

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

Modelo experimental e instrumentação para estudo da função do retículo sarcoplasmático no transporte de Ca^{2+} no coração

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Diogo Coutinho Soriano
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Curso: Engenharia Elétrica
Área de concentração: Engenharia Biomédica

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Campinas
2007

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

So68m Soriano, Diogo Coutinho
Modelo experimental e instrumentação para estudo da
função do retículo sarcoplasmático no transporte de Ca^{2+} no
coração / Diogo Coutinho Soriano. --Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana
Almada Bassani

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Coração – Ventrículo esquerdo. 2. Microscopia de
fluorescência. 3. Engenharia - Instrumentos. 4. Cafeína. 5.
Retículo sarcoplasmico. 6. Modelos matemáticos. I.
Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana
Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Experimental model and instrumentation for the study of
sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport in the heart

Palavras-chave em Inglês: Cardiac myocyte, Fluorescence microscopy,
Instrumentation, Caffeine, Sarcoplasmic
reticulum, Mathematical model

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, Eduardo Tavares
Costa e Vera Lúcia da Silveira Nantes Button

Data da defesa: 20/06/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

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

Modelo experimental e instrumentação para estudo da função do retículo sarcoplasmático no transporte de Ca^{2+} no coração

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Diogo Coutinho Soriano
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
DEB, FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
DEPEB, UFSJ

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

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

Campinas
2007

“Todo o nosso saber começa nos sentimentos”

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho
às pessoas mais importantes
da minha vida: Nestor, Marly e Renata.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram com este trabalho:

Aos meus pais Nestor C. Soriano Jr. e Marly Zan Soriano, pelo apoio e incentivo.

À Renata de Souza Silva pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos Profs. José W.M. Bassani e Rosana A. Bassani pela orientação, ensinamentos e dedicação.

A todos que trabalham e contribuem para a manutenção do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, em especial, gostaria de agradecer ao excelente apoio técnico da bióloga Elizângela S. de Oliveira, do engenheiro Sérgio P. Moura, dos técnicos Eugênio C. Carrara, Mauro S. Martinazzo, Márcia A. Queiroz, Jean R. de Ávila. Agradeço também as secretárias Nirlei V. Souza, Adriana C. C. de Andrade e Marlene C. dos Santos.

Aos amigos e colegas de laboratório pela troca de experiências, sugestões e ajuda: Rafael de A. Ricardo, Pedro X. de Oliveira, Elisângela S. de Oliveira, Denile C. Boer, Nivaldo Zafalon Jr., Larissa B. Penna, Sérgio Barrak, Mariana Z. Vilela, Ana Carolina Silveira, Alexandra V. S. da Fonseca.

Aos cidadãos que indiretamente financiaram este trabalho de pesquisa por meio seus impostos.

A Deus por ter criado coisas tão maravilhosas.

Apoio

Este trabalho teve o apoio da Fapesp (Proc. nº 05/52601-1).

Resumo

No presente trabalho foi desenvolvido um instrumento capaz de quantificar de forma simultânea o encurtamento celular e a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), utilizando o indicador fluorescente fluo-3. A instrumentação foi aplicada para estudar o papel da ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA, principal transportador responsável pelo relaxamento celular e pela reposição do estoque de Ca^{2+} intracelular) na remoção de Ca^{2+} do citosol em miócitos cardíacos isolados de rato, o que exigiu o desenvolvimento de um protocolo experimental específico. O protocolo experimental desenvolvido consistiu em tornar inoperante o principal competidor da SERCA pelo Ca^{2+} citosólico, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), pela perfusão da célula com solução sem Ca^{2+} e sem Na^+ . Nesta situação, considera-se que os demais transportadores de Ca^{2+} (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial de Ca^{2+}) transportem o íon a uma taxa baixa demais para competir com a SERCA. A liberação do Ca^{2+} do RS foi induzida por pulsos rápidos de cafeína, e foram medidos a amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) e tempo para 50 % de queda ($t_{1/2}$) dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na ausência e na presença de fármacos que afetam a taxa de captação de Ca^{2+} pela SERCA. Foram analisados os efeitos do agonista de receptores beta-adrenérgicos isoproterenol (ISO), que promove estimulação da SERCA, e de 2,5-di-(*tert*-butil) hidroquinona (tBQ), que atua como inibidor da enzima. ISO causou redução significativa do $t_{1/2}$ de queda do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p < 0,01$), sem alteração significativa de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p > 0,05$). Já no caso do tBQ, foi observado um aumento significativo do $t_{1/2}$ de queda do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p < 0,01$) e redução da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, ($p < 0,05$). Um modelo teórico da literatura foi adaptado para descrever matematicamente o modelo experimental proposto. As simulações com alterações nos parâmetros cinéticos da SERCA pelos fármacos (de acordo com dados da literatura) foram razoavelmente bem sucedidas em reproduzir os dados experimentais com relação ao tempo de remoção do Ca^{2+} do citosol. Portanto, foi apresentada aqui uma nova ferramenta experimental e teórica para estudar a captação de Ca^{2+} pela SERCA em miócitos cardíacos intactos.

Abstract

The goal of this work was to develop an instrument for simultaneous measurement of cell shortening and cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), by using the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-3. The instrument was applied to study the uptake of cytosolic Ca^{2+} by the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (SERCA, the main transporter responsible for cell relaxation in intact isolated rat ventricular myocytes). For this purpose, the development of a specific experimental protocol was required. In this protocol, the main competitor of SERCA by cytosolic Ca^{2+} , the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX), was disabled by removal of extracellular Ca^{2+} and Na^+ . In this situation, it may be assumed that the other Ca^{2+} transporters (sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase and mitochondrial Ca^{2+} uniporter) are too slow to compete with SERCA. SR Ca^{2+} release was induced by short, rapid caffeine pulses, and the amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) and time for 50% $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline ($t_{1/2}$) of the resulting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients were measured in the absence and in the presence of drugs that affect the rate of SR Ca^{2+} uptake by SERCA, namely the beta-adrenergic receptor agonist isoproterenol (ISO), which causes increase in SERCA activity, and 2,5-di-(*tert*-butyl) hydroquinone (tBQ), which inhibits the enzyme. ISO caused significant reduction of $t_{1/2}$ ($p < 0,01$), without any significant change in $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p > 0,05$). In case of tBQ, significant increase of $t_{1/2}$ ($p < 0,01$) and reduction of $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p < 0,05$) were observed. A theoretical model (Tang & Othmer, 1994) was adapted for mathematical description of the experimental model proposed. Simulation of the effects of the drugs, in which SERCA kinetic parameters were changed according to data obtained from literature, were reasonably successful at reproducing the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kinetics observed experimentally.

Lista de Abreviaturas

- $[Ca^{2+}]_d$ – concentração citosólica de Ca^{2+} diastólica
 $[Ca^{2+}]_i$ – concentração citosólica de Ca^{2+}
 $\Delta[Ca^{2+}]_i$ – amplitude do transiente de Ca^{2+}
 $[Ca^{2+}]_{RS}$ – carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
Caf – cafeína
CCD – *charge coupled device*
CCR – comprimento celular em repouso
CEB – Centro de Engenharia Biomédica
DBV – detector de borda de sinal de vídeo
 I_{ca} – corrente de entrada de Ca^{2+} por canais de Ca^{2+} tipo L
ISO – isoproterenol
 K_m – concentração de Ca^{2+} na qual a velocidade de captação é metade da máxima
 ΔL – amplitude da contração celular
LED – *light emitting diode*
NCX – troca Na^+/Ca^{2+}
PA – potencial de ação
PKA – proteína quinase A
PLB – fosfolambam
PMT – tubo fotomultiplicador
RS – retículo sarcoplasmático
RyR – receptor de rianodina
SERCA – ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
SL – sarcolema
tBQ - 2,5-di-(*tert*-butil)-1,4-hidroquinona
 $t_{1/2} [Ca^{2+}]_i$ – tempo necessário para que o transiente de Ca^{2+} decline até metade do seu valor de pico
 $t_{1/2} \Delta L$ – tempo necessário para que a célula relaxe o equivalente à metade do valor da amplitude da contração
TnI – troponina I
 Δt_s – tempo de subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

VCR – aparelho gravador de vídeo cassete

Vmax – velocidade máxima de captação

Sumário

1. Introdução	01
2. Objetivos	10
3. Materiais e Métodos	11
3.1 – Animais	11
3.2 – Soluções	11
3.3 – Isolamento dos miócitos cardíacos ventriculares	12
3.4 – Projeto de instrumentação para medição de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular	13
3.5 – Estratégia para ajustes no projeto de microscopia/microfluorimetria	19
3.6 – Equipamentos auxiliares, bancada de trabalho e aquisição dos dados	21
3.7 – Testes do protótipo de microscopia/microfluorimetria construído	24
3.8 – Preparação da câmara de perfusão de cardiomiócitos	25
3.9 – Carregamento dos cardiomiócitos com o indicador fluorescente e conversão do sinal de fluorescência pra $[Ca^{2+}]_i$	26
3.10 – Troca rápida de soluções	27
3.11 – Modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA: protocolo experimental e testes	28
3.12 – Efeitos de agentes que causam estimulação e inibição da SERCA	30
3.13 – Análise estatística dos dados	30
3.14 – Simulações computacionais aplicadas ao modelo experimental	31
4. Resultados	38
4.1 – Montagem preliminar	38
4.2 – Protótipo do sistema de microscopia/microfluorimetria	39
4.3 – Testes do sistema de microscopia/microfluorimetria	41
4.4 – Medição simultânea de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular	44
4.5 – Implementação do modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pelo RS	45

4.5.1 – Instrumentação para aplicação de pulsos rápidos de cafeína	45
4.5.2 – Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e contrações evocadas por pulsos rápidos de cafeína	45
4.5.3 – Estimativa da carga de Ca^{2+} do RS após a aplicação de pulsos rápidos de cafeína	49
4.6 – Efeito da estimulação beta-adrenérgica e da inibição da SERCA com tBQ sobre transientes evocados por estimulação elétrica	51
4.7 – Efeito do ISO e do tBQ sobre transientes e contrações evocados por pulsos curtos de cafeína	57
4.8 – Simulações computacionais	60
5. Discussão	70
5.1 – Instrumentação	70
5.2 – Experimentos com células e modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA	73
5.2.1 – Protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA	73
5.2.2. – Efeitos do ISO e tBQ sobre transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e contrações evocadas por estimulação elétrica	74
5.2.3 – Aplicação do protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA e simulações computacionais	76
6. Conclusões	83
7. Referências bibliográficas	84
Apêndice A – Introdução à fluorescência	95
Apêndice B – Fotômetro e estimativa da potência radiante de excitação	105
Apêndice C – Circuito oscilador para acionamento de válvula solenóide	109

1. Introdução

De acordo com a *American Heart Association* (AHA, www.americanheart.edu), doenças cardiovasculares acometem 1 em cada 3 americanos, e representaram a *causa mortis* primária (i.e., mortalidade registrada total) em cerca de 36,6% dos óbitos no ano 2004 nos E.U.A. Além disso, 32% das mortes causadas por doenças cardiovasculares ocorreram prematuramente (i.e., em idade abaixo da expectativa de vida média da população). É alarmante lembrar que as doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos durante os últimos 100 anos nos países desenvolvidos, e as previsões são de que a ocorrência de eventos ligados a estas doenças tenda a se elevar no futuro. Infelizmente, embora existam outras patologias que chegam a competir com as doenças cardiovasculares em países menos desenvolvidos (como o Brasil), não há razão para acreditar que a nossa realidade seja diferente neste aspecto. Este quadro é justificado, sobretudo, pela condição precária de vida, *stress* e a falta de cuidado com a alimentação, ou seja, problemas que estão longe de uma tendência de melhora. Neste contexto, os dados apresentados acima apontam para a necessidade de se estudar cada vez mais o funcionamento do coração normal, para que se possa entender melhor as causas e o impacto das doenças cardiovasculares, e assim contribuir para sua prevenção e terapia.

O íon Ca^{2+} desempenha um importante papel na sinalização e regulação da função de diversos tipos celulares. Ca^{2+} é importante nos processos de divisão celular, secreção e liberação de neurotransmissores, regulação dos processos de transcrição genética, proliferação celular e apoptose (morte celular programada) (Berridge *et al.*, 2000).

Especialmente no músculo cardíaco, Ca^{2+} é fundamental desde a geração e modulação da atividade elétrica (potencial de ação, PA) até a regulação e controle do processo de contração (Bers, 2001; Bers, 2002). A despolarização da membrana da célula miocárdica (denominada sarcolema) durante o PA ativa o influxo e conseqüente liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), principal estoque do íon para a contração no coração de mamíferos. A liberação de Ca^{2+} do RS é induzida pela ligação de Ca^{2+} aos canais de liberação denominados receptores de rianodina (RyRs), segundo o mecanismo descrito por Fabiato (1983). O aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), (Figura 1.1) permite a difusão deste íon e sua ligação à troponina C, diparando o processo de contração celular e geração de força, explicada pela teoria dos filamentos

deslizantes (Huxley, 1969). Portanto, em condições fisiológicas, a ativação elétrica (excitação) atua como o gatilho para a contração, e o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ é o fator que acopla os dois fenômenos. O conjunto desses processos é chamado acoplamento excitação-contração.

Para que a célula cardíaca relaxe, vários transportadores de Ca^{2+} competem pela remoção do Ca^{2+} citosólico (Bassani *et al.*, 1992): a) ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), que capta o íon de volta para o interior da organela (MacLennan *et al.*, 1997); b) trocador sódio-cálcio (NCX), que promove a extrusão do íon (Blaustein & Lederer, 1999); c) uniporter de Ca^{2+} mitocondrial, que medeia o fluxo do íon para dentro das mitocôndrias (Zhou *et al.*, 1998), e d) ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (SL-ATPase), que também promove extrusão de Ca^{2+} (Guerini *et al.*, 1998). A participação relativa destes transportadores é dependente da espécie (Bassani *et al.*, 1994a,b), da fase de desenvolvimento pós-natal (Bassani & Bassani, 2002) e pode estar alterada em certas condições fisiopatológicas (Pogwizd *et al.*, 1999).

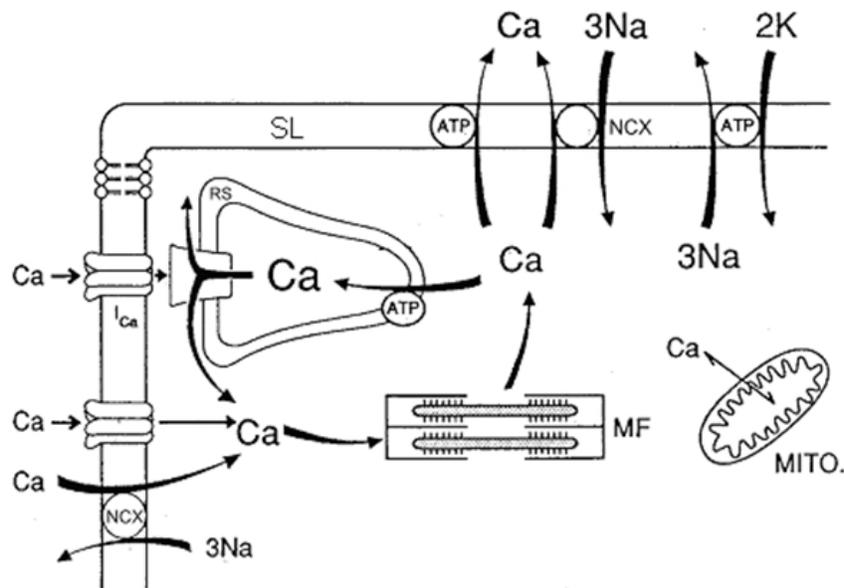


Figura 1.1: Principais mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco de mamíferos. SL – sarcolema; RS - retículo sarcoplasmático; Mito - mitocôndria; NCX - mecanismo de troca sódio-cálcio; ATP - ATPase de Ca; I_{Ca} - corrente de Ca por meio de canais tipo L; MF – miofilamentos. Bers, 2001.

Os mecanismos de transporte de Ca^{2+} no coração vêm sendo intensamente estudados em células cardíacas isoladas com o uso de técnicas de medição de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por meio de indicadores fluorescentes (McCormack & Cobbold, 1991; Gomes *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999). Existem diversos tipos desses indicadores, com intensa utilização daqueles que são acoplados a moléculas lipossolúveis, entram passivamente na célula por difusão, e, após remoção da porção lipossolúvel, são convertidos numa forma impermeante, que fica confinada ao citoplasma. Neste estado, o indicador é então capaz de emitir luz de forma dependente da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, quando excitado com comprimento de onda adequado. A fluorescência emitida pela célula é normalmente coletada por meio de tubos fotomultiplicadores (Art, 1995), e posteriormente o sinal de saída dos fotodetectores é convertido para $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Deste modo, são medidos os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, importantes para o estudo da mobilização celular de Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1992, 1993; 1994a). Uma breve introdução aos conceitos de fluorescência e utilização desses indicadores pode ser encontrada no apêndice A.

Uma ferramenta útil para estudar o transporte de Ca^{2+} em células cardíacas é a cafeína. Este composto é um alcalóide que entra rapidamente na célula (O'Neill *et al.*, 1990a) e aumenta a sensibilidade dos canais de Ca^{2+} do RS ao Ca^{2+} , causando liberação deste íon mesmo no nível basal de Ca^{2+} (100-200 nM) no citosol de uma célula em repouso (Rousseau & Meissner, 1989; O'Neill *et al.*, 1990b; Sitsapesan & Williams, 1990). Quando a concentração de cafeína atinge aproximadamente 1-2 mM dentro da célula, o processo de liberação massiva de Ca^{2+} do RS é disparado (O'Neill *et al.*, 1990a). Devido a esta propriedade, a aplicação prolongada de cafeína (superior a 6 s) vem sendo sistematicamente utilizada para avaliar a carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) sob diversas condições, e, assim, desvendar complexos mecanismos de controle do processo contrátil (Bassani *et al.*, 1993, 1995; Bassani & Bers, 1994, 1995; Bassani *et al.*, 2002; Shannon *et al.*, 2002; Eisner *et al.*, 2004, Díaz *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Vennetucci *et al.*, 2007).

No presente trabalho, um instrumento para a medição simultânea de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (utilizando o indicador fluorescente fluo-3, cujas características são mostradas no apêndice A) e encurtamento celular foi projetado e construído. O equipamento desenvolvido foi aplicado para desenvolver um protocolo para estudo da função da SERCA na remoção do Ca^{2+} citosólico, baseado num modelo experimental, proposto e também desenvolvido no presente trabalho (apresentado na Figura 1.2), que simplifica o transporte de Ca^{2+} . Este modelo experimental consiste em tornar inoperante o NCX, o

principal competidor da SERCA pelo $[Ca^{2+}]_i$. Esta situação pode ser implementada por meio da retirada do Ca^{2+} e do Na^+ do meio extracelular, o que abole a força eletromotriz para extrusão de Ca^{2+} pelo NCX. Além disso, a membrana foi mantida em repouso elétrico, ou seja, na ausência de estímulos elétricos, e a liberação de Ca^{2+} do RS foi induzida por meio de pulsos rápidos de cafeína.

