (Serca2a/ β -actina e PLB/ β -actina). Entretanto quando expressamos nossos resultados pela razão entre o mRNA da Serca2a e o do PLB obtidos da mesma célula, desconsideramos a β -actina – denominador comum a ambos.

2.1) SERCA2a:

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β-actina (pixel²)	Serca2a (pixel²)	Serca2a/ β-actina
Coa7	L1	1	T2	9713	9288	0.956244
Coa7	L2	3	T2	12061	11430	0.947683
Coa7	L5	1	T3	6280	6171	0.982643
Coa7	L5	2	T1	9332	11145	1.194278
Coa7	L7	5	T1	2555	4286	1.677495
Sh7	L2	4	T2	15705	12100	0.770455
Sh7	L5	1	T4	4551	4326	0.95056
Sh7	L6	3	T1	2098	1112	0.530029

2.2) PLB:

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β-actina (pixel²)	PLB (pixel²)	PLB/ β-actina
Coa7	L2	3	T2	12061	14447	1.197828
Coa7	L5	1	T1	9332	14721	1.577475
Coa7	L5	2	T3	6280	6460	1.028662
Coa7	L6	3	T1	5661	10477	1.850733
Coa7	L7	5	T1	2555	4081	1.59726
Sh7	L5	1	T4	4551	13904	3.055153
Sh7	L5	2	T1	2098	8070	3.84652
Sh7	L6	3	T1	12662	14559	1.149818
Sh7	L6	4	T1	4967	8320	1.675055

2.3) SERCA2A/PLB:

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β -actina (pixel ²)	Serca2a (pixel ²)	PLB (pixel ²)	Serca2a/PLB
Coa7	L2	3	T2	12061	11430	14447	0.791168
Coa7	L5	1	T1	2000	8369	5189	1.612835
Coa7	L5	2	T1	9332	11145	14721	0.757082
Coa7	L5	3	T3	6280	6171	6460	0.955263
Coa7	L7	5	T1	2555	4286	4081	1.050233
Sh7	L2	4	T2	15705	12100	16150	0.749226
Sh7	L5	1	T4	4551	4326	13904	0.311134
Sh7	L6	3	T1	2098	1112	8070	0.137794

2.4) CSQ

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β -actina (pixel ²)	CSQ (pixel ²)	CSQ/ β -actina
Coa7	L5	1	T3	23343	32741	1.402605
Coa7	L5	2	T3	18241	25653	1.406337
Coa7	L6	3	T1	5661	20384	3.600777
Sh7	L6	3	T1	12662	16437	1.298136
Sh7	L6	4	T1	4967	9579	1.928528

2.5) RyR₂

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β -actina (pixel ²)	RyR ₂ (pixel ²)	RyR ₂ / β -actina
Coa7	L2	1	T2	12061	12580	1.043031
Coa7	L2	3	T2	9713	8717	0.897457
Coa7	L5	1	T1	2000	10978	5.489
Coa7	L5	1	T1	9332	15486	1.659451
Coa7	L5	2	T3	6280	9827	1.564809
Sh7	L2	4	T2	15705	15442	0.983254
Sh7	L5	1	T4	4551	8753	1.923313

2.6) NCX

Cirurgia	Lote	ID Rato	Transcrição	β -actina (pixel ²)	NCX (pixel ²)	NCX/ β -actina
Coa7	L2	3	T2	12061	12317	1.021225
Coa7	L5	1	T3	23343	32397	1.387868
Coa7	L5	2	T3	6280	9226	1.469108
Coa7	L7	4	T1	1957	5087	2.599387
Coa7	L7	5	T1	2555	5663	2.216438
Coa7	L7	6	T1	1608	2246	1.396766
Sh7	L2	4	T2	15705	12913	0.822222
Sh7	L7	5	T1	2224	2666	1.198741
Sh7	L7	6	T1	2451	1676	0.683803
Sh7	L7	7	T1	1651	2644	1.601454
Sh7	L7	8	T1	3152	1841	0.584074

3) EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS – VARIÁVEIS EM COMUM

Grupo	ID Rato	ID Cel.	Lo (μm)	Largura (μm)	Tw (% Lo)	Caf00 (%Lo)	$t_{1/2Tw}$ (s)
Coa2	01-10-19.	2	90	20	11.56	26.67	0.16
Coa2	01-10-19.	3	118	35	13.9	28.81	0.14
Coa2	01-10-19.	6	115	20	9.04	34.78	0.18
Coa2	01-10-19.	7	105	30	8.38	36.95	0.22
Coa2	01-11-28.	1	140	28	9.14	20.57	0.14
Coa2	02-01-25.	6	100	25	5.8	10	0.41
Coa2	02-02-22.	2	100	25	6.8	29.2	0.25
Coa2	02-03-08.	3	85	20	15.06	53.18	0.23
Coa2	02-03-08.	4	85	20	14.35	51.76	0.24
Coa2	02-03-08.	4	90	30	6.67	19.11	0.36
Coa2	02-03-08.	5	85	18	12	37.65	0.20
Coa2	02-03-08.	6	120	30	7.33	19.67	0.15
Coa2	02-04-26.	1	110	20	14	27.64	0.20
Coa2	02-04-26.	2	85	25	14.82	42.35	0.23
Coa2	02-05-24.	1*	90	30	5.55	54.66	0.25
Coa2	02-09-04.	2*	90	25	3.11	25.55	0.14
Coa2	02-09-04.	3*	95	22	16	36.63	0.17
Coa2	02-12-05.	2	50	17	13.2	32	0.18
Coa2	03-01-08.	1	120	20	12.5	29	0.16
Coa7	02-01-30.	1	88	28	6.82	26.36	0.36
Coa7	02-01-30.	3	135	25	8.59	18.37	0.34
Coa7	02-01-30.	4	110	30	1.64	8.73	0.24
Coa7	02-01-31.	10	105	25	8.57	22.86	0.29
Coa7	02-01-31.	11	100	25	12	18	0.44
Coa7	02-01-31.	2	110	30	8.18	11.63	0.35
Coa7	02-01-31.	5	100	22	7.4	25.6	0.23
Coa7	02-01-31.	6	100	26	12.8	20.8	0.23
Coa7	02-01-31.	7	90	20	4	20.89	0.54
Coa7	02-03-13.	2	90	20	11.11	28.89	0.15
Coa7	02-03-13.	8	90	25	6.89	22.22	0.20
Coa7	02-05-03.	3	100	32	20	43.2	0.17
Coa7	02-08-27.	2*	105	31	11.42	27.8	0.17
Coa7	02-10-29.	5*	120	25	12.66	21.33	0.15
Coa7	02-10-29.	6*	85	40	5.76	15.29	0.16
Coa7	03-01-16.	5	110	30	12	34.54	0.20
Sh2	01-11-09.	2	110	38	21.82	35.64	0.20
Sh2	01-11-09.	5	130	18	11.54	35.68	0.15
Sh2	01-11-09.	7	90	35	13.56	32.89	0.22
Sh2	01-11-09.	9	100	25	11.8	29.2	0.24
Sh2	01-12-05.	1	100	20	6.8	39.2	0.15
Sh2	01-12-05.	10	95	20	10.95	14.95	0.18
Sh2	01-12-05.	12	96	20	5.21	23.54	0.16
Sh2	01-12-05.	6	110	20	16.73	32.76	0.23
Sh2	01-12-05.	9	90	20	7.33	28	0.19
Sh2	02-04-03.	2	100	25	16	38	0.27