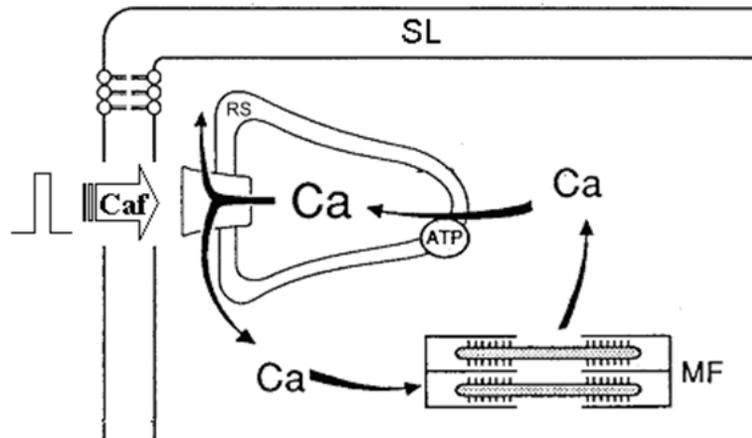


Figura 1.2: Modelo simplificado para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA decorrente do protocolo experimental proposto. Caf – cafeína; SL – sarcolema; RS – retículo sarcoplasmático; MF – miofilamentos; ATP – ATPase de Ca^{2+} do RS. Modificado de Bers, 2001.

Neste modelo experimental, o RS opera liberando e captando Ca^{2+} de forma cíclica em resposta à cafeína, o que simplifica o diagrama da Figura 1.1 para o apresentado na Figura 1.2, se considerado que os sistemas lentos (SL-ATPase e uniporter mitocondrial) não sejam capazes de competir com a SERCA. Isto implica em sistema praticamente conservativo para o Ca^{2+} intracelular, uma vez que a extrusão de Ca^{2+} da célula seria virtualmente nula. Esta aproximação pode ser justificada pelo fato da SERCA ser responsável por 92% do transporte total de Ca^{2+} durante o relaxamento em miócitos isolados de rato, enquanto o NCX (inoperante no protocolo aqui proposto) e os demais transportadores considerados lentos são responsáveis por 7 e 1 %, respectivamente (Bassani *et al.*, 1994a; Bassani & Bassani, 2002, 2003).

A abordagem utilizada assume também que todo o Ca^{2+} do *pool* citosólico encontra-se disponível para os miofilamentos, o que reduz o sistema ao RS, que libera e capta Ca^{2+} a cada pulso de cafeína, e aos miofilamentos, que entram em contato com o íon e são ativados para o desenvolvimento de contração (Figura 1.3). A possibilidade de

utilização de pulsos rápidos de cafeína (de duração inferiores a 100 ms) para evocar episódios de liberação e captação de Ca^{2+} pela SERCA já foi demonstrada anteriormente (Su *et al.*, 2003), mas sem a indução de um ciclo de liberação e recaptação que se repete ao longo do tempo, o que pode ser conveniente para medições mais precisas e mais próximas do real funcionamento desta enzima. Com este modelo experimental, pode-se então medir o tempo de remoção deste Ca^{2+} do citosol sob diferentes situações, como por exemplo, sob ação de fármacos ou após modificações genéticas que alterem o funcionamento da SERCA. Esta ferramenta pode contribuir com informações relevantes sobre o principal transportador relacionado à fase de relaxamento da atividade mecânica, e de fundamental importância na reposição do estoque de Ca^{2+} na célula cardíaca (MacLennan *et al.*, 1997; Bers, 2001). Entender o funcionamento desta ATPase e desenvolver métodos para a análise quantitativa da sua função em células intactas é algo de significativa importância para o estudo do acoplamento excitação-contração.

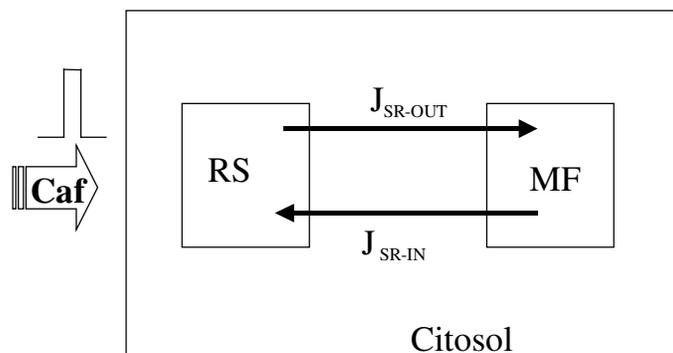


Figura 1.3: Esquema geral do modelo experimental desenvolvido no presente trabalho. RS: retículo sarcoplasmático; MF: miofilamentos. $J_{\text{SR-out}}$ e $J_{\text{SR-in}}$ são os fluxos de Ca^{2+} a partir do RS para o citosol (liberação) e do citosol para o RS (captação), respectivamente. A liberação é disparada por pulsos rápidos de cafeína de curta duração.

O método aqui desenvolvido foi aplicado para analisar os efeitos de fármacos que modificam a atividade da SERCA sobre a cinética de remoção de Ca^{2+} citosólico pela enzima. Foram estudadas as seguintes condições:

a) estimulação da SERCA por ativação de receptores beta-adrenérgicos: os adrenoceptores beta estão associados a uma via bioquímica complexa (Figura 1.4) que é ativada *in vivo* pela ligação de noradrenalina e adrenalina. A ocupação do receptor pelo agonista ativa uma proteína ligante de GTP (trifosfato de guanosina) também localizada no

sarcolema. A ligação deste nucleotídeo à proteína leva à dissociação de uma de suas subunidades, a α , que interage de modo estimulatório com a enzima adenilato ciclase (AC), que por sua vez converte ATP (trifosfato de adenosina) em cAMP (monofosfato cíclico de 3'-5'-adenosina). O cAMP, ligando-se à quinase de proteínas dependente de cAMP (PKA), leva à dissociação de suas subunidades catalíticas e regulatórias (Brodde & Michel, 1999; Bers, 2001). A subunidade catalítica da PKA fosforila diversas proteínas, sendo as mais relevantes neste estudo: a) canais de Ca^{2+} dependentes de tensão elétrica do sarcolema (McDonald *et al.*, 1994); b) fosfolamban (um inibidor endógeno da SERCA), (Simmerman & Jones, 1998; MacLennan & Kranias, 2003); c) troponina-I (uma das proteínas do filamento fino envolvida no processo de contração), (Li *et al.*, 2000). O resultado deste processo de fosforilação é a alteração do transporte de Ca^{2+} intracelular, com reflexo direto sobre a atividade contrátil. As principais conseqüências da estimulação beta-adrenérgica em nível celular são o aumento da força de contração (efeito inotrópico positivo) e o aumento da taxa de relaxamento (efeito lusitrópico positivo). Deve-se enfatizar aqui que o fosfolamban exerce um papel fundamental no acoplamento excitação-contração. Luo *et al.*, (1994) e Li *et al.*, (2000), mostraram que ratos geneticamente modificados que não expressavam o fosfolamban tiveram ambos os efeitos inotrópico e lusitrópico significativamente atenuados após a aplicação do agonista de receptores beta-adrenérgico isoproterenol (ISO), o que pode sugerir uma maior participação do peptídeo no enchimento do RS e na sua regulação. Estes resultados justificam o interesse e a importância de se estudar a estimulação beta-adrenérgica à luz do protocolo experimental proposto.

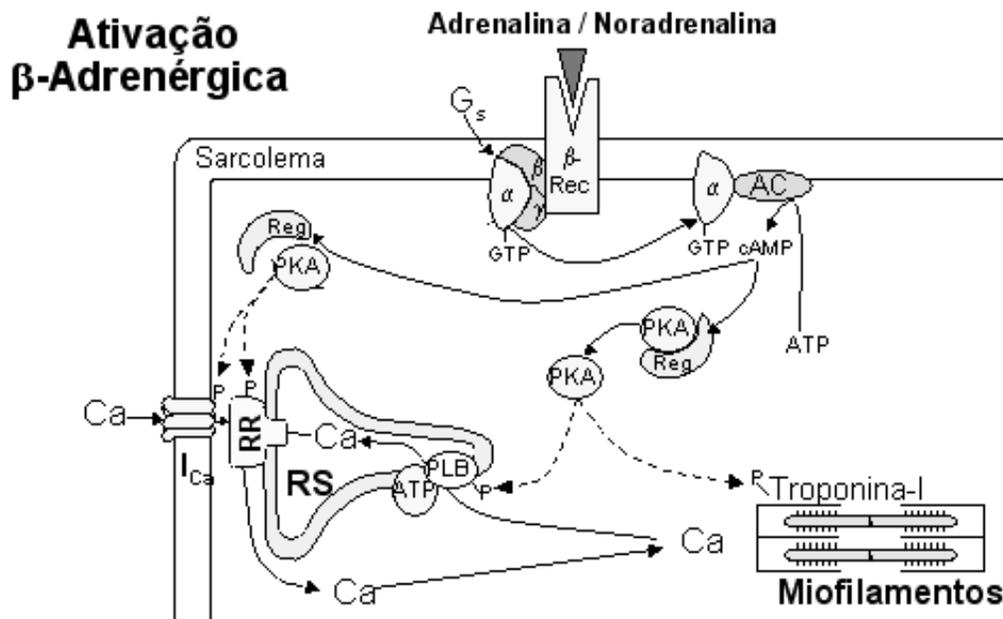


Figura 1.4: Via de transdução bioquímica acoplada a receptores beta-adrenérgicos: β -Rec – receptor beta-adrenérgico; G_s (proteína ligante de GTP); AC – adenilato ciclase; Reg – subunidade regulatória da proteína quinase dependente de cAMP (PKA); P representa o grupo fosfato transferido pela PKA a diversas proteínas intracelulares; PLB – fosfolamban; RR – receptores de rianodina (responsáveis pela liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol). As demais estruturas são as mesmas apontadas na Figura 1.1. Modificado de Bers, 2001.

b) Inibição da SERCA pela 2,5-di-(*tert*-butil)-1,4-hidroquinona (tBQ): este fármaco foi inicialmente identificado como um inibidor SERCA em células do fígado (Moore *et al.*, 1987), e posteriormente, também em músculo esquelético de coelho (Wictome *et al.*, 1992) sem efeito sobre as ATPases do sarcolema ou mitocondriais (Moore *et al.*, 1987). A reação de transporte do Ca^{2+} pela SERCA começa com a ligação de dois íons Ca^{2+} e uma molécula de ATP a sítios de alta afinidade no lado citoplasmático do transportador (estado E1, Figura 1.5), (MacLennan *et al.*, 1992). A hidrólise do ATP e fosforilação da enzima promovem uma alteração conformacional que oclui a ATPase, não permitindo o retorno dos íons Ca^{2+} para o citoplasma (estado E1P, Figura 1.5; Clarke *et al.*, 1989a,b). Alterações conformacionais subsequentes reduzem a afinidade por Ca^{2+} , o que resulta na rápida liberação dos íons Ca^{2+} no interior do RS, onde a concentração de Ca^{2+} é maior (estado E2, Figura 1.5; Reddy *et al.*, 1996). Dois prótons são transportados do RS para o citosol após desfosforilação da enzima e seu retorno ao estado E1. Nakamura *et al.*

(1992) mostraram em vesículas isoladas de RS do ventrículo de cão que o tBQ inibe a decomposição do estado E1P, e portanto, mantém o transportador no seu estado ocluído, o que conseqüentemente diminui a taxa de transporte de Ca^{2+} . Assim, espera-se que esta redução na taxa de transporte manifeste-se como um maior tempo para remoção do Ca^{2+} no citosol, o que no caso, pode ser passível de detecção com o método aqui desenvolvido.

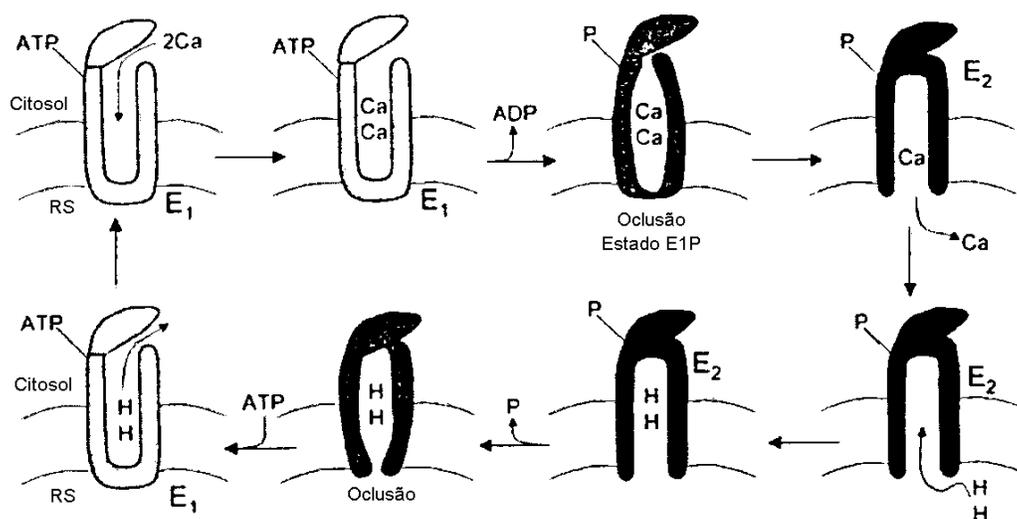


Figura 1.5: Mecanismo de transporte de Ca^{2+} pela SERCA. Detalhes estão descritos no texto. Modificado de Bers (2001).

Além da proposta de desenvolvimento de instrumentação e aplicação experimental, este trabalho também visa apresentar uma descrição matemática simples para simular o protocolo experimental proposto. Atualmente existem diversos modelos teóricos para células cardíacas que retratam o transporte iônico através do sarcolema e no meio intracelular (Puglisi *et al.*, 2004), sobretudo no que se refere ao transporte de Ca^{2+} e seu papel no mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (Luo & Rudy, 1994; Zahradníková & Zahradník, 1996; Keizer & Levine, 1996; Stern *et al.*, 1999; Jafri *et al.*, 1998; Shannon *et al.*, 2004; Cortassa *et al.*, 2006). Os referidos modelos conseguem reproduzir uma grande variedade de resultados experimentais com excelente fidelidade, mas apresentam a desvantagem de serem complexos e custosos do ponto de vista

computacional. A fim de estudar do ponto de vista teórico a dinâmica do transporte de Ca^{2+} , buscou-se na literatura um modelo teórico com a melhor capacidade de adaptação à situação experimental aqui abordada, e com o menor custo computacional possível. Assim, o modelo matemático de Tang & Othmer (1994) foi utilizado, mediante adaptações para retratar o modelo experimental proposto, incluindo o efeito da cafeína sobre o transporte de Ca^{2+} intracelular. As alterações na SERCA promovidas pelos fármacos também foram simuladas, de acordo com resultados da literatura quanto às modificações dos parâmetros cinéticos da enzima, dentro das limitações impostas pela estabilidade do modelo teórico.

Finalmente, o presente trabalho apresenta um conjunto de simulações computacionais para auxiliar o estudo da dinâmica do transporte de Ca^{2+} , segundo o modelo experimental proposto. Embora o modelo desenvolvido para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA represente uma abordagem reducionista, pequenas modificações em determinados parâmetros cinéticos desta ATPase (como resultado da aplicação de drogas ou alterações genéticas) podem ter conseqüências longe de serem óbvias, dada a natureza não-linear do sistema. Assim, a ferramenta computacional torna-se uma estratégia conveniente para melhor entendimento e enriquecimento na discussão dos fenômenos experimentais observados.

2. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- a) Desenvolvimento de instrumentação específica para medição e registro simultâneo da $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular em miócitos isolados;
- b) Desenvolvimento de um protocolo experimental e instrumentação para estudar o transporte de Ca^{2+} entre citosol e RS.
- c) Adaptação de um modelo matemático para o transporte de Ca^{2+} no caso do protocolo experimental proposto, e utilizá-lo para simular alterações nos parâmetros cinéticos da SERCA promovidas pela estimulação beta-adrenérgica e pelo tBQ.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (5-7 meses de idade), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) e mantidos no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB), UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, receberam água e ração à vontade e foram expostos a um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os animais não receberam qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados, exceto para procedimentos de limpeza das gaiolas. O procedimento experimental foi aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal, IB/UNICAMP (protocolos número 775-1 e 952-1).

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada, com exceção das soluções utilizadas no isolamento dos cardiomiócitos, que foram preparadas com água ultrafiltrada (tipo I, resistividade > 18 MΩ.cm). O pH de todas as soluções foi 7,4, na temperatura em que foram utilizadas. Na composição das soluções abaixo, a concentração dos solutos está expressa em mM.

a) Solução de Tyrode normal (TyN): NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 1,5; HEPES (ácido N-2 hidroxiethylpiperazina-N"-2 etano-sulfônico) 5; glicose 11; CaCl₂ 1.

b) Solução de Tyrode sem Ca²⁺ e Na⁺ (Ty00), Neste caso, foi feita substituição equimolar de Na⁺ e Ca²⁺ por LiCl e EGTA (ácido etileno glicol-bis (β-aminoetil eter)- N- N'-N' tetraacético), respectivamente.

c) Solução TyN ou Ty00 com cafeína (CafTyN ou Caf00, respectivamente): cafeína foi adicionada como um sólido à solução TyN ou Ty00, na concentração de 10 mM.

d) Solução de Tyrode para Isolamento de Células (TyCl): tem composição igual a TyN, exceto por ter CaCl₂ substituído por MgCl₂ e conter 10 mM HEPES.

e) Solução Krebs-Henseleit para Isolamento de Células: NaCl 115; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 2,4; glicose 11,1.

f) Solução cardioplégica (Cpl-P): KH₂PO₄ 10; KCl 30; MgCl₂ 1; taurina 20; glicose 11; HEPES 10; ácido glutâmico 70; pH 7,4 a 23° C ajustado com KOH (usada para dissociação e armazenamento das células).

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

h) Solução fluo-3 para incubação de miócitos (TyN-Fluo): 10 µl da solução estoque de fluo-3 foram adicionados a 10 µl de solução 2% (v/v em DMSO) de Pluronic (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e diluídos em 980 µl de TyN. Pluronic é um agente dispersante que facilita a difusão do fluo-3 para o interior da célula. A solução de 10 µM de fluo-3 foi novamente diluída em TyN para a concentração final de 1 µM, e esta foi a solução usada para o carregamento do miócito com o indicador.

3.3. Isolamento dos miócitos cardíacos ventriculares

As células foram isoladas por digestão enzimática conforme descrito anteriormente (Bassani e Bassani, 2002). Os ratos foram sacrificados por exsanguinação após concussão cerebral, com imediata retirada do coração. O coração foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit sem cálcio a 37 °C em um sistema de Langendorff por 5 minutos. Em seguida o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,5 mg/ml de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 15-20 minutos. A seguir, a enzima foi removida por perfusão com solução TyCl contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml) por cerca de 10 minutos. O tecido ventricular esquerdo foi então delicadamente triturado em solução cardioplégica, para dissociação das células. A mesma solução foi usada para lavagem e armazenamento das células.

3.4. Projeto de instrumentação para medição de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular.

O sistema de microscopia para projeção da imagem da célula e medição dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ pode ser dividido em 3 partes: óptica de excitação do indicador, óptica de emissão do indicador e óptica de projeção da imagem da célula. O sistema permite a medição não só de transientes de $[Ca^{2+}]_i$, como também do encurtamento celular. A Figura 3.1 ilustra a disposição dos componentes utilizados para a construção do equipamento.