Sh2	02-05-16.	6*	75	24	16	72.53	0.19
Sh2	02-10-16.	4*	70	28	18.85	47.42	0.19
Sh2	02-12-18.	2	105	30	17.52381	19.04762	0.17
Sh2	02-12-18.	5	90	30	17.77778	24.88889	0.19
Sh7	01-11-13.	1	128	28	14.38	25.63	0.16
Sh7	01-11-13.	2	100	22	13.2	42.4	0.19
Sh7	01-11-13.	4	100	30	9.4	23.6	0.16
Sh7	01-11-13.	5	120	25	10.33	27	0.14
Sh7	01-11-13.	7	100	24	12.4	23.6	0.17
Sh7	02-02-26.	9	100	25	5.8	21	0.14
Sh7	02-05-28.	2	85	25	14.58	35.76	0.21
Sh7	02-05-29.	3	105	23	10.66	25.71	0.23
Sh7	02-05-29.	4	105	23	6.28	32.38	0.16
Sh7	02-10-15.	4*	110		8.36	30.18	0.16
Sh7	02-10-23.	5*	105	30	7.61	28.57	0.14
Sh7	02-12-10.	2	90	30	10.22	25.77	0.17
Coa2	02-09-04.	2	90	25	3.11	25.55	0.14
Coa2	02-09-25.	2	120	15	3.33	25	0.33
Coa2	03-02-06.	3	90	25	13.33	19.8	0.18
Coa2	03-02-06.	5	80	30	10.9	43.75	0.20
Coa2	03-02-06.	6	92	25	5.7	27.82	0.28
Coa7	02-08-27.	3	105	28	7.8	15.61	0.21
Coa7	02-08-27.	6	100	29	15.2	15.2	0.19
Coa7	02-08-27.	8	70	28	8.57	23.14	0.21
Coa7	02-08-27.	9	70	30	8.85	15.42	0.34
Coa7	02-10-29.	1	105	35	13.33	25.14	0.21
Coa7	03-01-23.	3	115	25	3.23	16	0.22
Coa7	03-01-23.	4	115	25	12.86	20.86	0.23
Sh2	02-10-16.	2	135	28	8.14	31.4	0.15
Sh2	02-10-16.	5	80	28	8.75	16	0.21
Sh2	02-10-30.	3	120	35	5.33	21	0.17
Sh2	02-12-18.	1	85	18	9.411765	27.05	0.15
Sh2	02-12-18.	3	100	20	11	21.6	0.13
Sh2	03-01-29.	1	80	30	18.25	32.75	0.14
Sh2	03-01-29.	4	100	20	8.4	25	0.13
Coa2	03-02-06.	1	110	20	15.63	39	0.24
Coa2	03-02-06.	2	90	20	4.9	17.8	0.14
Coa2	03-02-13.	2	98	15	19.18	31.02	0.22
Coa2	03-02-13.	3	110	30	11.09	37.09	0.17
Coa7	02-10-29.	7	85	40		12	
Coa7	02-10-29.	8	90	30		37.77	
Coa7	03-01-16.	2	90	30	9.33	28.44	0.21
Sh2	03-01-29.	3	90	25	11	34.66	0.13
Sh7	03-01-30.	2	90	30	10.66	42.66	0.16
Sh7	03-01-30.	3	100	20	7.2	21.6	0.17
Sh7	03-02-12.	2	120	20	10	33.33	0.16
Sh7	03-02-21.	5	110	20	7.14	20.51	0.14
Sh7	03-02-21.	6	100	24	13.92	23.99	0.19
Sh7	03-02-21.	7	75	30	5.6	27.37	0.18

- **L_o** : comprimento do miócito em repouso (em μm)
- **Tw (% L_o)**: amplitude de contração evocada por estimulação elétrica, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **$Caf00$ (% L_o)**: amplitude da contratura evocada por cafeína em Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **$t_{1/2Tw}$ (s)**: tempo para 50% de relaxamento a partir do pico da contração Tw (expresso em segundos).

* Dado comum aos experimentos de ‘Participação Relativa’ e ‘Resposta ao $[\text{Ca}^{+2}]_o$ ’.