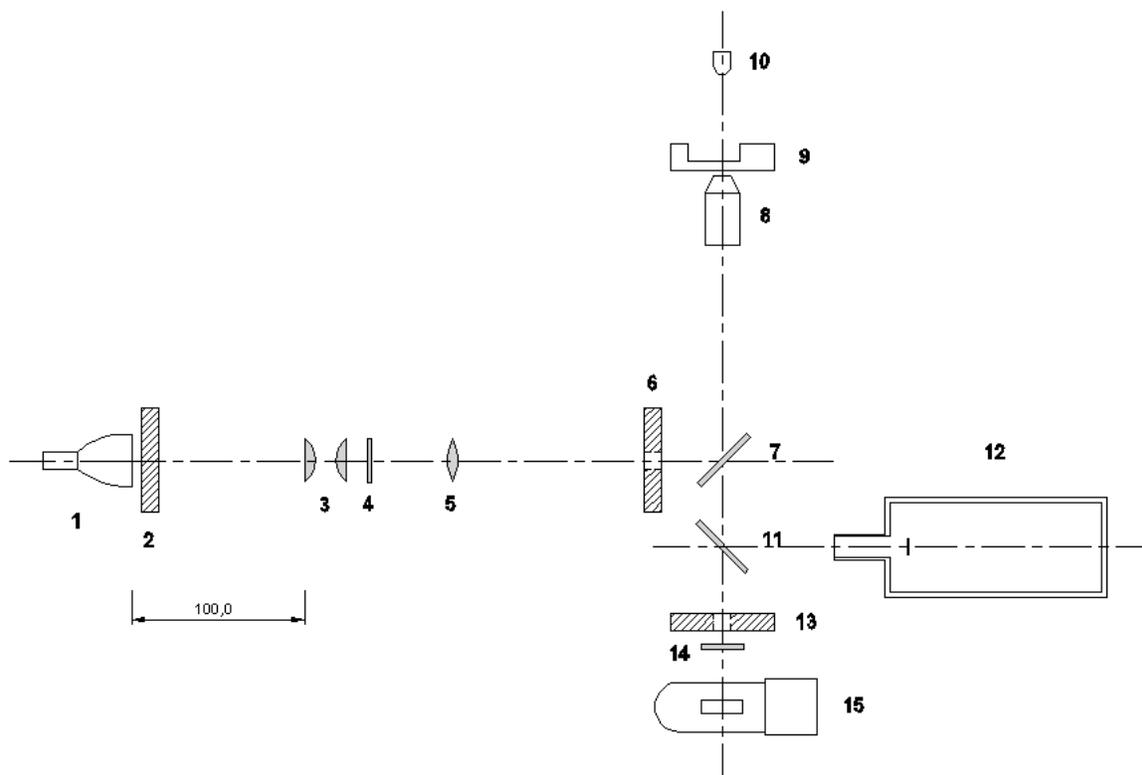


Figura 3.1: Sistema de microscopia de fluorescência para medição de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular. 1: LED (*Light Emmiting Diode*) azul de alta intensidade (excitação); 2: Obturador (*shutter*); 3: dupleto de lentes condensadoras; 4: filtro óptico passa-faixa de excitação; 5: lente biconvexa; 6: diafragma; 7: espelho dicróico; 8: objetiva (40x); 9: câmara de perfusão; 10: LED vermelho (iluminação do campo visual); 11: espelho refletor de vermelho; 12: câmara CCD (*charge coupled device*); 13: obturador com fenda retangular; 14: filtro óptico passa-faixa de emissão; 15: tubo fotomultiplicador (*PMT*).

A óptica de excitação compreende todos os dispositivos responsáveis pela excitação do indicador fluorescente. As distâncias entre dispositivos estabelecidas para essa parte da instrumentação são fornecidas com mais detalhes na Figura 3.2.

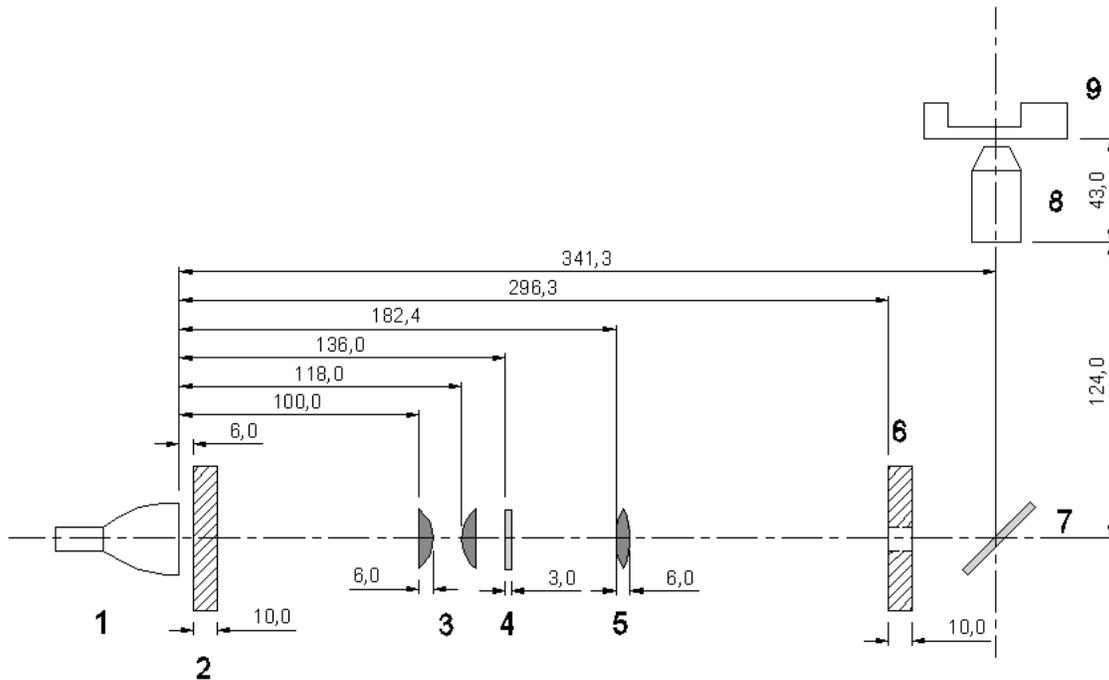


Figura 3.2: Detalhes da óptica de excitação. As cotas são dadas em mm. Os elementos do sistema estão indicados como na Figura 3.1.

A fonte luminosa utilizada para fornecer energia radiante ao indicador foi um *LED* azul de alta intensidade (OT16–5100–BL, Opto Technology, Wheeling, IL, EUA). O obturador (mecânico de acionamento manual) é uma placa opaca que permite bloqueio do feixe de excitação, o que minimiza o desbotamento (*bleaching*) do indicador (Song *et al.*, 1995). O condensador é formado por duas lentes plano-convexas com distância focal de 35 mm e diâmetro de 25 mm (Optovac, Osasco, SP), para maximizar a luz coletada. A imagem se forma a uma distância s' da última lente com uma magnificação M_1 , segundo as relações (Jekins & White, 1985):

$$s' = \frac{[d \cdot (s - f) - s \cdot f] \cdot f}{(d - f) \cdot (s - f) - s \cdot f} \quad (3.1)$$

$$M_1 = \frac{f^2}{(d-f) \cdot (s-f) - s \cdot f} \quad (3.2)$$

onde d é a distância entre as lentes (12 mm), f é a distância focal (35 mm), e s é a distância da primeira lente à fonte (100 mm). Substituindo os respectivos valores nas equações 3.1 e 3.2, tem-se $s' = 19,06$ e $M_1 = -0,24$. O sinal negativo indica uma imagem invertida, o que é irrelevante para a iluminação da amostra. A imagem formada pelo condensador serve de objeto para que uma lente biconvexa ($f_2 = 35$ mm, diâmetro 25 mm, Optovac, Osasco, SP) projete esta energia radiante na amostra biológica situada na câmara de perfusão, obedecendo às seguintes relações (Jekins & White, 1985):

$$s'_2 = \frac{s_2 \cdot f_2}{s_2 - f_2} \quad (3.3)$$

$$M_2 = \frac{f_2}{f_2 - s_2} \quad (3.4)$$

onde s'_2 é a distância da imagem à lente biconvexa, s_2 (fixado em 39,3 mm) é a distância da imagem formada pelo dubleto condensador à lente biconvexa, f_2 é a distância focal da lente, e M_2 é a magnificação da imagem produzida na amostra, sem considerar o efeito condensador produzido pela objetiva, conforme observado nos microscópios comerciais (Gomes, 1997). Substituindo os valores nas equações 3.3 e 3.4, tem-se $s'_2 = 319,9$ mm e $M_2 = -8,1$. Pequenos ajustes foram feitos experimentalmente para que a imagem do LED de excitação fosse desfocada, a fim de fornecer uma iluminação uniforme na amostra biológica. A magnificação total da óptica de excitação (M_T) é dada por:

$$M_T = M_1 \cdot M_2 = 1,9. \quad (3.5)$$

Os parâmetros s e s_2 , bem como a escolha das lentes foram estabelecidos segundo as equações 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, visando diminuir o espaço ocupado pelo equipamento, sempre respeitando as restrições dadas pelas expressões. Estes parâmetros serviram como ponto de partida para que ajustes empíricos pudessem determinar a disposição final dos dispositivos.

O filtro óptico passa-faixa de excitação (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, EUA) seleciona apenas a banda de interesse para a excitação do indicador (460–500 nm, Figura 3.3A). O feixe luminoso tem seu diâmetro limitado por um diafragma (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), o que evita que feixes espúrios contribuam com ruído no sinal de saída do fotodetector. O espelho dicróico (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, EUA) reflete a banda de excitação (Figura 3.3A) e permite a passagem da banda de emissão (515 – 560 nm). Por fim, uma objetiva de 40X (Olympus, Melville, NY, EUA) funciona como o último condensador de energia radiante para a óptica de excitação.

A óptica de emissão (detalhada na Figura 3.4A) é o caminho óptico percorrido pelo sinal de fluorescência emitido pela célula. Neste caso, a objetiva serve como um condensador, coletando a fluorescência emitida. Os espelhos dicróico e refletor de vermelho (Edmund Optics, Barrington, NJ, EUA) funcionam como uma janela para a banda de emissão (Figura 3.3), enquanto o filtro óptico passa-faixa de emissão (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, EUA) garante que apenas comprimentos de onda nessa faixa sejam detectados (Figura 3.3A).

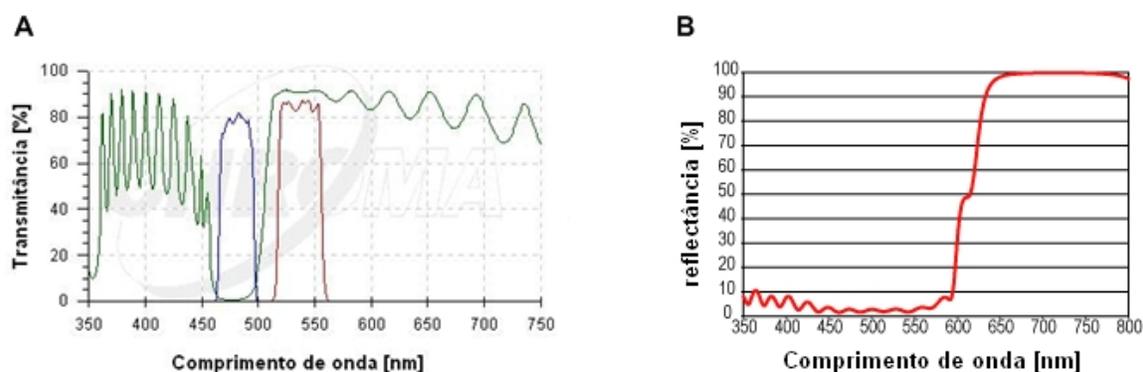


Figura 3.3: Características dos filtros e espelhos utilizados. O painel A mostra o espectro de transmitância para os filtros de excitação (azul), espelho dicróico (verde) e filtro de emissão (vermelho). Já o painel B mostra o espectro de refletância para o espelho refletor de vermelho.

O fotodetector utilizado foi o tubo fotomultiplicador (*PMT*) R4220 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão). O obturador possui uma fenda retangular com abertura regulável que possibilita ajustes para compatibilidade entre a imagem da câmera *CCD* (mod. ICD-31, Ikegami Co., Tóquio, Japão) e o sinal de fluorescência obtido. Um

conversor corrente-tensão permite que o *PMT* forneça um sinal de tensão proporcional à intensidade do sinal de fluorescência detectado.

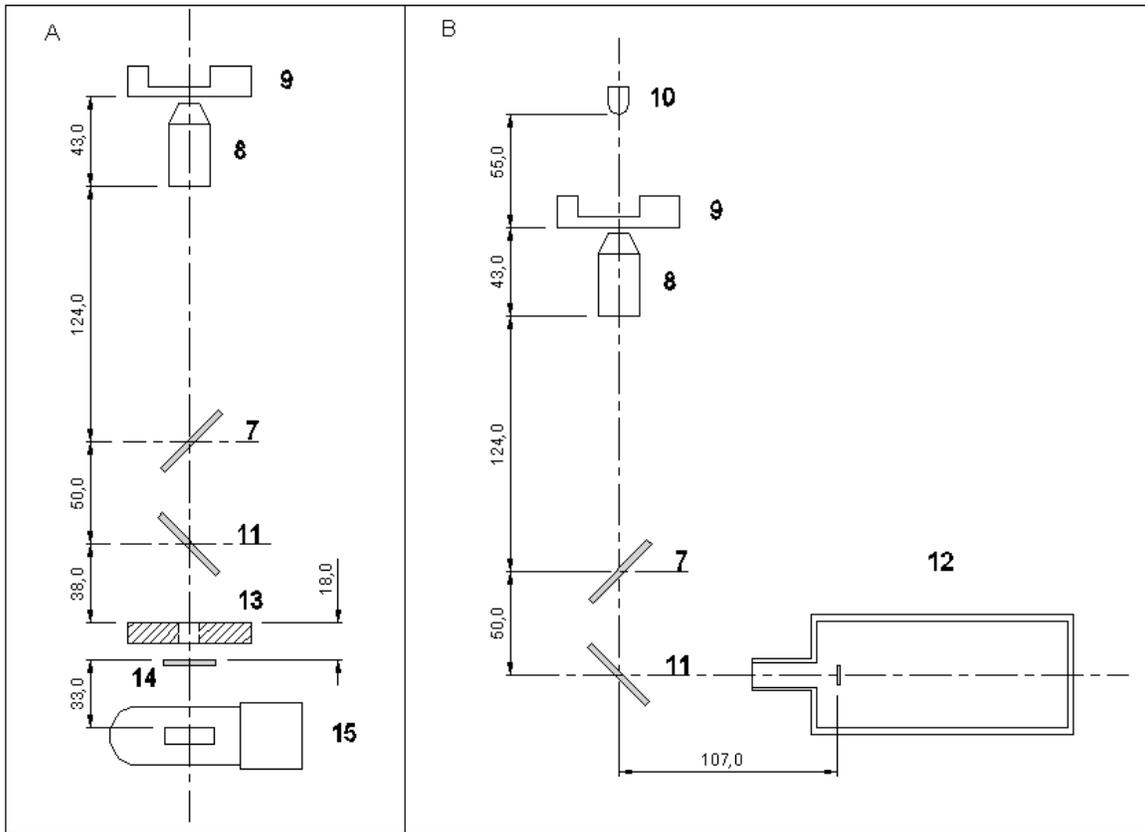


Figura 3.4: Detalhes do projeto de microscopia e microfluorimetria. O painel A mostra detalhes da óptica de emissão, enquanto o painel B mostra detalhes da óptica de projeção de imagem. As cotas são dadas em mm. Os elementos do sistema estão indicados como na Figura 3.1.

O *PMT* (Figura 3.5) consiste em um tubo com vácuo, onde um catodo emite elétrons por efeito fotoelétrico (Wilson & Hawkes, 1983), produzindo uma corrente de saída proporcional à intensidade luminosa que chega ao catodo.

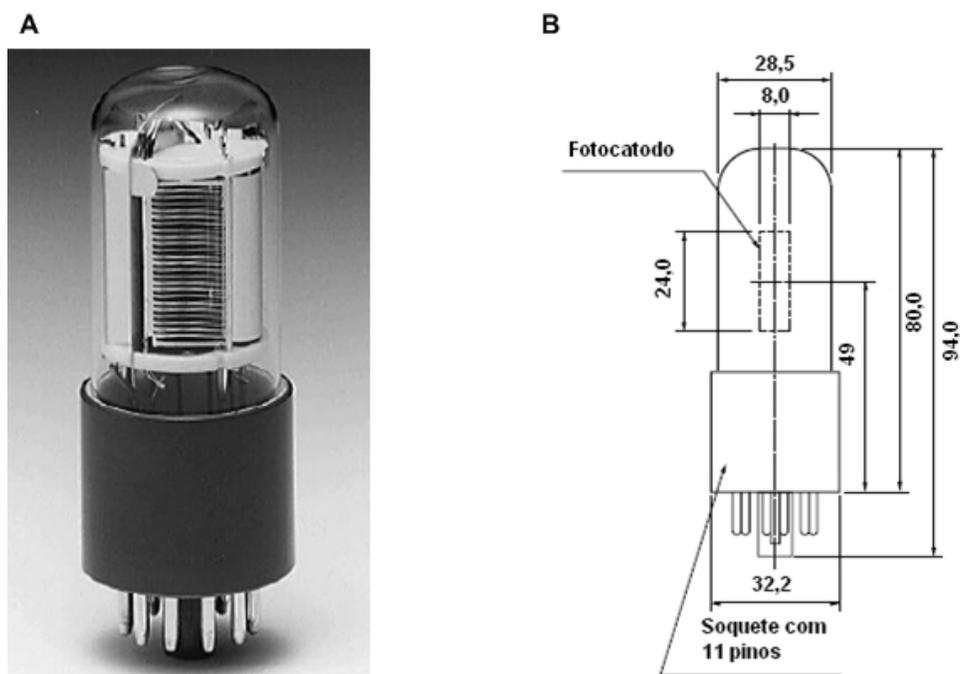


Figura 3.5: O painel A mostra uma foto do tubo fotomultiplicador. Uma vista frontal do *PMT* é mostrada no painel B (dimensões dadas em mm). Figura modificada do manual do fabricante Hamamatsu Photonics.

A principal característica do *PMT* é o alto ganho de corrente produzido por vários estágios de multiplicação de elétrons implementados pelos eletrodos internos (dinodos). A tensão de alimentação do *PMT* define o campo aplicado entre os dinodos, e portanto, o ganho de corrente. O circuito para acionamento e obtenção de sinal de saída em tensão do *PMT* foi implementado por Gomes (1997) e pode ser visualizado na Figura 3.6. A alimentação do *PMT* é feita por uma fonte de alta tensão (mod. C6260, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão) que pode atingir 1250 V. Esta fonte tem sua saída ajustada por meio do potenciômetro (POT 1), estabelecendo uma saída de 1000V. A tensão de alimentação da fonte do *PMT* é fornecida por meio de uma fonte externa de 15 V. A saída em corrente do *PMT* pode ser convertida para tensão por meio do conversor corrente-tensão. O circuito conversor corrente-tensão é dado pela configuração do amplificador operacional (LF 351) realimentado pelo resistor R1 (Horowitz & Hill, 1989).

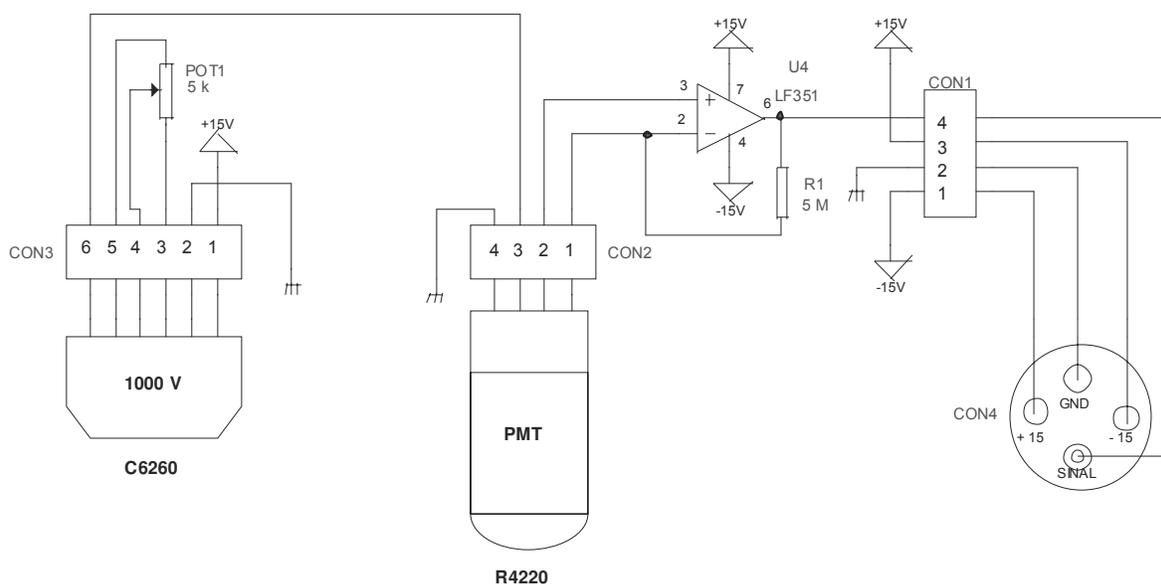


Figura 3.6: Eletrônica associada à detecção do sinal de fluorescência emitido pela célula. CON – conectores; PMT – tubo fotomultiplicador R4220; C6260 – fonte de alimentação do PMT; POT 1 – potenciômetro para ajuste da tensão de saída da fonte de alimentação do PMT; LF351 – amplificador operacional; R1 – resistor utilizado no conversor corrente-tensão; GND – terra. Modificado de Gomes (1997).

A óptica de projeção de imagem da célula (Figura 3.4B) é a parte do sistema de microscopia que permite a obtenção da imagem do miócito cardíaco, a partir da qual o encurtamento celular é quantificado. Um *LED* vermelho é utilizado para iluminar a amostra, cuja imagem é ampliada pela objetiva e projetada na câmera *CCD*. É importante observar que o espelho dicróico funciona como uma janela para o comprimento de onda vermelho (600 – 700 nm), enquanto o espelho refletor de vermelho é responsável pelo desvio de 90° da luz do *LED* até a câmera, onde a imagem da célula é obtida e mostrada em um monitor de vídeo.

3.5. Estratégia para ajustes no projeto microscopia/microfluorimetria.

Antes da implementação do protótipo do sistema de microscopia/microfluorimetria, uma montagem preliminar simulando a disposição dos dispositivos foi realizada para testar a viabilidade do projeto (Figura 3.7) e estabelecer uma estratégia para que todos os

ajustes necessários fossem implementados. Foram utilizados vários suportes mecânicos para os diversos elementos ópticos, e um estágio de microscopia em boas condições para conferir estabilidade e facilidade de manuseio à montagem. Os dispositivos ópticos foram dispostos de forma que a entrada de uma microesfera fluorescente (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, E.U.A.) no campo visual, quando devidamente excitada, produzisse um sinal de saída máximo no *PMT*, o que evidenciava o bom alinhamento do sistema.

A partir desta montagem foram observados o ruído produzido pelo acionamento das fontes luminosas, a melhora na relação sinal / ruído devida à filtragem do sinal e limitação da área sensível exposta do fotodetector, além da possibilidade de detecção simultânea da imagem do cardiomiócito e os respectivos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ durante estimulação elétrica. Todos estes testes foram importantes para a obtenção do projeto final do protótipo do sistema de microscopia/microfluorimetria.

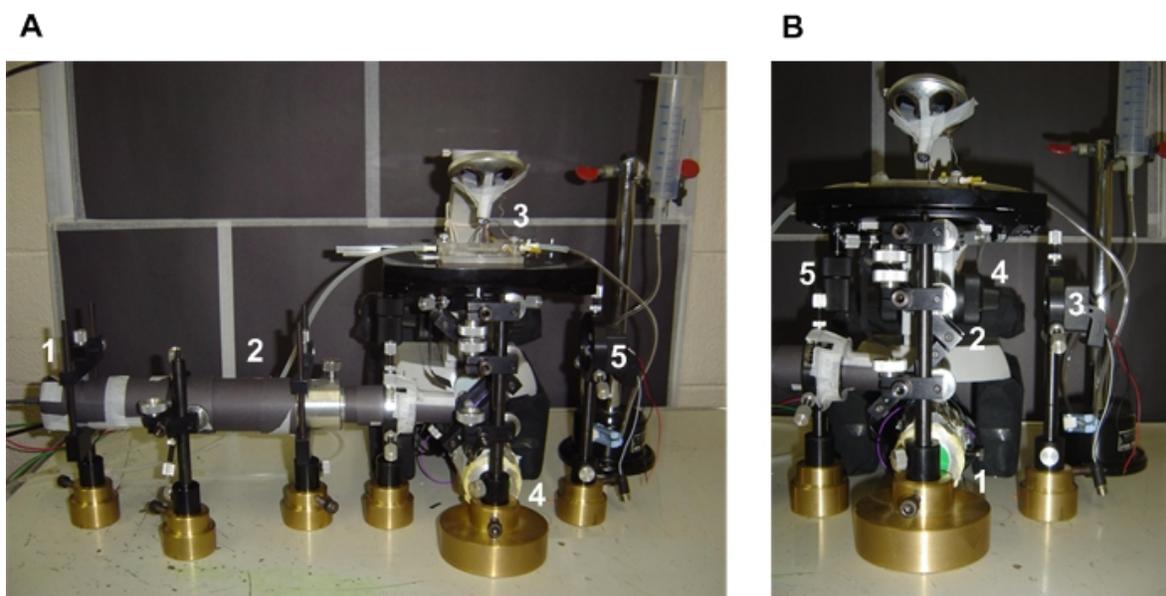


Figura 3.7: Montagem experimental preliminar para teste do projeto microscopia/microfluorimetria. O sistema completo é mostrado no painel A, onde: 1 – *LED* azul de alta intensidade, 2 – tubo de alumínio coberto com cartolina preta contendo lentes e filtro de excitação, 3 – *LED* vermelho de iluminação da célula, 4 – tubo de alumínio contendo o *PMT*, 5 – câmera *CCD*. O painel B mostra em detalhe a óptica de emissão e visualização, onde: 1 – tubo de alumínio contendo o *PMT*, 2 – suportes contendo os espelhos dicróico e refletor de vermelho, 3 – câmera *CCD*, 4 – manipulador para controle de foco da objetiva, 5 – manipulador para movimentação xy da câmara de perfusão no estágio de microscopia.

3.6 Equipamentos auxiliares, bancada de trabalho e aquisição dos dados.

O sinal de vídeo obtido pela câmera *CCD* segue para um gravador de vídeo cassete (*VCR*) para registro do experimento, e daí para um detector de borda de sinal de vídeo (*DBV*), acoplado a um monitor de vídeo, onde a célula pode ser visualizada. O *DBV* (construído pelo CEB, patente número: PI 0300.834 – 7) tem como função fornecer um sinal de tensão proporcional ao deslocamento de um ponto da borda da célula mostrada no monitor de vídeo, o que pode ser convertido para encurtamento celular após sua devida calibração por meio de uma graticula micrométrica espaçada de 10 μm (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). O sinal de tensão proporcional ao encurtamento celular proveniente do *DBV* foi adquirido por uma placa de aquisição PCI 6229 (National Instruments, Austin, TX, E.U.A), assim como o sinal de fluorescência proveniente do *PMT*. A aquisição destes sinais foi controlada pelo *software* LABVIEW 7.1[®] (National Instruments, Austin, TX, E.U.A), no qual uma interface gráfica amigável com aplicação específica para nosso experimento foi desenvolvida (Figura 3.8). Observa-se nesta interface a possibilidade de monitoramento simultâneo do sinal de tensão proporcional ao encurtamento celular (painel inferior à direita), do sinal de tensão proporcional ao $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (painel superior à esquerda) e a forma de onda após a conversão de fluorescência para $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (painel superior à direita), o que também pode ser observado em tempo real, segundo os parâmetros de calibração estabelecidos (à esquerda na parte inferior). O programa permite iniciar e encerrar a gravação quando desejado pelo usuário por meio da chave “grava”. O sistema de aquisição também permite a definição da frequência de amostragem e a implementação de vários tipos de filtros. Os sinais foram adquiridos a 100 Hz e filtrados por um filtro passa-baixa Butterworth com 8 pólos e frequência de corte em 25 Hz.

A Figura 3.9 mostra um diagrama em blocos para as conexões entre os equipamentos utilizados com o respectivo fluxo de informações, enquanto a Figura 3.10A mostra uma foto do *rack* com os equipamentos auxiliares utilizados nos experimentos desenvolvidos.



Figura 3.8: Interface gráfica desenvolvida em LABVIEW 7.1[®] para visualização e controle da aquisição dos sinais.

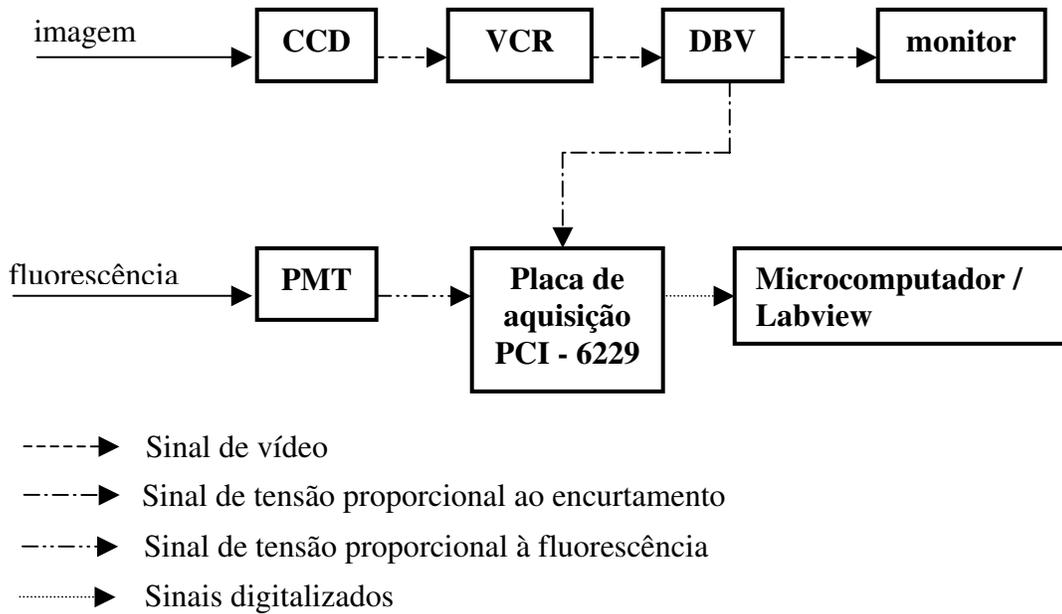


Figura 3.9: Diagrama em blocos para representar as ligações entre os diversos equipamentos utilizados.

Uma condição imprescindível para obtenção de registros de boa qualidade é a estabilidade mecânica do sistema de microscopia/microfluorimetria. Neste sentido, uma bancada de trabalho que minimizasse vibrações mecânicas foi construída para evitar interferências desta natureza no processo de medição. Devido ao elevado custo das mesas antivibratórias disponíveis, a solução adotada foi projetar e construir uma bancada em estrutura metálica robusta (114 cm de comprimento, 84 cm de largura e 90 cm de altura), com um tampo de granito (com 4 cm de espessura) isolado mecanicamente da estrutura por bolas de tênis, que atuam como amortecedores (Figura 3.10B). Esta solução produziu o resultado mecânico e financeiro desejado.

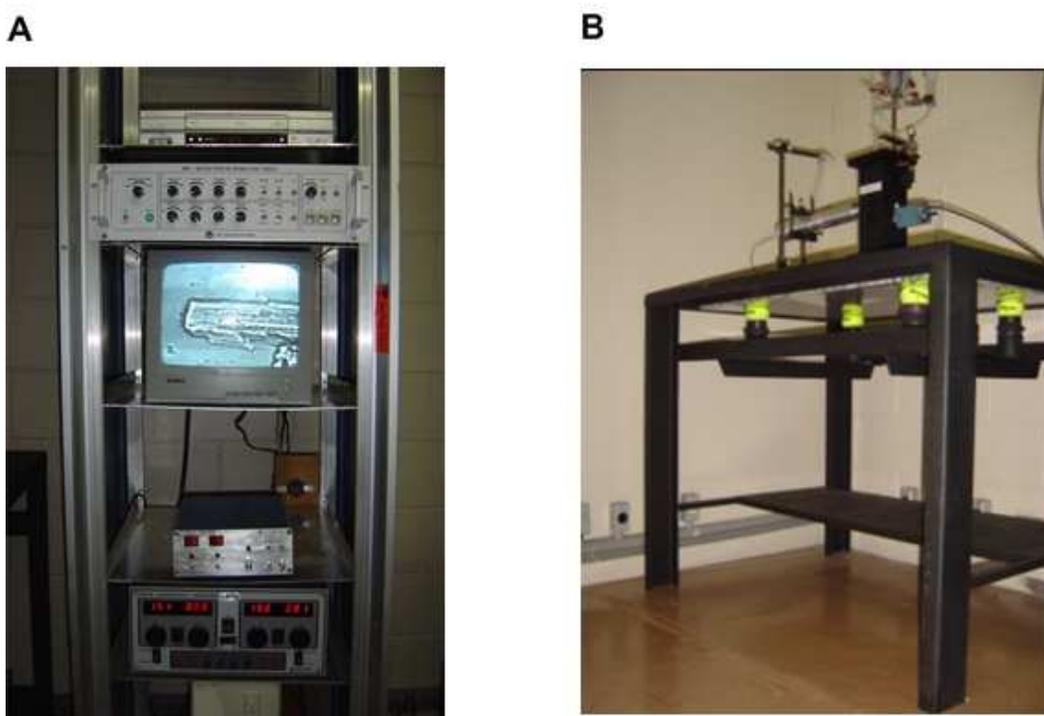


Figura 3.10: São mostrados no painel A os equipamentos utilizados nos experimentos, (de cima para baixo): *VCR*, *DBV*, monitor de vídeo, estimulador elétrico e fonte de tensão para alimentação da fonte do *PMT*. O painel B mostra a bancada antivibratória construída para conferir estabilidade à instrumentação desenvolvida.

A medição de fluorescência emitida pelo indicador requer um ambiente escuro, evitando a interferência da luz ambiente no sinal registrado. Assim, a área do laboratório ocupada pela bancada de trabalho, *rack* com equipamentos e microcomputador foi

delimitada por uma cortina opaca, que permite a criação de um ambiente com a luminosidade adequada para o bom desenvolvimento dos experimentos.

3.7. Testes do protótipo de microscopia/microfluorimetria construído.

Uma graticula micrométrica com marcações espaçadas de 10 μm foi utilizada para quantificar as dimensões do campo visual. A razão entre o tamanho da imagem do espaçamento das marcações da graticula obtida no monitor de vídeo e sua dimensão real permitiu calcular a ampliação óptica total do sistema de microscopia.

A mesma microesfera fluorescente utilizada para alinhar a montagem preliminar foi usada com a mesma finalidade para o protótipo desenvolvido. A coerência entre o sinal de fluorescência detectado e a imagem no campo visual foi garantida por meio do ajuste da abertura da fenda retangular do obturador que limita a área sensível exposta do *PMT*, de forma que a saída da microesfera do campo visual implicasse em retorno ao sinal basal de fluorescência registrado pelo *PMT*.

O obturador com fenda retangular (Figura 3.11) tem o seu controle de abertura feito por parafusos com roscas sem fim, cujo sentido de rotação define o avanço ou recuo do bloco de acrílico deslizante transpassado por cada parafuso. A cada bloco, foi colada uma folha de diafragma (não mostrada na Figura 3.11), que se movimenta com este, e define a abertura da fenda.

No que se refere à óptica de excitação, a energia radiante que chega à amostra biológica foi estimada por meio de um fotômetro construído com um fotodiodo de silício, (OPT 101, Burr-Brown, Tucson, AZ, EUA). O circuito, as curvas de resposta e sensibilidade, bem como o cálculo da potência óptica que chega até a célula, estão mostrados no apêndice B. O fotômetro foi posicionado onde supostamente estaria a célula, ou seja, sob o foco da luz de excitação condensada pela objetiva. Este dado foi estimado no sentido de fornecer melhor caracterização da instrumentação desenvolvida e contribuir com dados escassos na literatura.

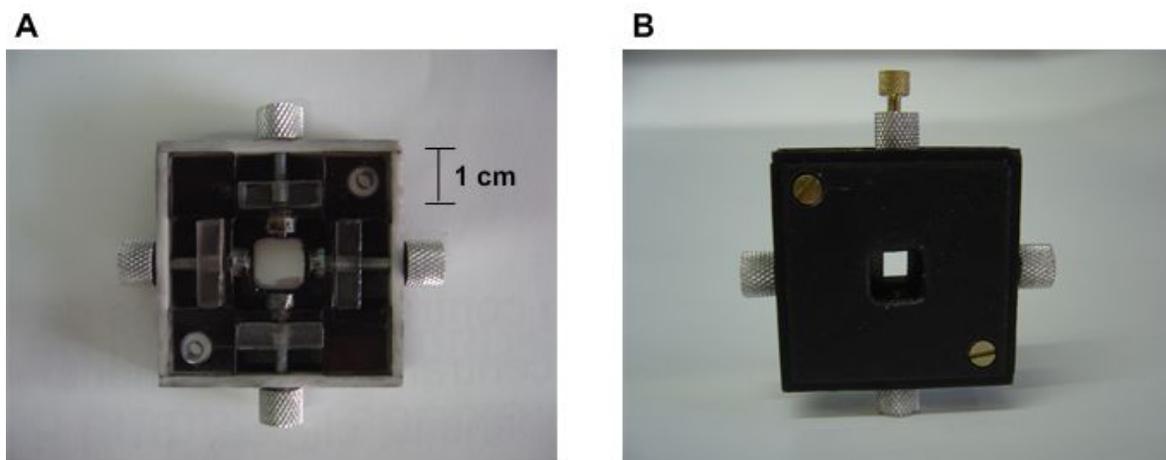


Figura 3.11: O painel A mostra a parte interna do obturador, com detalhe dos parafusos e blocos que definem a abertura da fenda. O painel B mostra uma vista frontal, onde pode ser observada a fenda definida pelo ajuste da posição dos blocos.

Outra característica importante avaliada foi o ruído no sinal de saída do *PMT* produzido pelo acionamento das fontes luminosas e sua influência no deslocamento no nível basal deste sinal. Este deslocamento contribui com uma fluorescência de fundo que, posteriormente, deve ser subtraída no processo de conversão de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$. Por fim, o sistema desenvolvido foi testado com o propósito de registrar simultaneamente o curso temporal do encurtamento celular e $[Ca^{2+}]_i$.

3.8. Preparação da câmara de perfusão de cardiomiócitos.

A suspensão de miócitos foi depositada em uma câmara que permite a perfusão das células com diversas soluções (Figura 3.12). A câmara (desenvolvida por Gomes, 1997; patente número: PI 0302.403 - 2) foi construída em acrílico e apresenta 5 entradas para soluções distintas, um volume de 200 μ l, e a possibilidade de fluxo de até 15 ml/min em regime aparentemente laminar. Do lado oposto à entrada, há uma saída ligada a uma linha de vácuo para a retirada do excesso de solução.