** Dado comum aos experimentos de ‘Participação Relativa’, ‘Resposta ao $[\text{Ca}^{+2}]_o$ ’ e ‘Perda diastólica de cálcio’.

4) EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS –

PARTICIPAÇÃO RELATIVA DOS TRANSPORTADORES DE Ca^{2+} NO RELAXAMENTO DE MIÓCITOS

VALORES DE ‘ $t_{1/2}$ ’ CORRIGIDOS POR α

GRUPO	ID RATO	ID CEL.	Dados Isolados						Dados Isolados corrigidos por ‘ α ’					
			$t_{1/2Tw}$ (s)	$t_{1/2CaNT}$ (fas) (s)	$t_{1/2CaT00}$ (fas) (s)	PR_{RS} (%)	PR_{NCX} (%)	PR_{Lentos} (%)	$t_{1/2Tw}$ (s)	$t_{1/2CaNT}$ (fas) (s)	$t_{1/2CaT00}$ (fas) (s)	PR_{RS} (%)	PR_{NCX} (%)	PR_{Lentos} (%)
Coa2	01-10-19.	2	0.16	1.00	4.42	84.00	12.38	3.62	0.15	1.17	3.58	86.80	8.88	4.32
Coa2	01-10-19.	6	0.18	1.20	5.05	85.00	11.44	3.56	0.17	1.41	4.09	87.63	8.12	4.25
Coa2	01-10-19.	7	0.22	1.66	6.20	86.75	9.70	3.55	0.21	1.94	5.02	89.07	6.70	4.23
Coa2	02-01-25.	6	0.41	1.10	9.50	62.73	32.96	4.32	0.40	1.29	7.69	69.26	25.60	5.15
Coa2	02-02-22.	2	0.25	1.00	3.40	75.00	17.65	7.35	0.24	1.17	2.75	79.38	11.85	8.77
Coa2	02-03-08.	3	0.23	3.00	8.27	92.33	4.89	2.78	0.22	3.51	6.70	93.68	3.01	3.32
Coa2	02-03-08.	4	0.24	1.50	11.52	84.00	13.92	2.08	0.23	1.76	9.33	86.80	10.71	2.49
Coa2	02-03-08.	4	0.36	1.08	8.20	66.67	28.94	4.39	0.35	1.26	6.64	72.51	22.26	5.24
Coa2	02-03-08.	5	0.20	1.22	5.40	83.61	12.69	3.70	0.19	1.43	4.37	86.48	9.10	4.42
Coa2	02-03-08.	6	0.15	1.40	7.00	89.29	8.57	2.14	0.14	1.64	5.67	91.16	6.28	2.56
Coa2	02-04-26.	1	0.20	2.44	10.96	91.64	6.50	1.86	0.20	2.86	8.87	93.10	4.67	2.22
Coa2	02-04-26.	2	0.23	1.83	15.67	87.43	11.10	1.47	0.22	2.14	12.69	89.63	8.62	1.75
Coa2	02-05-24.	1*	0.25	1.78	5.22	85.96	9.26	4.79	0.24	2.08	4.23	88.42	5.87	5.71
Coa2	02-09-04.	2*	0.14	0.80	4.18	82.50	14.15	3.35	0.14	0.94	3.39	85.57	10.44	4.00
Coa2	02-09-04.	3*	0.17	1.20	6.00	85.83	11.33	2.83	0.16	1.41	4.86	88.31	8.31	3.38
Coa7	02-01-30.	1	0.36	0.90	9.80	60.00	36.33	3.67	0.35	1.05	7.94	67.01	28.61	4.38
Coa7	02-01-30.	3	0.34	1.08	4.40	68.52	23.75	7.73	0.33	1.26	3.56	74.03	16.75	9.22
Coa7	02-01-30.	4	0.23	1.62	7.33	85.80	11.06	3.14	0.22	1.90	5.94	88.29	7.97	3.74
Coa7	02-01-31.	10	0.29	1.50	8.10	80.67	15.75	3.58	0.28	1.76	6.56	84.05	11.68	4.27
Coa7	02-01-31.	6	0.23	1.53	3.00	84.97	7.37	7.67	0.22	1.79	2.43	87.60	3.25	9.15
Coa7	02-01-31.	7	0.54	2.00	10.90	73.00	22.05	4.95	0.52	2.34	8.83	77.73	16.36	5.91