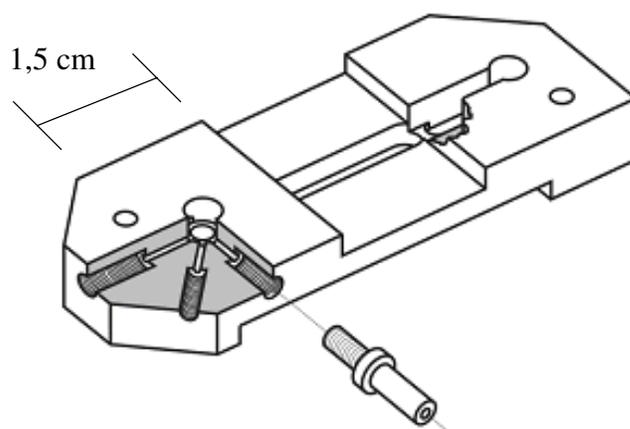


Figura 3.12: Câmara de perfusão utilizada nos experimentos com miócitos cardíacos isolados (PI 0302.403 – 2).

O fundo da câmara de perfusão consiste de uma lamínula de vidro, onde foi depositada uma fina camada (2 μl) de solução de colágeno, após lavagem da câmara com álcool e sabão e secagem. Após secagem do colágeno por 10 min, a suspensão de miócitos isolados (100 μl) foi depositada na câmara. Esperou-se mais 20 min para que as células aderissem à lamínula, e o experimento foi iniciado.

A contração dos cardiomiócitos foi induzida por estimulação elétrica por campo (0,5 Hz, pulsos bipolares de 10 ms de duração e amplitude 20% acima do limiar) por meio de um par de eletrodos introduzidos na câmara de perfusão. O estimulador elétrico utilizado nos experimentos foi projetado e construído pelo Eng. Sérgio Moura (CEB-UNICAMP).

3.9. Carregamento dos cardiomiócitos com o indicador fluorescente e conversão do sinal de fluorescência para $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Após estimulação dos miócitos cardíacos por cerca de 10 min (período de estabilização), a estimulação foi cessada e 10 μl da solução TyN – fluo (1 μM) para incubação foram adicionados à câmara. O tempo de incubação foi de 20 min em ambiente escuro. Em seguida, as células foram perfundidas com TyN por 20 min, para permitir a desesterificação do indicador no meio intracelular.

O sinal de fluorescência detectado pelo *PMT* foi convertido para $[Ca^{2+}]_i$ por meio da expressão (Cheng *et al.*, 1993):

$$[Ca]_i = \frac{\frac{F - F_{back}}{F_0 - F_{back}} \cdot K_{d(Ca)}}{\frac{K_{d(Ca)}}{[Ca]_d} - \frac{F - F_{back}}{F_0 - F_{back}} + 1} \quad (3.6)$$

onde F é a fluorescência medida durante o transiente; F_0 é a fluorescência diastólica; F_{back} é a fluorescência de fundo (fluorescência registrada num campo da câmara que não contem células); $K_{d(Ca)}$ é a constante de dissociação aparente de Ca^{2+} do indicador (1,1 μ M, Harkins *et al.*, 1993) e $[Ca]_d$ é a $[Ca^{2+}]_i$ diastólica (estimada em 0,23 μ M com o indicador ratiométrico indo-1, Bassani & Bassani, 2002).

3.10. Troca rápida de soluções

A aplicação rápida de cafeína foi implementada por meio de uma válvula solenóide de resposta rápida (atraso < 7 ms; mod. LFAA 12016-18H, The Lee Company, Westbrook, CT, EUA), controlada por um circuito oscilador, descrito em detalhes no Apêndice C. A válvula apresenta uma entrada normalmente aberta e outra normalmente fechada. Quando uma tensão de 12 V e corrente 41 mA (saída do circuito oscilador) é aplicada aos terminais da válvula, a solução de saída é chaveada da entrada normalmente aberta para a normalmente fechada. Após a aplicação do pulso, a saída retorna à solução na entrada normalmente aberta.

Uma micropipeta na saída da válvula leva a solução até próximo da célula para que a troca rápida seja efetuada. A micropipeta foi produzida por estiramento, aquecendo-se um tubo de polietileno termodeformável, de modo a minimizar o “espaço morto” entre a saída da válvula e a saída da micropipeta. O conjunto válvula-micropipeta foi posicionado próximo da câmara de perfusão por meio de um suporte para a sustentação e manipulação do conjunto. O “volume morto” de solução na micropipeta foi estimado em 25 μ l, e a taxa de perfusão estimada em 10 ml/min. Embora a taxa de perfusão pela micropipeta seja inferior àquela máxima possível na própria câmara de perfusão, a proximidade entre a ponta da pipeta e a célula permite realizar trocas mais rápidas no meio em torno do miócito.

Em todos os experimentos realizados, a solução Ty00 foi colocada na entrada normalmente aberta, enquanto a solução Caf00 foi colocada na entrada normalmente fechada.

3.11. Modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA: protocolo experimental e testes.

O protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA consistiu nos seguintes passos: 1) perfusão da célula com TyN e sua estimulação elétrica até a estabilização das contrações e transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; 2) troca da solução de perfusão para Ty00, com a célula perfundida por esta (tanto via micropipeta, quanto pela entrada da câmara) por um tempo superior a 25 s na ausência de estímulo elétrico; 3) aplicação de um trem de 5 pulsos de solução Caf00, com duração de 60 ms, e intervalo entre pulsos de 7 s, sob comando do circuito oscilador. Durante o intervalo entre pulsos, a micropipeta perfundiu a célula com solução Ty00 para a rápida remoção da solução Caf00.

Foram medidas as amplitudes dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) e o tempo para 50% de queda destes transientes ($t_{1/2}$) evocados pela aplicação rápida de Caf00. A média e erro padrão para cada um destes parâmetros foi obtida segundo a seqüência de aplicação dos pulsos em diferentes células, o que permitiu avaliar a variabilidade dos transientes obtidos no decorrer do experimento. Este teste foi importante para determinar a estabilidade do método empregado para estudar a captação de Ca^{2+} pela SERCA. Uma comparação entre o tempo de subida do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo necessário para que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de pico seja alcançada a partir do diastólico) evocado pela aplicação rápida de cafeína e por estimulação elétrica também foi realizada.

O teste da conservação do Ca^{2+} intracelular neste modelo experimental consistiu na estimativa da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) antes e após a aplicação do trem de pulsos de cafeína. Este procedimento consistiu na repetição dos passos 1 e 2 do protocolo para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA, com a aplicação subsequente de um pulso de cafeína de longa duração (superior a 10 s), durante o qual registrou-se o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocado (condição controle). O protocolo foi então repetido, mas com a inserção do trem de pulsos rápidos de cafeína (conforme descrito anteriormente) antes da aplicação do pulso de longa duração de cafeína (condição pós-pulsos) para avaliação da carga.

Para a obtenção do valor da carga de Ca^{2+} do RS, é necessário converter a $[Ca^{2+}]_i$ (concentração de Ca^{2+} livre) para concentração total de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_T$) no citosol. Esta conversão é necessária, pois além da concentração de $[Ca^{2+}]_i$ livre no citosol (estimada a partir do indicador fluorescente) deve-se considerar também o Ca^{2+} ligado a outros sítios passivos que não são detectados pelo indicador. Pode-se citar como exemplo destes sítios o próprio fluo-3 e a troponina C (proteína à qual o íon Ca^{2+} se liga para disparar o processo contrátil). Deste modo, a $[Ca^{2+}]_T$ é dada pela expressão (Bassani & Bers, 1995):

$$[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}]_i + \left(\frac{B_{max}^f \cdot [Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_{df}} \right) + \left(\frac{B_{max}^e \cdot [Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_{de}} \right) \quad (3.7)$$

onde B_{max}^f (4 μM) representa a concentração máxima do Ca^{2+} ligado ao indicador fluo-3; K_{df} (1,1 μM) é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} do indicador fluo-3 (Harkins *et al.*, 1993); B_{max}^e (300 μM) é a concentração máxima de Ca^{2+} ligado aos sítios passivos endógenos e K_{de} (0,53 μM) é a constante de dissociação aparente de Ca^{2+} desses sítios (Bassani *et al.*, 1998). A diferença entre a $[Ca^{2+}]_T$ no pico do transiente de Ca^{2+} evocado pelo pulso de cafeína de longa duração e a $[Ca^{2+}]_T$ diastólica corresponde à carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) em μM (i.e., $\mu moles$ de Ca^{2+} por litro de volume celular não mitocondrial, Bassani & Bers, 1995).

O valor de B_{max}^f foi estimado utilizando o indicador fluorescente fluo-3 FA (“free acid”, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), que não é permeante através da membrana, mas tem as demais propriedades iguais às do fluo-3 AM. B_{max}^f foi estimado como a concentração de fluo-3 FA em solução de Ty00 (cujas concentração de Ca^{2+} contaminante é estimada em 1 μM) para a qual o *PMT* fornece o mesmo sinal de saída associada à fluorescência emitida pela célula quando exposta rapidamente à cafeína. Tipicamente a $[Ca^{2+}]_i$ evocada pela aplicação rápida de cafeína alcança aproximadamente 1 μM (Bassani *et al.*, 1994a).

3.12. Efeitos de agentes que causam estimulação e inibição da SERCA.

Foram registrados de forma simultânea os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e as contrações evocadas por estimulação elétrica tanto na ausência (controle), como na presença de 10 nM de isoproterenol (ISO) (medidos após 3 minutos da aplicação). Foram medidos a amplitude do encurtamento celular (diferença entre o encurtamento sistólico e diastólico, ΔL) e dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (diferença entre a $[Ca^{2+}]_i$ sistólica e diastólica, $\Delta[Ca^{2+}]_i$) e o tempo para 50% de relaxamento mecânico ($t_{1/2}$ de ΔL) e queda de $[Ca^{2+}]_i$ ($t_{1/2}$ de queda de $\Delta[Ca^{2+}]_i$), além da $[Ca^{2+}]_{RS}$. Estes parâmetros permitiram retratar as alterações promovidas pela estimulação beta-adrenérgica na situação em que todos os transportadores de Ca^{2+} estão operantes. O mesmo protocolo foi utilizado para observar os efeitos de 5 μM de tBQ em relação aos parâmetros mencionados. A carga de Ca^{2+} do RS antes e após a aplicação dos fármacos foi avaliada por meio da aplicação mantida de cafeína conforme descrito na seção 3.12.

O aumento da taxa de captação de Ca^{2+} da SERCA provocada indiretamente pela estimulação beta-adrenérgica, via a aplicação de 10 nM de isoproterenol (ISO), foi quantificada utilizando-se o protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} descrito na seção 3.12. O protocolo foi efetuado antes e após 3 min de perfusão com ISO. O mesmo foi realizado (em células diferentes) para estudar o efeito da desaceleração desta captação pela aplicação de 5 μM de tBQ, um inibidor específico da SERCA. Foram medidos a amplitude do encurtamento celular e dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados pelos pulsos curtos de cafeína, e o $t_{1/2}$ de relaxamento mecânico e queda de $[Ca^{2+}]_i$. Dos 5 transientes evocados, descartou-se aqueles que apresentaram queda de $[Ca^{2+}]_i$ mais rápida e mais lenta. Foi obtida a média dos $\Delta[Ca^{2+}]_i$, ΔL e $t_{1/2}$ de ΔL dos 3 demais transientes para comparação entre a condição controle e tratada.

3.13. Análise estatística dos dados

Os dados (condição controle e tratada) foram comparados por teste t de Student para amostras pareadas e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. No caso do teste da estabilidade do modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA, em que foram comparadas as diferentes contrações evocadas pelo trem de pulso de cafeína, foi usada análise de variância

monofatorial com posterior análise de Bonferroni. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3.14. Simulações computacionais aplicadas ao modelo experimental.

A descrição matemática do modelo experimental proposto neste estudo foi implementada a partir do modelo teórico de mobilização de Ca^{2+} em miócitos cardíacos descrito por Tang & Othmer (1994). Este modelo faz uma abordagem simplificada, na qual são ignorados os fenômenos elétricos de membrana que levam à entrada de Ca^{2+} no citosol. Neste caso, a despolarização do sarcolema e conseqüente corrente de entrada de Ca^{2+} dependente de tempo e potencial foram substituídas por um pulso de Ca^{2+} , o que simplifica de maneira drástica o conjunto de equações a serem integradas, tornando-as muito convenientes para a posterior adequação à situação experimental proposta para estudo da captação de Ca^{2+} .

A Figura 4.13 mostra o mecanismo de regulação de Ca^{2+} proposto por Tang & Othmer (1994), evidenciando os transportadores de Ca^{2+} considerados no modelo. Observa-se no sarcolema os canais de Ca^{2+} responsáveis pela entrada de Ca^{2+} no citosol durante a despolarização da membrana celular (fluxo este modelado como um pulso de Ca^{2+}), bem como a ATPase de Ca^{2+} e o NCX responsáveis por transportar Ca^{2+} contra seu gradiente de concentração através do sarcolema para o meio externo. Estes dois últimos transportadores foram combinados em um só componente. O RS libera Ca^{2+} para o citosol por meio dos RyRs quando abertos, e a SERCA transporta o íon do citosol para a luz da organela. Por fim, são considerados ainda os fluxos de vazamento de Ca^{2+} tanto do meio extracelular para o citosol, como do RS para o citosol.

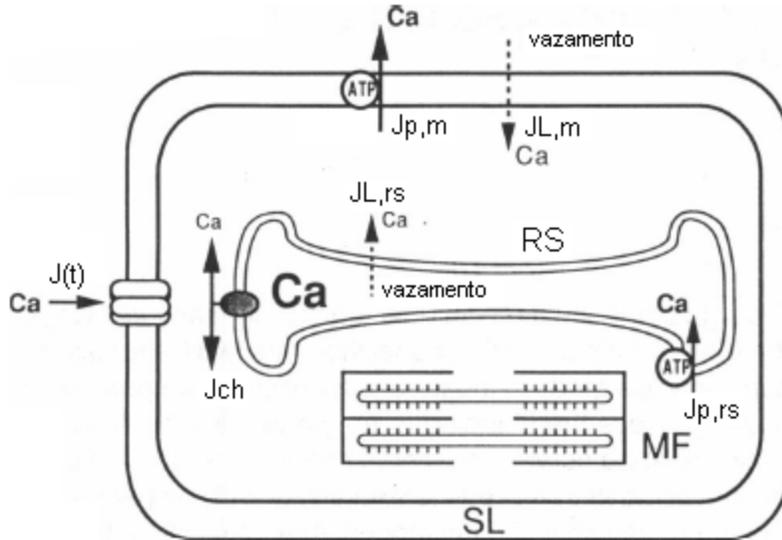


Figura 4.13: Diagrama da regulação de Ca^{2+} para a célula cardíaca segundo o modelo de Tang & Othmer (1994). RS: retículo sarcoplasmático, MF: miofilamentos; SL: sarcolema. $J(t)$ é o fluxo de Ca^{2+} do meio extra para o meio intracelular. $J_{p,m}$ é o fluxo de Ca^{2+} transportado do citosol para o meio extracelular pelo conjunto troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema. $J_{L,m}$ e $J_{L,rs}$ são, respectivamente, os fluxos de vazamento de Ca^{2+} do meio extracelular para o citosol e do RS para o citosol. J_{ch} é o fluxo de Ca^{2+} do RS para o citosol através dos receptores de rianodina (RyRs). e $J_{p,rs}$ é o fluxo referente ao bombeamento de Ca^{2+} do citosol para o RS pela SERCA. Figura modificada de Tang & Othmer (1994).

A liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} no modelo de Tang & Othmer (1994) segue o modelo biofísico proposto por Fabiato (1983). Neste modelo, há dois sítios regulatórios de ligação de Ca^{2+} no lado citoplasmático dos RyRs. Um sítio liga Ca^{2+} rapidamente e com baixa afinidade, e regula positivamente o canal (i.e., estimula sua abertura), enquanto no outro, a ligação é de alta afinidade e lenta, inibindo a abertura do canal (regulação negativa). Define-se, portanto, quatro possíveis estados para os RyRs: a) ativável (receptor sem Ca^{2+} nos sítios de ligação); b) aberto (receptor com Ca^{2+} ligado apenas ao sítio de regulação positiva); c) fechado (receptor com Ca^{2+} ligado em ambos os sítios regulatórios); e d) refratário (receptor com Ca^{2+} ligado apenas no sítio de regulação negativa). Assim, a resposta inicial a um pulso de Ca^{2+} definido por $J(t)$, cuja amplitude e duração seja suficiente para permitir ligação ao sítio de baixa afinidade, será a abertura do canal (ligação ao sítio rápido). Em seguida, Ca^{2+} tenderá a se ligar ao sítio mais lento, o que faz com que os canais inicialmente abertos sejam fechados (Ca^{2+} ligado ao sítio de

alta e baixa afinidade), passando posteriormente para o estado refratário (Ca^{2+} apenas no sítio de alta afinidade), no qual não pode ser ativado por Ca^{2+} . Por fim, do estado refratário os RyRs passam para o estado ativável (sítios livres de Ca^{2+}), completando o ciclo de transições, representado pelo diagrama da Figura 4.14.

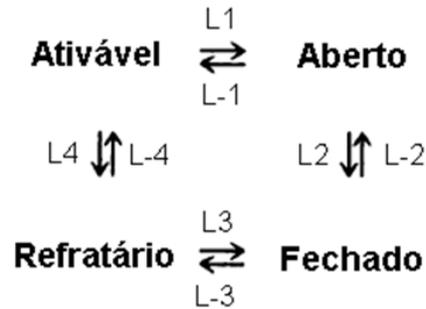


Figura 4.14: Diagrama para a transição entre estados dos RyRs. L1, L-1, L2, L-2, L3, L-3, L4, L-4 são constantes de associação e dissociação de Ca^{2+} do receptor. Figura modificada de Tang & Othmer (1994).

O número de RyRs em cada estado pode ser normalizado pela quantidade total de receptores, de modo que se possa utilizar a fração de receptores em cada estado para compor algumas das variáveis de estado do modelo. A ligação ou dissociação do Ca^{2+} dos sítios reguladores promovem as mudanças de estados nos RyRs, na forma de transições reversíveis dadas por constantes de associação e dissociação de Ca^{2+} do RyR (Figura 4.14). Observa-se que receptores ativáveis podem se tornar refratários ou abertos, enquanto receptores abertos podem se tornar fechados ou ativáveis, ou seja, as transições ocorrem de um determinado estado para estados vizinhos, segundo o diagrama na Figura 4.14. Desta forma, a dinâmica do sistema apresentado pode ser descrita matematicamente por um conjunto de 3 equações diferenciais:

$$\begin{aligned}
\frac{dx_1}{dt} &= L_{-1} \cdot x_2 + L_{-4} \cdot \left(1 - \sum_{i=1}^{i=3} x_i\right) - (L_1 + L_4) \cdot x_1 \cdot x_4 \\
\frac{dx_2}{dt} &= -L_{-1} \cdot x_2 + L_{-2} \cdot x_3 + (L_1 \cdot x_1 - L_2 \cdot x_2) \cdot x_4 \\
\frac{dx_3}{dt} &= -(L_{-2} + L_{-3}) \cdot x_3 + \left(L_2 \cdot x_2 + L_3 \cdot \left(1 - \sum_{i=1}^{i=3} x_i\right) \right) \cdot x_4
\end{aligned} \tag{3.8}$$

onde: x_1 é a fração de receptores ativáveis, x_2 é a fração de receptores abertos, x_3 é a fração de receptores fechados, $\left(1 - \sum_{i=1}^{i=3} x_i\right)$ é a fração de receptores no estado refratário (i.e., a fração de receptores que não se encontram nos demais 3 estados), e x_4 é a $[Ca^{2+}]_i$.

Outro ponto importante do modelo é a forma como os diversos transportadores de Ca^{2+} mostrados na Figura 4.13 atuam na dinâmica do transporte segundo Tang & Othmer (1994). A equação de Hill foi utilizada para descrever o fluxo de Ca^{2+} pela SERCA ($J_{p,rs}$):

$$J_{p,rs} = \frac{p_1 \cdot x_4^2}{x_4^2 + p_2^2} \tag{3.9}$$

onde p_1 e p_2 são constantes que representam, respectivamente, a velocidade máxima de transporte de Ca^{2+} (V_{max}) e a $[Ca^{2+}]_i$ para a qual a velocidade de transporte é a metade da máxima (K_m). De forma análoga, o transporte de Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular ($J_{p,m}$) foi dado por:

$$J_{p,m} = \frac{q_1 \cdot x_4^2}{x_4^2 + q_2^2} \tag{3.10}$$

onde q_1 e q_2 são constantes que representam, respectivamente, a velocidade máxima de transporte de Ca^{2+} e a concentração de $[Ca^{2+}]_i$ para a qual a velocidade de transporte é a metade da máxima.

O fluxo de entrada de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} do sarcolema ($J(t)$) foi modelado por:

$$J(t) = \left(H(t_{on}) - H(t_{off}) \right) \cdot A_o \tag{3.11}$$

onde t_{on} e t_{off} são, respectivamente, os tempos de abertura e fechamento dos canais (escolhidos arbitrariamente), $H(t)$ é uma função degrau e A_o é a amplitude do influxo de Ca^{2+} .

A liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol (J_{ch}) é proporcional ao número de receptores que se encontram no estado aberto e ao gradiente de concentração de Ca^{2+} através da membrana do RS (diferença entre a concentração reticular e citosólica de Ca^{2+}).

$$J_{ch} = Ch \cdot x_2 \cdot (x_5 - x_4) \quad (3.12)$$

onde Ch é uma constante correspondente ao coeficiente de liberação (por tempo) do canal e x_5 é a concentração reticular.

Os fluxos de vazamento de Ca^{2+} para o citosol a partir do meio extracelular ($J_{L,m}$) é proporcional ao gradiente de concentração entre estes compartimentos. De forma análoga, o vazamento de Ca^{2+} do RS para o citosol é proporcional ao gradiente de concentração entre estes compartimentos:

$$J_{L,m} = g_2 \cdot (C_0 - x_4) \quad (3.13)$$

$$J_{L,rs} = g_1 \cdot (x_5 - x_4) \quad (3.14)$$

onde g_1 e g_2 são coeficientes de vazamento (constantes) e C_0 é a concentração extracelular de Ca^{2+} .

As duas equações diferenciais que completam o modelo descrevem a variação temporal de x_4 (i.e., $[\text{Ca}^{2+}]_i$) e x_5 (i.e., $[\text{Ca}^{2+}]_{RS}$) decorrentes dos fluxos Ca^{2+} mediados pelos diversos transportadores:

$$\begin{aligned} \frac{dx_4}{dt} &= v_r \cdot J_{L,rs} + J_{L,m} - J_{p,m} + v_r \cdot (J_{ch} - J_{p,rs}) + J(t) \\ \frac{dx_5}{dt} &= -J_{L,rs} + J_{p,rs} - J_{ch} \end{aligned} \quad (3.15)$$

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

A Tabela 3.1 contém os valores dos parâmetros utilizados nas simulações desenvolvidas com pequenas alterações em relação ao modelo original de Tang & Othmer (1994).

Tabela 3.1: Parâmetros utilizados para simulação do modelo de Tang & Othmer (1994), com seu respectivo valor e unidade.

Parâmetro	Valor [unidade]
Ch	80 [s ⁻¹]
p ₁	1,038 · 10 ⁻³ [s ⁻¹ · μM]
p ₂	0,12 [μM]
q ₁	19 [s ⁻¹ · μM]
q ₂	0,06 [μM]
C ₀	1500 [μM]
v _r	0,035 *
g ₁	0,4 [s ⁻¹]
g ₂	1,063 · 10 ⁻² [s ⁻¹]

*O valor do parâmetro v_r utilizado não foi aquele do trabalho original de Tang & Othmer (1994), e sim o calculado a partir de dados de medições estereológicas de volume celular do RS em miócitos cardíacos de rato, apresentados em Page (1971).

O conjunto de 5 equações diferenciais não lineares que descrevem a dinâmica do transporte de Ca²⁺ para este modelo foi integrado numericamente por meio do método Runge-Kutta de quarta ordem, com passo de integração de 0,01 ms. O programa para obtenção da solução do modelo foi desenvolvido no *software* Matlab 6.5[®]. A simulação para obtenção das formas de onda pode ser efetuada em poucos segundos utilizando um microprocessador PENTIUM 4, 2,8 GHz.

Primeiramente, o modelo de Tang & Othmer adaptado foi resolvido fornecendo sinais razoavelmente compatíveis com o esperado para a dinâmica do transporte de Ca²⁺, [Ca²⁺]_i e [Ca²⁺]_{RS}. Em seguida, um conjunto de condições representando o efeito da cafeína sobre o transporte de Ca²⁺ foi proposto e trabalhado de forma a simular o comportamento do modelo experimental usado neste trabalho.

Na ausência do componente de influxo de Ca²⁺, o efeito da cafeína foi implementado como uma abrupta alteração nas taxas de ligação e dissociação de Ca²⁺ dos RyRs de modo a favorecer a permanência no estado aberto durante o tempo de aplicação da cafeína, ou seja, aumentando a probabilidade de transição dos estados ativável e fechado para aberto, e diminuindo a probabilidade de transições no sentido

inverso. Isto resulta em liberação de Ca^{2+} do RS, mesmo para níveis diastólicos de Ca^{2+} no citosol. Os valores destas transições (Tabela 3.2) foram estabelecidos por ensaio e erro após sucessivas simulações, até que se obtivesse depleção da carga de Ca^{2+} do RS, conforme observado experimentalmente durante a aplicação mantida de cafeína.

Tabela 3.2: Alteração das constantes de associação e dissociação do Ca^{2+} do receptor. Estas constantes definem o estado assumido pelos RyRs segundo a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o que é modificado na presença de cafeína.

Parâmetro	Na ausência de cafeína	Na presença de cafeína
L1 [$\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$]	13,5	70
L-1 [s^{-1}]	7,2	1
L2 [$\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$]	0,8	0,1
L-2 [s^{-1}]	0,84	4
L3 [$\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$]	13,5	30
L-3 [s^{-1}]	7,2	1
L4 [$\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$]	0,8	1,6
L-4 [s^{-1}]	0,84	0,1

O efeito da cafeína foi simulado (tanto a aplicação prolongada como a de curta duração) na ausência de Ca^{2+} extracelular considerando-se $C_0 = 0$, e com os transportadores transmembrana inoperantes ($q1 = 0$). A possibilidade de simulação de um sistema análogo ao modelo experimental proposto mostrou-se interessante para observar os efeitos produzidos pela alteração dos parâmetros cinéticos da SERCA, de modo a reproduzir os efeitos do ISO e tBQ determinados experimentalmente.

4. Resultados

4.1. Montagem preliminar

A montagem preliminar realizada para testar o projeto de microscopia/microfluorimetria mostrou-se mecanicamente estável para que diversos testes relevantes fossem realizados. A óptica de excitação mostrou-se eficiente em coletar potência radiante proveniente da fonte luminosa e projetá-la na amostra biológica, conforme as expressões apresentadas no projeto, com pequenas discrepâncias. Estas diferenças deixaram nítida a necessidade de implementação de partes mecânicas móveis para ajustes finos da distância entre lentes no iluminador do protótipo construído. O dispositivo de acionamento da fonte luminosa de excitação do indicador mostrou-se como uma fonte de ruído no sinal de saída do *PMT*. A atenuação do ruído foi feita por meio da limitação da área sensível do fotodetector e pela filtragem do sinal. A iluminação feita pelo *LED* vermelho para visualização da célula praticamente não produziu ruído no sinal de saída do *PMT*.

O principal teste do projeto de instrumentação foi realizado pela colocação de um miócito cardíaco isolado carregado com o indicador fluorescente no campo visual, onde foram obtidas a imagem da célula (sob estimulação elétrica) e a fluorescência por ela emitida. (Figura 4.1). A baixa qualidade dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ obtidos provavelmente foi devida à precariedade desta montagem e sua baixa imunidade a ruídos provenientes de fontes luminosas externas. No entanto, a detecção da fluorescência emitida pela célula e a obtenção da imagem do miócito desenvolvendo a contração deixou clara a viabilidade do projeto proposto e, ao mesmo tempo, permitiu introduzir os ajustes necessários para a construção definitiva do protótipo.

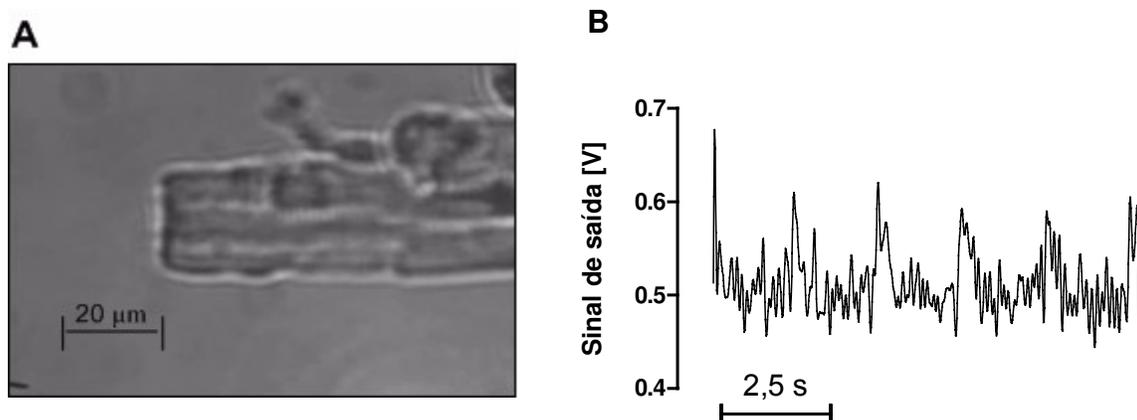


Figura 4.1: Imagem do miócito cardíaco isolado no campo visual obtido com a montagem preliminar realizada (painel A). Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por estimulação elétrica por campo a 0,5 Hz após filtragem com frequência de corte em 10 Hz (painel B).

4.2. Protótipo do sistema de microscopia/microfluorimetria

O sistema de microscopia/microfluorimetria foi construído conforme o projeto apresentado na seção 3.4. A parte central do sistema referente à óptica de emissão e projeção de imagem foi construída por uma empresa especializada em micromecânica (Optron, Campinas, SP). Esta parte inclui o estágio de microscopia, sistema para movimentação xy e controle de foco da objetiva, suportes para a rotação dos espelhos dicróico e refletor de vermelho, caixa para acondicionamento do *PMT*, saídas para a câmera *CCD* e iluminador. A Figura 4.2A mostra detalhes externos desta parte do protótipo, onde aparece a câmara de perfusão no estágio, os manipuladores para ajuste na rotação dos espelhos inclinados, furo para entrada do iluminador e conectores do *PMT*. A Figura 4.2B mostra os detalhes internos da parte central do sistema.

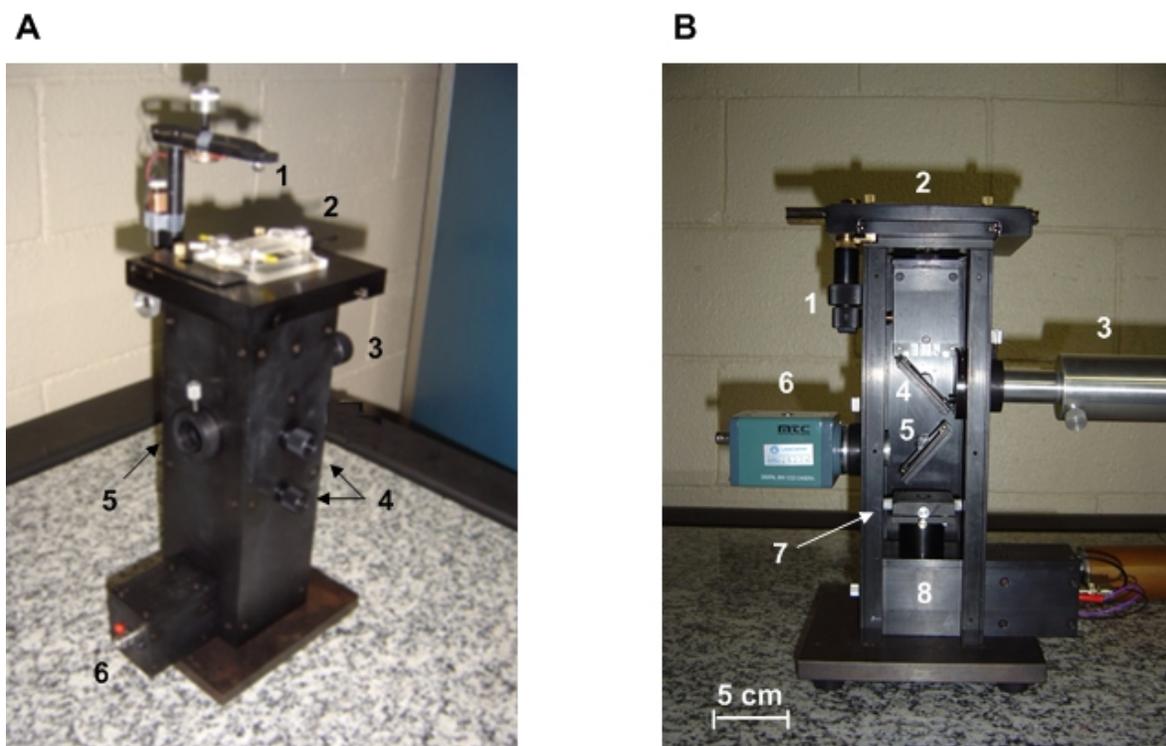


Figura 4.2: O painel A mostra a parte central do sistema referente à óptica de emissão de fluorescência e visualização da célula, onde: 1 – LED vermelho de iluminação da célula, 2 – câmara de perfusão no estágio de microscopia, 3 – manipulador para controle de foco da objetiva, 4 – manipuladores para controle da inclinação dos espelhos dicróico e refletor de vermelho, 5 – entrada para o iluminador, 6 – conectores de saída e alimentação do *PMT*. O painel B mostra detalhes da parte interna do sistema, onde: 1 – manipulador para movimentação xy do estágio do microscópio, 2 – estágio de microscopia, 3 – iluminador, 4 – suporte contendo espelho dicróico, 5 – suporte contendo o espelho refletor de vermelho, 6 – câmera *CCD*, 7 – fenda retangular, 8 – caixa para acondicionamento do *PMT*.

A Figura 4.3A mostra o iluminador (construído no CEB, UNICAMP) com os diversos componentes utilizados na óptica de excitação. O tubo que contém os diversos dispositivos ópticos foi construído em alumínio com partes móveis (roscas) que permitem pequenos ajustes nas distâncias entre lentes, garantindo que a energia radiante seja adequadamente coletada e projetada na amostra biológica. O sistema completo (Figura 4.3B), composto do iluminador e da parte central, é apresentado na Figura 4.3B.

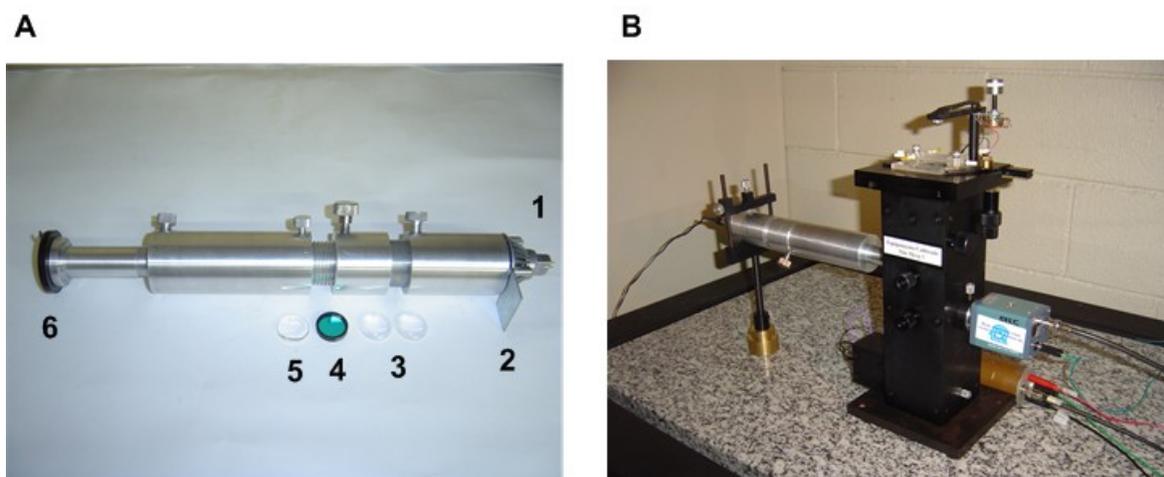


Figura 4.3: Painel A: Iluminador composto de: 1 - LED azul, 2- *shutter*, 3 - duas lentes plano-convexas, 4 - filtro de excitação, 5 - lente biconvexa, 6 - diafragma. O painel B mostra o sistema de microscopia/microfluorimetria completo.

4.3. Testes do sistema de microscopia/microfluorimetria

A Figura 4.4 ilustra a imagem obtida quando uma gráticula micrométrica com espaçamento de $10\ \mu\text{m}$ foi colocada no campo visual. A magnificação óptica total do sistema (A_T) é dada pelo produto da ampliação da objetiva (A_o) e a ampliação do conjunto câmera CCD e monitor (A_{ccd}), ou seja, $A_T = A_o \times A_{\text{ccd}}$. A_T pode ser calculada pela razão entre o espaçamento da marcação da gráticula medido no monitor e o espaçamento real. Portanto $A_T = 30000\ \mu\text{m} / 10\ \mu\text{m} = 3000$ (aproximadamente).

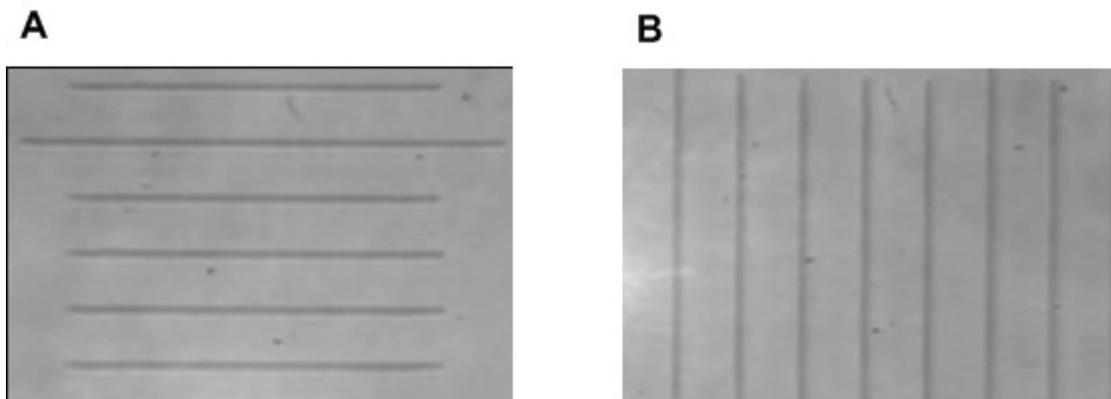


Figura 4.4: Campo visual do sistema de microscopia ($60 \times 80\ \mu\text{m}$). O espaçamento entre cada marcação na gráticula é de $10\ \mu\text{m}$. O painel A mostra marcações na horizontal e o painel B marcações na vertical para quantificação do campo visual.