Coa7	02-03-13.	2	0.15	1.80	5.95	91.67	5.81	2.52	0.14	2.11	4.82	93.13	3.87	3.01
Coa7	02-03-13.	8	0.20	1.53	7.10	86.93	10.25	2.82	0.19	1.79	5.75	89.22	7.42	3.36
Coa7	02-05-03.	3	0.17	1.00	12.50	83.00	15.64	1.36	0.16	1.17	10.12	85.98	12.40	1.62
Coa7	02-08-27.	2*	0.17	1.55	7.12	89.03	8.58	2.39	0.16	1.82	5.77	90.95	6.20	2.85
Sh2	01-11-09.	2	0.20	0.80	2.90	75.00	18.10	6.90	0.19	0.94	2.35	79.38	12.39	8.23
Sh2	01-11-09.	7	0.22	1.53	18.00	85.62	13.16	1.22	0.21	1.79	14.58	88.14	10.40	1.46
Sh2	01-11-09.	8	0.20	0.74	2.50	72.97	19.03	8.00	0.19	0.87	2.02	77.71	12.75	9.54
Sh2	01-12-05.	1	0.15	0.84	4.00	82.14	14.11	3.75	0.14	0.98	3.24	85.27	10.26	4.47
Sh2	01-12-05.	10	0.18	1.10	5.20	83.64	12.90	3.46	0.17	1.29	4.21	86.50	9.37	4.13
Sh2	01-12-05.	12	0.16	0.32	0.72	50.00	27.78	22.22	0.15	0.37	0.58	58.76	14.73	26.51
Sh2	01-12-05.	6	0.23	2.00	9.00	88.50	8.94	2.56	0.22	2.34	7.29	90.51	6.44	3.05
Sh2	01-12-05.	9	0.19	1.65	6.33	88.48	8.51	3.00	0.18	1.93	5.13	90.50	5.92	3.58
Sh2	02-04-03.	2	0.27	1.53	5.00	82.35	12.25	5.40	0.26	1.79	4.05	85.44	8.11	6.44
Sh2	02-05-16.	6*	0.19	1.26	4.40	84.92	10.76	4.32	0.18	1.48	3.56	87.56	7.29	5.15
Sh2	02-05-23.	3*	0.18	1.50	6.40	88.00	9.19	2.81	0.17	1.76	5.18	90.10	6.54	3.36
Sh2	02-12-18.	2	0.17	0.82	4.83	79.27	17.21	3.52	0.16	0.96	3.91	82.90	12.90	4.20
Sh7	01-11-13.	1	0.16	0.86	2.00	81.40	10.60	8.00	0.15	1.01	1.62	84.65	5.80	9.54
Sh7	01-11-13.	7	0.17	0.90	8.60	81.11	16.91	1.98	0.16	1.05	6.96	84.42	13.22	2.36
Sh7	02-05-28.	2	0.21	1.62	9.00	87.05	10.62	2.33	0.20	1.90	7.29	89.31	7.90	2.78
Sh7	02-05-29.	3	0.23	1.10	7.72	79.09	17.93	2.98	0.22	1.29	6.25	82.75	13.69	3.55
Sh7	02-05-29.	4	0.16	1.20	7.78	86.67	11.28	2.06	0.15	1.41	6.30	89.00	8.54	2.45
Sh7	02-10-15.	4*	0.16	1.20	7.30	86.67	11.14	2.19	0.15	1.41	5.91	89.00	8.38	2.61
Sh7	02-10-23.	5*	0.14	1.40	4.00	90.00	6.50	3.50	0.14	1.64	3.24	91.75	4.07	4.18
Sh7	02-12-10.	2	0.17	1.22	6.02	86.07	11.11	2.82	0.16	1.43	4.88	88.51	8.13	3.37
Sh7	02-12-10.	4	0.22	0.80	4.00	72.50	22.00	5.50	0.21	0.94	3.24	77.32	16.12	6.56

* Dados utilizados nos Protocolos de ‘Participação Relativa’ e ‘Resposta ao $[Ca]_o$ ’

Nota: os valores de ‘ α ’ usados na correção dos $t_{1/2}$ foram:

α_{Tw}	α_{CafNT}	α_{Caf00}
0.9661	1.1712	0.8098

5) EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS – RESPOSTA À VARIAÇÃO DA $[Ca^{+2}]_o$

Grupo	ID Rato	ID Cel	Lo (µm)	Largura (µm)	$[Ca]_o$ (mM)	Lattw (ms)	ttptw (s)	Tw (% Lo)	$t_{1/2Tw}$ (s)	TwNoc1	Wave (n)	Pptw (% Lo)	Pptwperc (% Tw mesma $[Ca]_o$)	Caf00 (% Lo)	Caf00Noc1
Coa2	02-05-24.	1	90	30	0.5	50	0.46	0.84	0.32	15.14	3	20.22	2307.14	33.33	60.98
Coa2	02-05-24.	1	90	30	1	76	0.32	5.55	0.25	100.00	0	16.88	204.14	54.66	100.00
Coa2	02-05-24.	1	90	30	2	60	0.35	13.33	0.24	240.18	26	12.88	-3.38	56.00	102.45
Coa2	02-09-04.	2	90	25	0.5		0.28	1.77	0.28	56.91	2	12.44	602.82	25.33	99.14
Coa2	02-09-04.	2	90	25	1	48	0.33	3.11	0.14	100.00	0	21.77	600.00	25.55	100.00
Coa2	02-09-04.	2	90	25	2	84	0.28	5.00	0.21	160.77	3	12.22	144.40	25.55	100.00
Coa2	02-09-25.	2	120	15	0.5	50	0.43	2.00	0.31	60.06	3	3.00	50.00	18.33	73.32
Coa2	02-09-25.	2	120	15	1	70	0.46	3.33	0.33	100.00	1	19.66	490.39	25.00	100.00
Coa2	02-09-25.	2	120	15	2	70	0.49	5.00	0.26	150.15	15	19.20	284.00	27.33	109.32
Coa2	02-09-25.	7	105	25	0.5	60	0.40	6.10	0.30	54.32	6	8.00	31.15	35.04	87.60
Coa2	02-09-25.	7	105	25	1	80	0.41	11.23	0.28	100.00	5	16.00	42.48	40.00	100.00
Coa2	02-09-25.	7	105	25	2	70	0.40	8.70	0.29	77.47	30	4.60	-47.13	40.00	100.00
Coa2	02-12-05.	1	90	20	0.5	36	0.28	2.11	0.19	19.18	0	2.22	5.21	7.11	22.85
Coa2	02-12-05.	1	90	20	1	56	0.27	11.00	0.22	100.00	12	15.11	37.36	31.11	100.00
Coa2	02-12-05.	1	90	20	2	52	0.28	11.44	0.18	104.00	1	19.55	70.89	17.77	57.12
Coa2	02-12-05.	2	50	17	0.5	68	0.30	9.60	0.16	72.73	0	15.60	62.50	27.20	85.00
Coa2	02-12-05.	2	50	17	1	44	0.32	13.20	0.18	100.00	0	20.80	57.58	32.00	100.00
Coa2	02-12-05.	2	50	17	2	73	0.29	13.60	0.17	103.03	0	23.20	70.59	43.20	135.00
Coa2	03-01-08.	1	120	20	0.5	68	0.23	5.33	0.20	42.64	0	11.33	112.57	19.00	65.52
Coa2	03-01-08.	1	120	20	1	56	0.28	12.50	0.16	100.00	0	18.33	46.64	29.00	100.00
Coa2	03-01-08.	1	120	20	2	64	0.28	9.00	0.22	72.00	4	16.33	81.44	28.66	98.83
Coa2	03-02-06.	3	90	25	0.5	70	0.23	8.88	0.20	66.62	0	15.11	70.16	20.44	103.23
Coa2	03-02-06.	3	90	25	1	60	0.24	13.33	0.18	100.00	8	12.44	-6.68	19.80	100.00
Coa2	03-02-06.	3	90	25	2		0.28	16.88	0.19	126.63	14	15.55	-7.88	22.22	112.22
Coa2	03-02-06.	5	80	30	0.5	76	0.29	7.00	0.20	64.22	2	14.00	100.00	37.50	85.71
Coa2	03-02-06.	5	80	30	1	66	0.33	10.90	0.20	100.00	5	16.00	46.79	43.75	100.00
Coa2	03-02-06.	5	80	30	2	52	0.30	10.00	0.21	91.74	8	10.75	7.50	42.00	96.00
Coa2	03-02-06.	6	92	25	0.5	60	0.40	1.84	0.34	32.28	0	6.90	275.00	21.73	78.11
Coa2	03-02-06.	6	92	25	1	54	0.41	5.70	0.28	100.00	5	14.34	151.58	27.82	100.00
Coa2	03-02-06.	6	92	25	2	48	0.34	9.13	0.29	160.18	18	9.34	2.30	30.43	109.38
Coa2	03-02-06.	7	95	25	0.5	84	0.24	7.68	0.20	69.50	4	10.10	31.51	23.15	115.75
Coa2	03-02-06.	7	95	25	1	56	0.28	11.05	0.25	100.00	7	9.26	-16.20	20.00	100.00
Coa2	03-02-06.	7	95	25	2	64	0.26	11.78	0.19	106.61	20	19.00	61.29	33.68	168.40