Os miócitos ventriculares de rato adulto possuem, em média, 100 μm de comprimento e, portanto, apenas parte de sua imagem pode ser projetada no campo visual. A limitação do tamanho do campo foi necessária para reduzir o número de partículas (e.g., restos de células mortas) na vizinhança da célula, as quais contribuem para aumentar o sinal basal de fluorescência, podendo levar à saturação do sinal de saída do *PMT*. O campo visual de dimensão inferior ao comprimento celular não impossibilitou a quantificação do encurtamento, que foi medido em apenas uma extremidade da célula. A Figura 4.5 mostra um campo visual tipicamente obtido durante os experimentos com miócitos isolados, contendo apenas uma extremidade da célula, que está ligeiramente fora de foco para realçar a borda usada para medir o encurtamento celular.

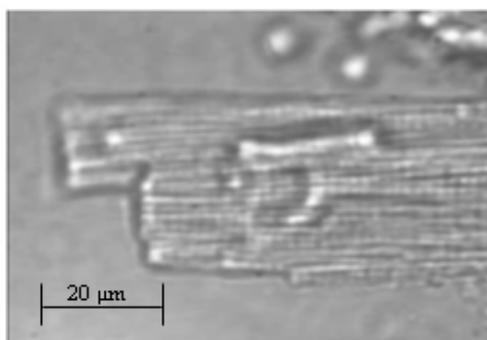


Figura 4.5: Miócito ventricular de rato adulto no campo visual do sistema de microscopia de fluorescência. A imagem foi intencionalmente colocada fora de foco para realçar a borda usada na medição do encurtamento.

O sistema de microscopia/microfluorimetria foi alinhado por meio da imagem e do sinal de fluorescência emitido por microesferas com características de absorção e emissão semelhantes às do indicador fluo-3. A Figura 4.6A mostra a imagem da microesfera no campo visual. Esta posição (representada por 1 na Figura 4.6B) corresponde ao sinal de saída máximo no *PMT* (saturação). A área sensível do fotodetector foi então limitada ajustando-se a abertura do obturador com fenda retangular de forma que a retirada da microesfera do campo visual (posição 2 na Figura 4.6B) implicasse em um retorno do sinal de saída ao nível basal (Figura 4.6C). Desta forma, a coerência entre o sinal de fluorescência e a posição do objeto no campo visual foi garantida.

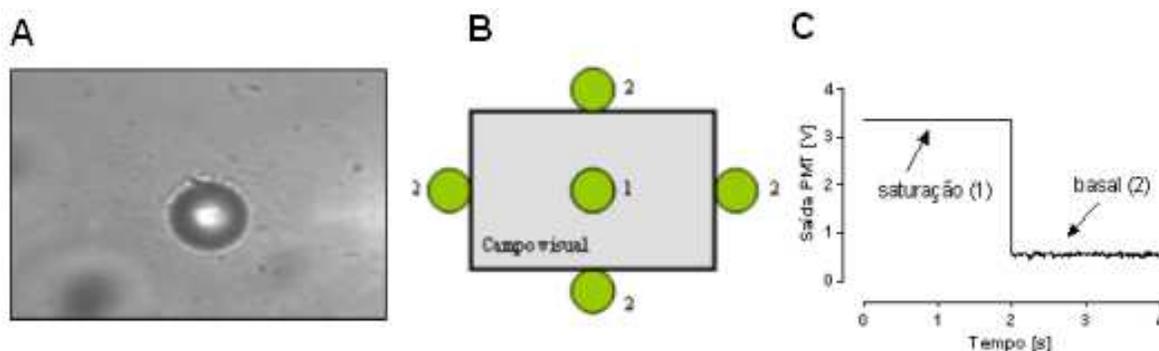


Figura 4.6: Alinhamento óptico do sistema de microscopia. O painel A mostra a microesfera fluorescente no campo visual da câmera CCD. Em B são mostradas as posições assumidas pela microesfera, e o respectivo sinal de saída do *PMT* (C).

Conforme foi observado na montagem preliminar, o acionamento da fonte luminosa de excitação, ou mesmo do *LED* vermelho de iluminação da célula, pode gerar ruído no sinal de saída do *PMT* e aumentar o sinal basal referente à fluorescência de fundo. A Figura 4.7A mostra o ruído introduzido pelo acionamento do *LED* vermelho, que foi relativamente pequeno, comparado ao ruído produzido pela luz de excitação. Este, no entanto, foi inferior a 0,2 V, o que é perfeitamente aceitável, considerando que o sinal de saída pode atingir até 3,5 V. A Figura 4.7B mostra o sinal de saída do *PMT* durante a detecção de um típico transiente de $[Ca^{2+}]_i$ evocado por estimulação elétrica. Nota-se que o ruído não compromete a qualidade do sinal, ou impossibilita a sua detecção pela redução da sua faixa de variação.

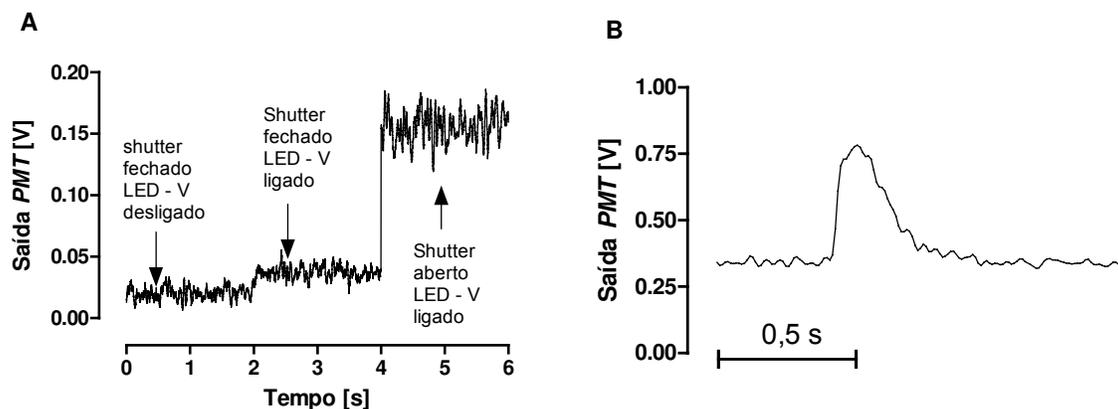


Figura 4.7: O painel A mostra a influência da fonte de excitação e do *LED* vermelho (*LED - V*) no sinal de saída do *PMT*. O *shutter* fechado bloqueia a luz proveniente da fonte de excitação. O *LED* vermelho foi ligado em $t = 2$ s e o *shutter* foi aberto em $t = 4$ s. O painel B mostra o sinal de saída do *PMT* durante registro de um transiente de $[Ca^{2+}]_i$.

A potência radiante que chega até a célula, avaliada por meio do fotômetro construído, foi estimada em aproximadamente 10 μW (apêndice B), e mostrou-se suficiente para a obtenção de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com boa relação sinal-ruído. Infelizmente, existem poucos dados deste tipo na literatura, o que impossibilita comparações.

4.4. Medição simultânea de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e encurtamento celular.

A Figura 4.8A mostra traçados obtidos simultaneamente de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e encurtamento celular (ΔL , expresso como porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR) obtidos por estimulação elétrica por campo. A Figura 4.9B mostra em detalhe um único transiente/contração. Observa-se claramente que o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ precede o desenvolvimento da contração (neste caso, o atraso entre os picos foi de 220 ms), o que se deve ao papel da elevação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como disparador do processo contrátil. Os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtidos foram semelhantes aos mostrados em trabalhos encontrados na literatura (Bassani *et al.*, 1994a; Bassani *et al.*, 1995; Shannon *et al.*, 2002; Eisner *et al.*, 2004), adquiridos com equipamentos comerciais disponíveis.

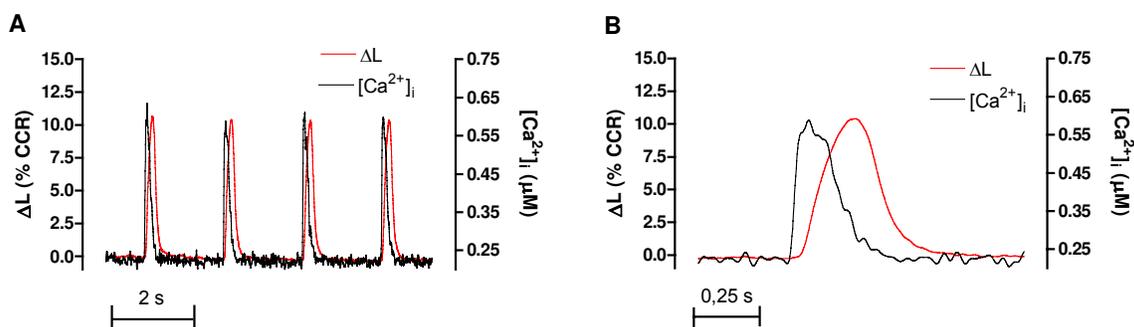


Figura 4.8: O painel A mostra medições simultâneas de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e encurtamento celular (ΔL , expresso como porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR) evocados por estimulação elétrica a 0,5 Hz. O painel B mostra um único transiente e contração correspondente em escala de tempo expandida.

4.5. Implementação do modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pelo RS.

4.5.1. Instrumentação para aplicação de pulsos rápidos de cafeína.

A Figura 4.9A mostra detalhes do conjunto suporte mecânico, válvula solenóide, micropipeta e câmara de perfusão. Este conjunto apresentou estabilidade mecânica suficiente para que os experimentos fossem realizados, além de permitir facilidade no manuseio e controle da posição da ponta da micropipeta próxima à célula. Na Figura 4.9B, mostra-se o acionador que controla a abertura e fechamento da válvula solenóide.

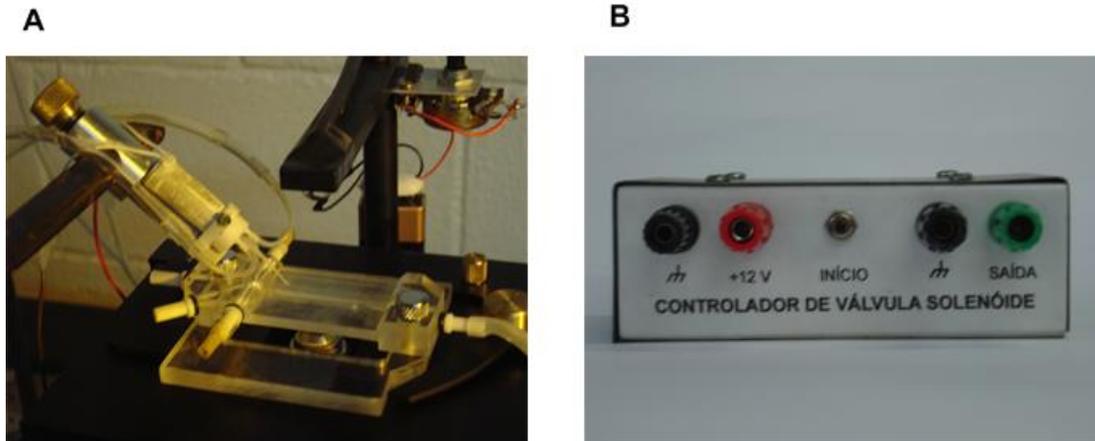


Figura 4.9: O painel A mostra detalhes do sistema (suporte, válvula, micropipeta e câmara de perfusão) construído para implementar trocas rápidas de soluções nas proximidades da célula. O painel B mostra uma foto do acionador da válvula solenóide, construído para controle rigoroso da aplicação da cafeína.

4.5.2. Transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e contrações evocadas por pulsos rápidos de cafeína.

A Figura 4.10 mostra os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocados por pulsos rápidos de cafeína decorrentes do procedimento experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pelo RS. Neste procedimento, o NCX torna-se inoperante pela retirada do Na^+ e do Ca^{2+} externo, o que elimina o fluxo de Ca^{2+} transmembrana atribuído ao principal competidor da SERCA na remoção de Ca^{2+} do citosol. A cafeína foi utilizada para evocar episódios curtos de liberação de Ca^{2+} do RS, cuja remoção será feita predominantemente pela

SERCA. O processo foi repetido 10 vezes (Figura 4.10), e a baixa variabilidade da resposta aos pulsos indica a produção de um ciclo aparentemente estável de liberação e recaptação.

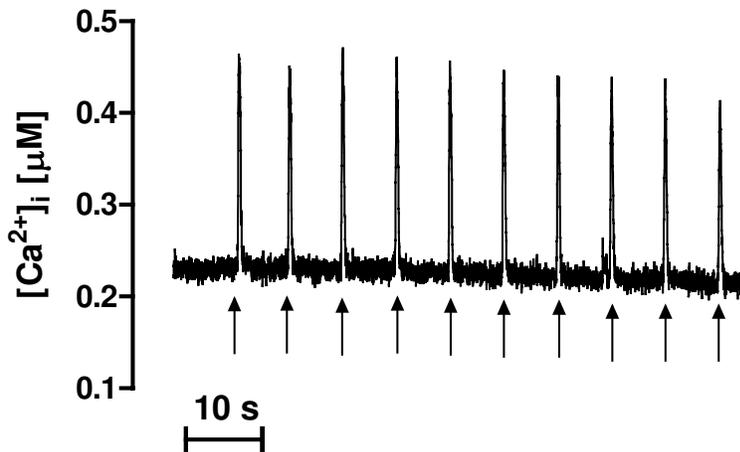


Figura 4.10: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por pulsos rápidos de cafeína durante o protocolo experimental desenvolvido para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA. As setas indicam a aplicação do pulso de cafeína.

A Figura 4.11 mostra detalhes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e das contrações evocadas por pulsos rápidos de cafeína com o procedimento experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pelo RS. A rápida elevação de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta à cafeína indica que o fármaco é capaz de passar rapidamente pela membrana celular e induzir a liberação de Ca^{2+} do RS. O retorno do comprimento celular ao nível diastólico indica que, nestas condições experimentais, a cafeína se difunde rapidamente para fora da célula durante sua lavagem; se isto não ocorresse, a célula permaneceria semi-contraída, pois a cafeína aumenta a sensibilidade a Ca^{2+} dos miofilamentos (O'Neill *et al.*, 1990a).

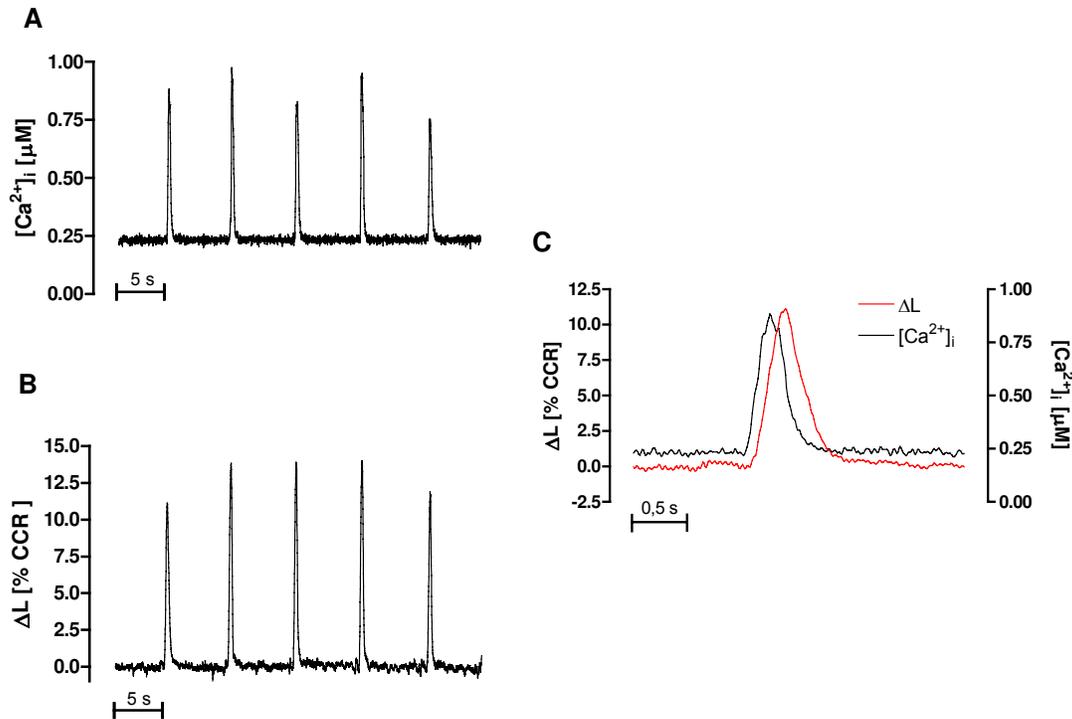


Figura 4.11: Os painéis A e B mostram o curso temporal dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e do encurtamento celular (ΔL , expresso como uma porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR), evocados pela aplicação rápida de pulsos de cafeína com duração de 60 ms e intervalo de 7 s. O curso temporal do encurtamento celular e da $[Ca^{2+}]_i$ medidos simultaneamente são mostrados em detalhe no painel C.

A Tabela 4.1 e a Figura 4.12 mostram os valores médios, em 19 células, de amplitudes e $t_{1/2}$ de queda do $[Ca^{2+}]_i$ para cada um dos 5 pulsos de cafeína segundo sua seqüência de aplicação. Uma análise de variância com posterior análise de Bonferroni não indicou diferença significativa das amplitudes de $[Ca^{2+}]_i$ evocadas pelos consecutivos pulsos rápidos de cafeína no decorrer do procedimento. O mesmo foi observado para o $t_{1/2}$ de queda do $[Ca^{2+}]_i$, o que indica a estabilidade do ciclo de liberação-captção $[Ca^{2+}]_i$.

Tabela 4.1: Média \pm erro padrão da média da amplitude de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) e $t_{1/2}$ de queda de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por cada um dos 5 pulsos de cafeína usados no protocolo experimental desenvolvido para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA, segundo a ordem de aplicação. p: determinado por análise de variância (N = 19).

	1º pulso	2º pulso	3º pulso	4º pulso	5º pulso	p
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ [μ M]	$0,29 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	0,95
$t_{1/2}$ [$Ca^{2+}]_i$ [ms]	129 ± 11	123 ± 9	127 ± 6	129 ± 8	125 ± 11	0,99

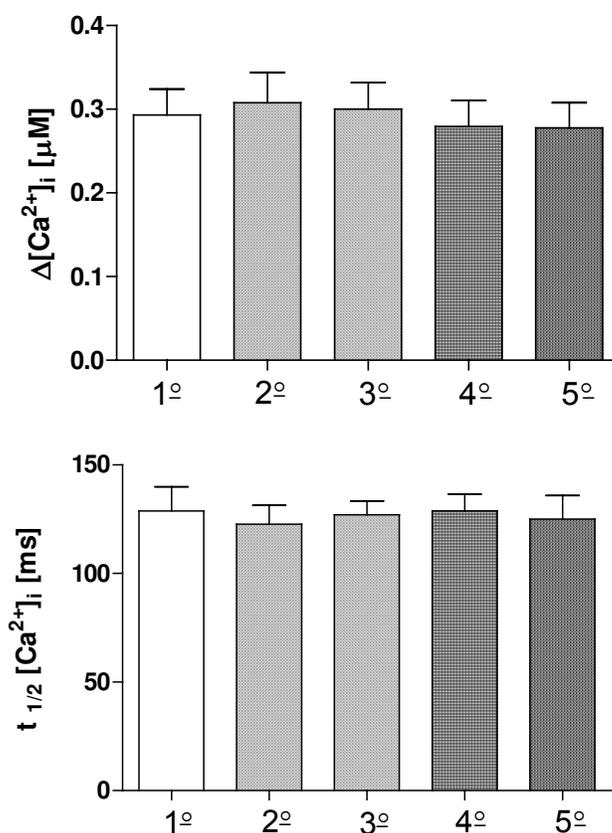


Figura 4.12: Média \pm erro padrão da média das amplitudes e $t_{1/2}$ de queda para o $[Ca^{2+}]_i$ evocados por pulsos de cafeína consecutivos, segundo o protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA.