Coa7	02-08-27.	3	105		0.5	80	0.27	4.90	0.16	62.82	0	7.61	55.31	13.71	87.83
Coa7	02-08-27.	3	105	28	1	96	0.29	7.80	0.21	100.00	2	10.28	31.79	15.61	100.00
Coa7	02-08-27.	3	105		2	68	0.20	7.60	0.20	97.44	2	10.28	35.26	10.28	65.86
Coa7	02-08-27.	6	100		0.5	72	0.19	4.30	0.17	28.29	3	16.40	281.40	19.40	127.63
Coa7	02-08-27.	6	100	29	1	52	0.24	15.20	0.19	100.00	3	21.60	42.11	15.20	100.00
Coa7	02-08-27.	6	100		2	44	0.26	14.40	0.16	94.74	13	15.20	5.56	33.60	221.05
Coa7	02-08-27.	8	70		0.5		0.31	1.14	0.23	13.30	0	8.00	601.75	8.85	38.25
Coa7	02-08-27.	8	70	28	1	58	0.29	8.57	0.21	100.00	13	4.57	-46.67	23.14	100.00
Coa7	02-08-27.	8	70		2	68	0.26	7.42	0.23	86.58	5	10.57	42.45	17.14	74.07
Coa7	02-08-27.	9	70		0.5		0.54	3.42	0.44	38.64	0	6.00	75.44	12.28	79.64
Coa7	02-08-27.	9	70	30	1	60	0.41	8.85	0.34	100.00	0	14.57	64.63	15.42	100.00
Coa7	02-08-27.	9	70		2	60	0.43	9.71	0.28	109.72	5	7.57	-22.04	17.71	114.85
Coa7	02-10-29.	1	105	35	0.5	52	0.28	2.85	0.27	21.38	1	16.19	468.07	31.61	125.74
Coa7	02-10-29.	1	105	35	1	56	0.32	13.33	0.21	100.00	0	18.66	39.99	25.14	100.00
Coa7	02-10-29.	1	105	35	2	56	0.27	15.81	0.17	118.60	7	17.14	8.41	32.00	127.29
Coa7	02-10-29.	2	105		0.5	48	0.42	5.04	0.31	55.14	6	12.57	149.40	29.33	113.24
Coa7	02-10-29.	2	105	30	1	74	0.38	9.14	0.32	100.00	8	14.47	58.32	25.90	100.00
Coa7	02-10-29.	2	105		2	72	0.32	11.42	0.26	124.95	23	14.09	23.38	25.52	98.53
Coa7	02-10-29.	5	120	25	0.5	72	0.31	3.25	0.19	25.67	0	21.00	546.15	15.33	71.87
Coa7	02-10-29.	5	120	25	1	56	0.24	12.66	0.19	100.00	4	18.33	44.79	21.33	100.00
Coa7	02-10-29.	5	120	25	2	56	0.25	14.66	0.15	115.80	5	19.66	34.11	20.33	95.31
Coa7	02-10-29.	6	85	40	0.5	42	0.25	2.58	0.17	44.79	0	11.05	328.29	15.52	101.50
Coa7	02-10-29.	6	85	40	1	60	0.26	5.76	0.17	100.00	1	11.76	104.17	15.29	100.00
Coa7	02-10-29.	6	85	40	2	66	0.30	10.35	0.25	179.69	5	10.35	0.00	14.11	92.28
Coa7	03-01-16.	4	80	20	0.5	52	0.33	6.50	0.31	68.42	6	11.75	80.77	19.75	59.85
Coa7	03-01-16.	4	80	20	1	60	0.39	9.50	0.23	100.00	7	12.75	34.21	33.00	100.00
Coa7	03-01-16.	4	80	20	2	60	0.30	10.50	0.24	110.53	20			33.00	100.00
Coa7	03-01-23.	2	105	20	0.5	38	0.17	1.71	0.16	39.04	0	19.61	1046.78	31.61	73.51
Coa7	03-01-23.	2	105	30	1	50	0.18	4.38	0.15	100.00	0	25.14	473.97	43.00	100.00
Coa7	03-01-23.	2	105	20	2	48	0.26	17.52	0.12	400.00	5	22.47	28.25	48.00	111.63
Coa7	03-01-23.	3a	115	20	0.5	44	0.26	1.47	0.25	45.51	5	4.86	230.61	10.43	65.19
Coa7	03-01-23.	3a	115	25	1	40	0.26	3.23	0.22	100.00	5	8.88	174.92	16.00	100.00
Coa7	03-01-23.	3a	115	20	2	52	0.31	6.60	0.21	204.33	13	6.08	-7.88	13.04	81.50
Coa7	03-01-23.	4	115	20	0.5	50	0.22	7.80	0.16	60.65	0	12.86	64.87	20.00	95.88
Coa7	03-01-23.	4	115	25	1	62	0.27	12.86	0.23	100.00	10	12.86	0.00	20.86	100.00
Coa7	03-01-23.	4	115	20	2	52	0.26	13.56	0.21	105.44	17	12.86	-5.16	29.56	141.71
Sh2	02-05-23.	3 *	110	25	0.5	64	0.26	8.00	0.15	125.79	5	12.20	52.50	29.54	118.16
Sh2	02-05-23.	3 *	110	25	1	60	0.31	6.36	0.18	100.00	9	14.90	134.28	25.00	100.00

Sh2	02-05-23.	3 *	110	25	2	72	0.26	9.63	0.15	151.42	10	12.54	30.22	30.18	120.72
Sh2	02-10-16.	2	135	28	0.5	48	0.30	2.81	0.17	34.52	0	13.33	374.38	25.18	80.19
Sh2	02-10-16.	2	135	28	1	50	0.23	8.14	0.15	100.00	0	21.92	169.29	31.40	100.00
Sh2	02-10-16.	2	135	28	2	50	0.30	19.85	0.24	243.86	1	21.33	7.46	44.00	140.13
Sh2	02-10-16.	4 *	70	28	0.5	68	0.22	12.57	0.16	66.68	0	24.00	90.93	40.57	85.55
Sh2	02-10-16.	4 *	70	28	1	72	0.28	18.85	0.19	100.00	0	18.28	-3.02	47.42	100.00
Sh2	02-10-16.	4 *	70	28	2	44	0.24	25.71	0.18	136.39	11	22.28	-13.34	59.42	125.31
Sh2	02-10-16.	5	80	28	0.5	68	0.25	4.12	0.19	47.09	0	9.00	118.45	10.00	62.50
Sh2	02-10-16.	5	80	28	1	56	0.27	8.75	0.21	100.00	4	8.75	0.00	16.00	100.00
Sh2	02-10-16.	5	80	28	2	80	0.23	7.00	0.20	80.00	1	9.00	28.57	18.75	117.19
Sh2	02-10-30.	1	110	35	0.5	80	0.26	2.09	0.13	52.25	0	10.90	421.53	46.36	105.36
Sh2	02-10-30.	1	110	35	1	68	0.26	4.00	0.21	100.00	0	17.81	345.25	44.00	100.00
Sh2	02-10-30.	1	110	35	2	51	0.26	12.90	0.13	322.50	4	21.81	69.07	49.09	111.57
Sh2	02-10-30.	3	120	35	0.5	72	0.26	3.16	0.16	59.29	0	15.88	402.53	19.66	93.62
Sh2	02-10-30.	3	120	35	1	64	0.27	5.33	0.17	100.00	1	10.50	97.00	21.00	100.00
Sh2	02-10-30.	3	120	35	2	48	0.26	12.66	0.17	237.52	6	17.33	36.89	23.00	109.52
Sh2	02-12-18.	1	85	18	0.5	48	0.24	2.94	0.22	31.25	0	21.20	620.80	25.41	93.94
Sh2	02-12-18.	1	85	18	1	58	0.27	9.41	0.15	100.00	0	19.29	105.00	27.05	100.00
Sh2	02-12-18.	1	85	18	2	62	0.26	17.65	0.15	187.50	0	24.94	41.33	32.94	121.77
Sh2	02-12-18.	3	100	20	0.5	68	0.22	4.60	0.16	41.82	0	22.00	378.26	22.00	101.85
Sh2	02-12-18.	3	100	20	1	60	0.25	11.00	0.13	100.00	0	19.60	78.18	21.60	100.00
Sh2	02-12-18.	3	100	20	2	56	0.26	18.00	0.14	163.64	0	25.60	42.22	21.20	98.15
Sh2	03-01-29.	1	80	30	0.5	76	0.32	14.75	0.16	80.82	0	23.00	55.93	31.50	96.18
Sh2	03-01-29.	1	80	30	1	60	0.30	18.25	0.14	100.00	0	21.50	17.81	32.75	100.00
Sh2	03-01-29.	1	80	30	2	48	0.33	22.00	0.14	120.55	0	25.00	13.64	35.00	106.87
Sh2	03-01-29.	4	100	20	0.5	64	0.19	7.00	0.15	83.33	0	18.00	157.14	16.40	65.60
Sh2	03-01-29.	4	100	20	1	94	0.18	8.40	0.13	100.00	0	18.80	123.81	25.00	100.00
Sh2	03-01-29.	4	100	20	2	36	0.24	10.40	0.18	123.81	4	10.00	-3.85	18.20	72.80
Sh2	03-01-29.	5	80	20	0.5	58	0.16	3.25	0.12	86.67	0	9.00	176.92	10.00	58.82
Sh2	03-01-29.	5	80	20	1	64	0.19	3.75	0.15	100.00	0	7.50	100.00	17.00	100.00
Sh2	03-01-29.	5	80	20	2	52	0.16	7.00	0.13	186.67	4	9.00	28.57	14.50	85.29
Sh7	02-05-28.	2	85	25	0.5	92	0.33	3.76	0.20	25.79	6	8.00	112.77	31.52	88.14
Sh7	02-05-28.	2	85	25	1	72	0.33	14.58	0.20	100.00	10	22.12	51.71	35.76	100.00
Sh7	02-05-28.	2	85	25	2	52	0.30	13.64	0.19	93.55	20			61.64	172.37
Sh7	02-05-29.	3a	105	23	0.5	80	0.29	3.61	0.19	33.86	0	10.67	195.57	20.95	81.49
Sh7	02-05-29.	3a	105	23	1	96	0.38	10.66	0.21	100.00	0	12.19	14.35	25.71	100.00
Sh7	02-05-29.	3a	105	23	2	68	0.35	12.76	0.19	119.70	0	15.62	22.41	28.95	112.60
Sh7	02-05-29.	4	105	23	0.5	96	0.26	3.43	0.21	54.62	0	22.28	549.56	17.40	53.74

Sh7	02-05-29.	4	105	23	1	58	0.30	6.28	0.16	100.00	0	27.43	336.78	32.38	100.00
Sh7	02-05-29.	4	105	23	2	68	0.34	21.33	0.21	339.65	5	22.47	5.34	27.80	85.86
Sh7	02-08-16.	2	110	24	0.5	76	0.29	2.90	0.20	46.93	0	17.27	495.52	22.72	105.04
Sh7	02-08-16.	2	110	24	1	76	0.24	6.18	0.16	100.00	1	18.18	194.17	21.63	100.00
Sh7	02-08-16.	2	110	24	2	68	0.27	8.18	0.15	132.36	5	10.54	28.85	23.63	109.25
Sh7	02-09-20.	5	110	20	0.5	60	0.22	3.09	0.17	24.29	0	11.63	276.38	27.63	104.82
Sh7	02-09-20.	5	110	20	1	64	0.24	12.72	0.16	100.00	0	28.00	120.13	26.36	100.00
Sh7	02-09-20.	5	110	20	2	48	0.25	20.36	0.15	160.06	2	29.45	44.65	30.54	115.86
Sh7	02-09-20.	6	90	30	0.5	100	0.32	5.88	0.25	50.91	1	16.00	172.11	19.33	63.50
Sh7	02-09-20.	6	90	30	1	100	0.30	11.55	0.21	100.00	2	16.00	38.53	30.44	100.00
Sh7	02-09-20.	6	90	30	2	88	0.34	12.66	0.21	109.61	1	19.33	52.69	39.55	129.93
Sh7	02-09-20.	7	100	20	0.5	80	0.13	2.80	0.13	42.42	0	12.60	350.00	32.00	100.63
Sh7	02-09-20.	7	100	20	1	64	0.22	6.60	0.13	100.00	0	20.60	212.12	31.80	100.00
Sh7	02-09-20.	7	100	20	2	72	0.24	12.00	0.17	181.82	4	17.20	43.33	36.00	113.21
Sh7	02-10-15.	3	115		0.5	86	0.36	3.47	0.29	55.43	0	6.95	100.29	21.04	85.22
Sh7	02-10-15.	3	115		1	60	0.37	6.26	0.28	100.00	1	5.91	-5.59	24.69	100.00
Sh7	02-10-15.	3	115		2	60	0.46	4.34	0.40	69.33	7	5.21	20.05	24.69	100.00
Sh7	02-10-15.	4 *	110		0.5	60	0.27	1.81	0.18	21.65	0	16.00	783.98	22.18	73.49
Sh7	02-10-15.	4 *	110		1	88	0.24	8.36	0.16	100.00	2	10.72	28.23	30.18	100.00
Sh7	02-10-15.	4 *	110		2	72	0.29	18.18	0.18	217.46	6	21.09	16.01	31.63	104.80
Sh7	02-10-15.	5	110		0.5	78	0.29	1.81	0.22	19.53	0	6.00	231.49	13.09	40.01
Sh7	02-10-15.	5	110		1	56	0.30	9.27	0.18	100.00	1	9.45	1.94	32.72	100.00
Sh7	02-10-15.	5	110		2	44	0.29	6.36	0.21	68.61	2	7.63	19.97	24.00	73.35
Sh7	02-10-23.	5 *	105	30	0.5	36	0.20	1.90	0.15	24.97	0	13.90	631.58	24.38	85.33
Sh7	02-10-23.	5 *	105	30	1	60	0.20	7.61	0.14	100.00	0	20.95	175.30	28.57	100.00
Sh7	02-10-23.	5 *	105	30	2	52	0.24	12.95	0.15	170.17	9	11.42	-11.81	25.90	90.65
Sh7	02-10-23.	6	100	18	0.5	68	0.22	5.60	0.15	65.12	0	15.60	178.57	21.60	79.41
Sh7	02-10-23.	6	100	18	1	60	0.23	8.60	0.14	100.00	1	15.40	79.07	27.20	100.00
Sh7	02-10-23.	6	100	18	2	58	0.24	10.80	0.15	125.58	0	15.20	40.74	30.00	110.29
Sh7	02-12-10.	2	90	30	0.5	72	0.29	5.11	0.18	50.00	7	9.11	78.28	22.88	88.79
Sh7	02-12-10.	2	90	30	1	52	0.32	10.22	0.17	100.00	0	13.55	32.58	25.77	100.00
Sh7	02-12-10.	2	90	30	2		0.34	13.33	0.19	130.43	11	12.88	-3.38	26.22	101.75
Sh7	03-01-30.	1	120	20	0.5	68	0.24	9.10	0.14	78.04	0	18.16	99.56	38.00	105.56
Sh7	03-01-30.	1	120	20	1	62	0.24	11.66	0.15	100.00	0	15.66	34.31	36.00	100.00
Sh7	03-01-30.	1	120	20	2	30	0.28	21.33	0.18	182.93	4	21.33	0.00	41.00	113.89

NOTAS:

* miócito usado também usado para outros protocolos experimentais.

- **[Ca]_o (mM):** Concentração de Ca²⁺ extracelular ([Ca²⁺]_o, mM).
- **L_o:** comprimento do miócito em repouso (em μm)
- **LatTw:** latência da resposta contrátil evocada por estimulação elétrica (Tw), período compreendido entre o início da estimulação e o início da resposta contrátil (expresso em 'ms').
- **t_{tp}Tw:** tempo para o pico do Tw, período compreendido entre o início da resposta contrátil e o pico da mesma (expresso em 's')
- **Tw (% L_o):** amplitude de contração evocada por estimulação elétrica, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **t_{1/2Tw} (s):** tempo para 50% de relaxamento a partir do pico da contração Tw (expresso em segundos).
- **TwNoc1 (% ΔLTw em resposta a [Ca²⁺]_o=1mM):** amplitude de contração evocada por estimulação elétrica, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **Wave (n):** frequência de contrações espontâneas durante pausa de um minuto (expressa pelo número de contrações neste período)
- **ppTw (% L_o):** Amplitude do Tw pós-pausa (expresso como percentual do comprimento do miócito em repouso, % L_o).
- **ppTWperc (% Tw_{mesma [Ca²⁺]_o}):** Amplitude do Tw pós-pausa, expresso como percentual da amplitude do Tw obtido na mesma [Ca²⁺]_o.
- **Caf00 (% L_o):** amplitude da contratura evocada por cafeína em Tyrode 0Na⁺/0Ca²⁺, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **Caf00Noc1 (% Caf00 em resposta a [Ca²⁺]_o=1mM):** amplitude da contratura evocada por cafeína em Tyrode 0Na⁺/0Ca²⁺, expressa como percentual do da contratura obtida na presença de [Ca²⁺]_o=1mM.
- As variáveis TwNoc1, Caf00Noc1 foram expressas respectivamente como percentual da resposta Tw ou Caf00 observada para [Ca]_o=1mM.

6) EXPERIMENTOS COM MIÓCITOS –

PERDA DE Ca^{+2} DURANTE A DIÁSTOLE

Grupo	ID Rato	ID Cel	Lo (μm)	Largura (μm)	Caf001 (% Lo)	Caf002 (% Lo)	Caf002/Caf001
Coa2	02-12-05.	1	90	20	31.11	8.00	25.72
Coa2	03-01-08.	1	120	20	29.00	14.66	50.55
Coa2	03-02-06.	1	110	20	39.00	19.54	50.10
Coa2	03-02-06.	2	90	20	17.80	9.11	51.18
Coa2	03-02-06.	3	90	25	19.80	10.44	52.73
Coa2	03-02-06.	5	80	30	43.75	23.00	52.57
Coa2	03-02-06.	6	92	25	27.82	13.26	47.66
Coa2	03-02-06.	7	95	25	20.00	10.52	52.60
Coa2	03-02-13.	2	98	15	31.02	22.44	72.34
Coa2	03-02-13.	3	110	30	37.09	27.27	73.52
Coa7	02-10-29.	6	85	40	13.17	7.76	58.92
Coa7	02-10-29.	7	85	40	12.00	10.11	84.25
Coa7	02-10-29.	8	90	30	37.77	24.44	64.71
Coa7	03-01-16.	2	90	30	28.44	20.00	70.32
Coa7	03-01-16.	4	80	20	33.00	12.00	36.36
Coa7	03-01-16.	5	110	30	34.50	23.60	68.41
Coa7	03-01-23.	2	105	30	43.00	27.04	62.88
Coa7	03-01-23.	3a	115	25	16.00	8.34	52.13
Coa7	03-01-23.	3b	115	25	20.86	14.43	69.18
Sh2	02-10-30.	1	110	35	45.45	29.09	64.00
Sh2	02-10-30.	3	110	35	27.63	25.45	92.11
Sh2	02-12-18.	1	85	18	27.06	27.76	102.61
Sh2	02-12-18.	2	105	30	19.05	22.86	120.00
Sh2	02-12-18.	3	100	20	21.60	18.00	83.33
Sh2	02-12-18.	5	90	30	24.89	15.11	60.71
Sh2	03-01-29.	1	80	30	32.75	27.25	83.21
Sh2	03-01-29.	3	90	25	34.66	25.77	74.35
Sh2	03-01-29.	4	100	20	25.00	15.00	60.00
Sh2	03-01-29.	5	80	20	17.00	8.75	51.47
Sh7	02-12-10.	2	90	30	25.77	13.77	53.43
Sh7	03-01-30.	1	120	20	36.00	25.33	70.36
Sh7	03-01-30.	2	90	30	42.66	33.33	78.13
Sh7	03-01-30.	3	100	20	21.60	18.00	83.33
Sh7	03-02-12.	2	120	20	25.33	21.15	83.50
Sh7	03-02-21.	5b	110	20	20.51	17.39	84.79
Sh7	03-02-21.	6	100	24	23.99	16.77	69.90
Sh7	03-02-21.	7	75	30	27.37	18.08	66.06

Notas:

- **L₀**: comprimento do miócito em repouso (em μm)
- **Caf001 (% L₀)**: amplitude da contratura evocada por cafeína em Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ após estabilização da célula em regime estacionário, expressa como percentual do comprimento de repouso.
- **Caf001 (% L₀)**: amplitude da contratura evocada por cafeína em Tyrode $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ após pausa estimulatória na presença de Tyrode 0Ca^{2+} , expressa como percentual do comprimento de repouso.