O tempo de subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ evocado por pulsos rápidos de cafeína foi praticamente o dobro ($p < 0,0001$) do obtido por estimulação elétrica (Tabela 4.2 e Figura 4.13).

Tabela 4.2: Média \pm erro padrão da média do tempo de subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ evocado por pulsos rápidos de cafeína (Δts Caf00) e por estimulação elétrica (Δts est. elétrica). p: determinado com teste t para amostras pareadas (N = 10).

Δts est. elétrica [ms]	Δts Caf00 [ms]	p
84 ± 8	203 ± 9	$< 0,0001$

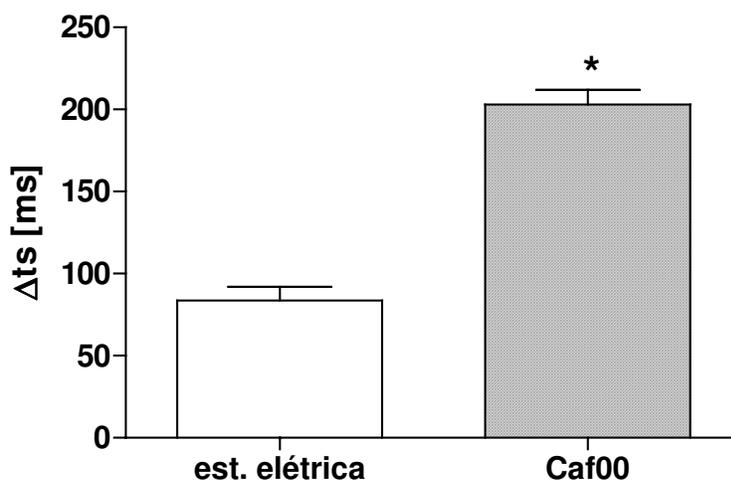


Figura 4.13: Média e erro padrão do tempo de subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ obtido por estimulação elétrica (est. elétrica) e por aplicação de pulsos rápidos de cafeína (Caf00). * representa $p < 0,05$.

4.5.3. Estimativa da carga de Ca^{2+} do RS após aplicação de pulsos rápidos de cafeína

A Figura 4.14 mostra o curso temporal da $[Ca^{2+}]_i$ durante o procedimento para a comparação da carga de Ca^{2+} do RS antes (painel A, condição controle) e após (painel B, condição pós-pulsos) a aplicação de 5 pulsos rápidos de cafeína, conforme descrito no procedimento experimental. A $[Ca^{2+}]_i$ foi então convertida para $[Ca^{2+}]_T$ e cálculo da carga de Ca^{2+} do RS foi efetuado. Não foi observada queda significativa da $[Ca^{2+}]_{RS}$ após a aplicação dos pulsos de cafeína ($p = 0,55$; Tabela 4.3 e Figura 4.15).

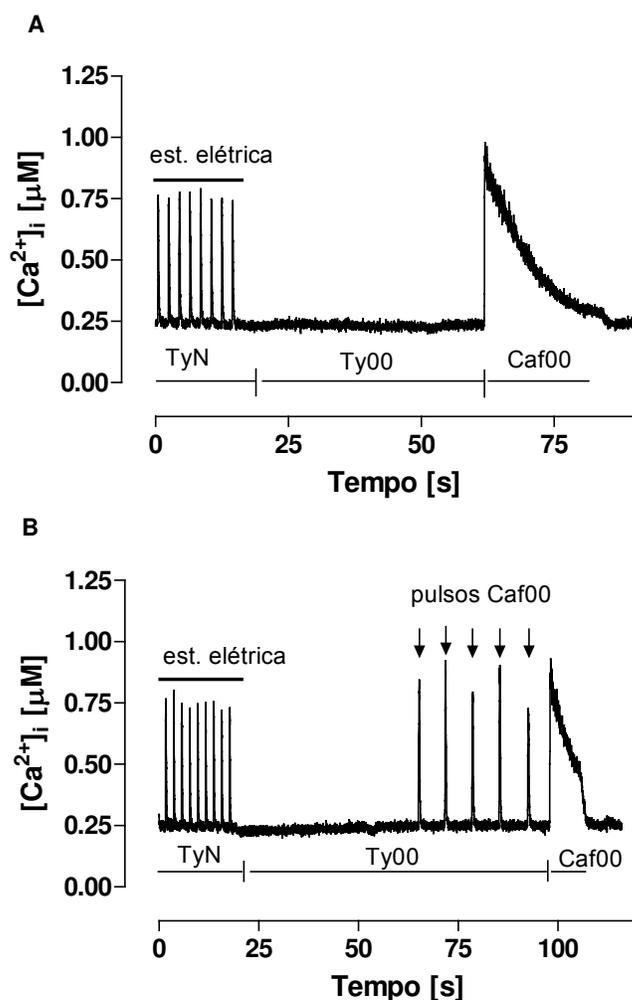


Figura 4.14: Transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por perfusão prolongada (superior a 10 s) com Caf00 antes (A) e após a aplicação de pulsos curtos de cafeína (B). Em A, transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram induzidos por estimulação elétrica durante perfusão com solução TyN. A solução de perfusão foi trocada para Ty00, e em seguida, um pulso longo de cafeína foi aplicado. O procedimento foi repetido com a inserção de um trem de pulsos de cafeína (representados por setas) antes da aplicação mantida de cafeína (painel B).

Tabela 4.3: Média \pm erro padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) antes e após a aplicação de pulsos curtos de cafeína. p: determinado com teste t para amostras pareadas (N = 7).

$[Ca^{2+}]_{RS}$ controle [μ M]	$[Ca^{2+}]_{RS}$ pós-pulsos [μ M]	p
$86,6 \pm 4,9$	$83,2 \pm 6,6$	0,55

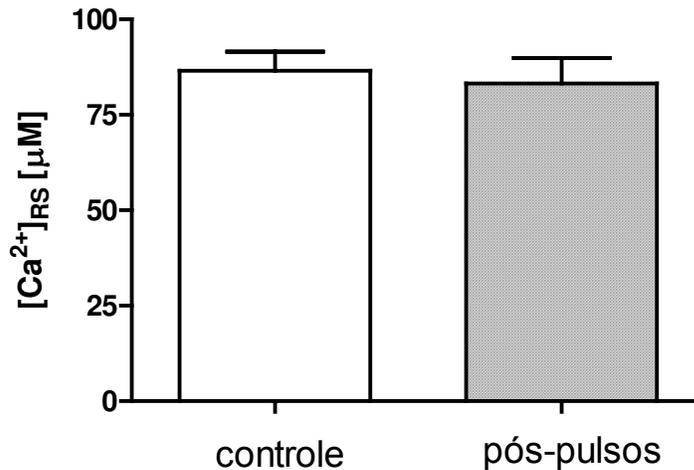


Figura 4.15: Média e erro padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) estimada antes e após a aplicação dos pulsos curtos de cafeína.

A manutenção da carga de Ca^{2+} do RS após a aplicação dos 5 pulsos de cafeína sugere que Ca^{2+} não foi perdido (pelo menos não em grandes quantidades) para o meio extracelular, ou mesmo captado de forma significativa pelos demais transportadores considerados lentos, o que caracteriza o sistema como conservativo, e portanto, uma ferramenta viável para o estudo do mecanismo de liberação e captação de Ca^{2+} do RS de forma cíclica operando em regime.

4.6 Efeito da estimulação beta-adrenérgica e da inibição da SERCA com tBQ sobre transientes evocados por estimulação elétrica.

Os efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos da estimulação de adrenocetores beta pelo ISO já foram bem caracterizados na literatura (Hussain & Orchard, 1997; Li *et al.*, 2000; Viatchenko-Karpinski & Györke, 2001). A Figura 4.16A ilustra o efeito típico de 10 nM de isoproterenol sobre a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e da contração, e sobre os respectivos $t_{1/2}$ de queda na condição em que todos os transportadores estão operantes (estimulação elétrica na presença de solução TyN). Observa-se um aumento considerável na amplitude de ambos transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e contração celular, e aceleração da fase de queda de ambas as formas de onda.

A Figura 4.16B mostra amplitudes de transientes de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ na situação controle e ISO sobrepostos e normalizados pelas respectivas concentrações de pico. Observa-se

claramente uma queda mais rápida do ISO em relação ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$ controle. As amplitudes de contrações (ΔL) na situação controle e ISO também foram sobrepostas e normalizadas pelas respectivas amplitudes de pico, onde se observa um relaxamento mais rápido após a aplicação de ISO (Figura 4.16C). Os dados médios obtidos em 7 células estão mostrados na Tabela 4.4 e na Figura 4.17. Observa-se que o ISO, na concentração de 10 nM, foi capaz de provocar alterações significativas nos parâmetros medidos, com aumento na amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e do encurtamento celular da ordem de 90 %, e redução do $t_{1/2}$ de queda de 25 %.

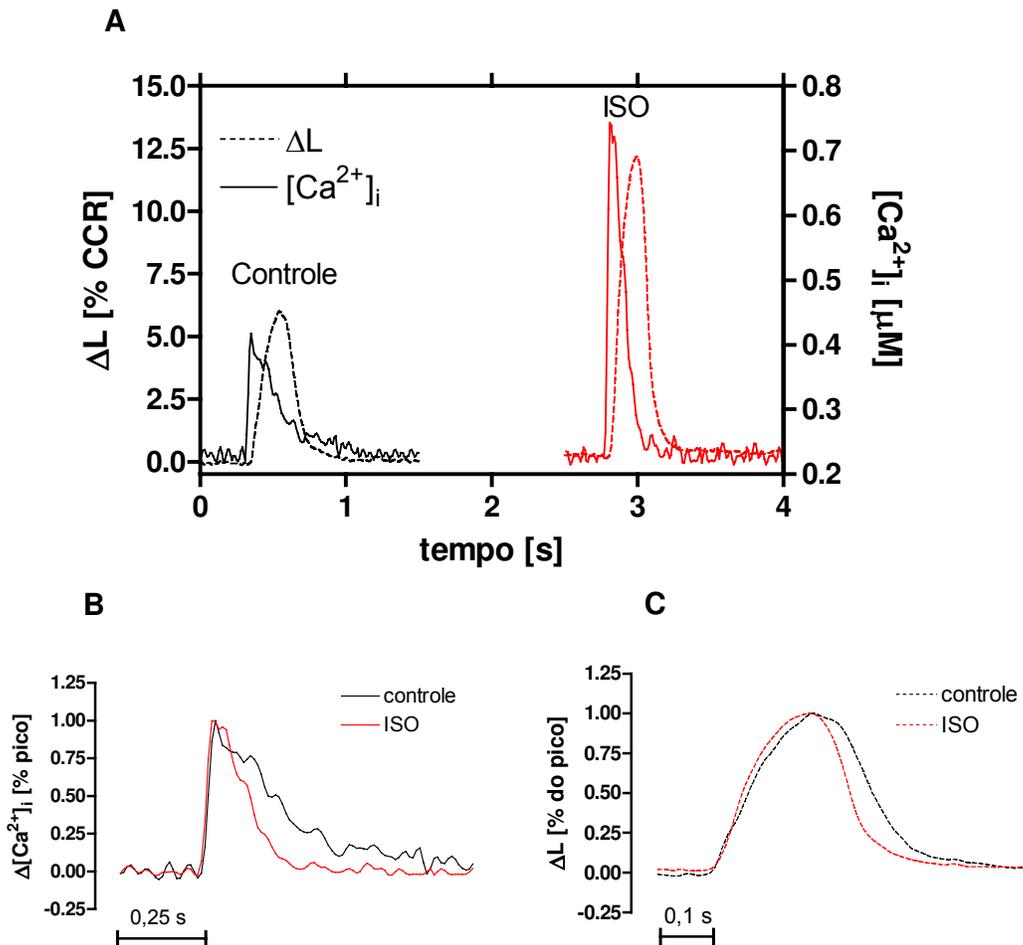


Figura 4.16: O painel A mostra transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e contrações (com amplitude representada por ΔL , expressa como porcentagem do comprimento celular de repouso, CCR) evocados por estimulação elétrica na ausência (controle) e na presença de 10 nM ISO. Os painéis B e C mostram, respectivamente, amplitudes de transientes de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e contrações na condição controle e ISO sobrepostos e normalizados pelas respectivas amplitudes de pico.

Tabela 4.4: Efeitos inotrópico e lusitrópico de 10 nM isoproterenol (ISO) sobre contrações evocadas por estimulação elétrica. Média \pm erro padrão da média da amplitude de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$), amplitude de contrações (ΔL , expresso como uma porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR), $t_{1/2}$ de queda de $[Ca^{2+}]_i$ e relaxamento na ausência (controle) e presença de ISO. p: determinado com teste t para amostras pareadas (N= 7).

	Controle	ISO	p
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (μM)	0,23 \pm 0,03	0,44 \pm 0,07	0,014
$t_{1/2}$ queda $[Ca^{2+}]_i$ (ms)	99 \pm 6	74 \pm 7	0,013
ΔL (% CCR)	4,2 \pm 0,9	8,1 \pm 1,0	0,002
$t_{1/2}$ relaxamento (ms)	125 \pm 14	96 \pm 12	0,004

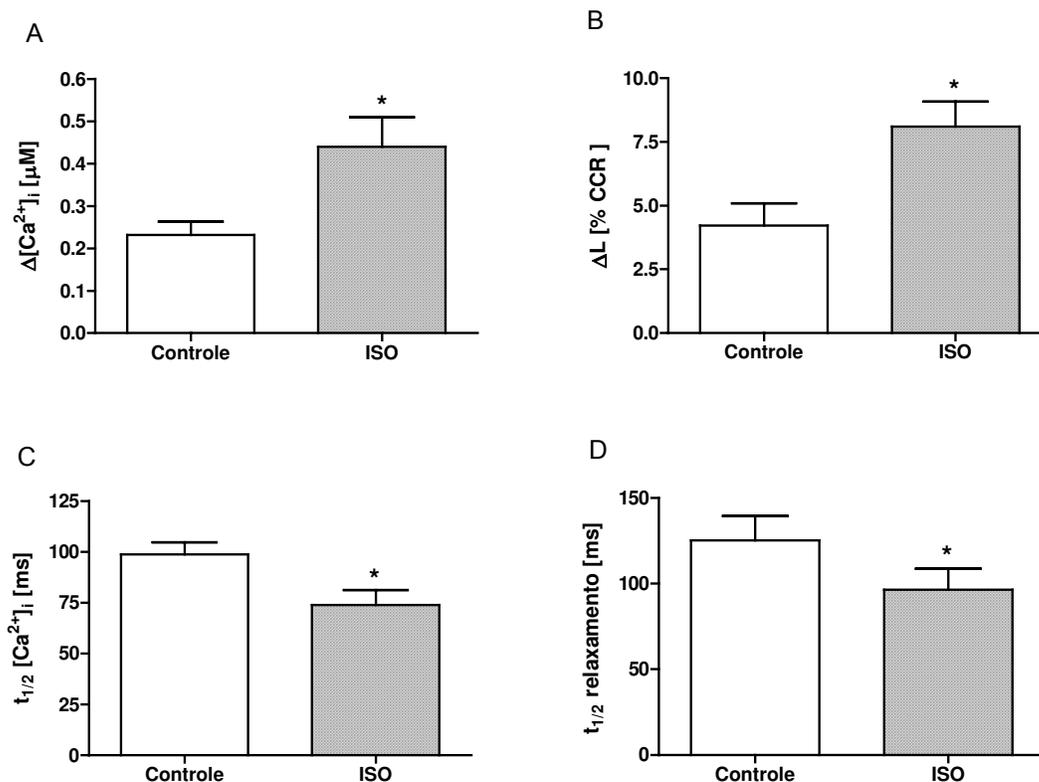


Figura 4.17: Efeitos inotrópico e lusitrópico positivos de 10 nM isoproterenol (ISO) sobre contrações evocadas por estimulação elétrica. Médias \pm erro padrão da média para a amplitude de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) e amplitude de contrações (ΔL , expresso como uma porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR), painéis A e B, respectivamente, e $t_{1/2}$ de queda de $[Ca^{2+}]_i$ e relaxamento (painéis C e D, respectivamente). Valores apresentados na Tabela 4.4. * representa $p < 0,05$.

A aplicação de ISO também provocou um aumento significativo na carga de Ca^{2+} do RS ($p = 0,021$), avaliada pela aplicação mantida de cafeína (Tabela 4.5 e Figura 4.18). Embora significativo, o aumento observado na carga foi de 6 %.

Tabela 4.5: Média \pm desvio padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) antes e após a aplicação de 10 nM de ISO. p: determinado com teste t para amostras pareadas (N= 6).

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ controle [μM]	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ ISO [μM]	p
$96,9 \pm 15,5$	$103,1 \pm 16,0$	0,021

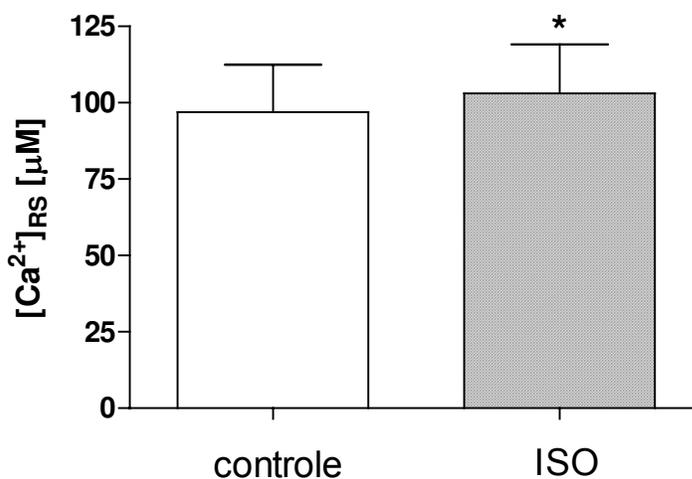


Figura 4.18: Média e erro padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) estimada antes e após a aplicação de 10 nM de ISO. Valores apresentados na Tabela 4.5. * representa $p < 0,05$.

Os efeitos de 5 μM de tBQ (inibidor da ATPase de Ca do RS, Nakamura *et al.*, 1992) sobre a amplitude de transientes e contrações e $t_{1/2}$ de queda do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e do relaxamento estão mostrados na Figura 4.19. Observa-se no painel A que tBQ causou redução na amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da contração, acompanhada de nítido aumento nos respectivos tempos de queda. A Figura 4.19B mostra $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ normalizada pela concentração de pico na condição controle e após a aplicação de 5 μM de tBQ. Os sinais sobrepostos evidenciam as diferenças nos cursos temporais e o maior tempo de queda na condição tBQ. No caso da contração (Figura 4.19C), a sobreposição e normalização da ΔL pelo respectivo pico também revelou um relaxamento mais lento após a aplicação de tBQ. Os dados médios obtidos em 7 células estão mostrados na Tabela

4.6 e na Figura 4.20. A redução provocada na amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e contração foi de cerca de 25 %. Já o aumento no $t_{1/2}$ de queda da $[Ca^{2+}]_i$ e de relaxamento foram de 74 % e 21%, respectivamente.

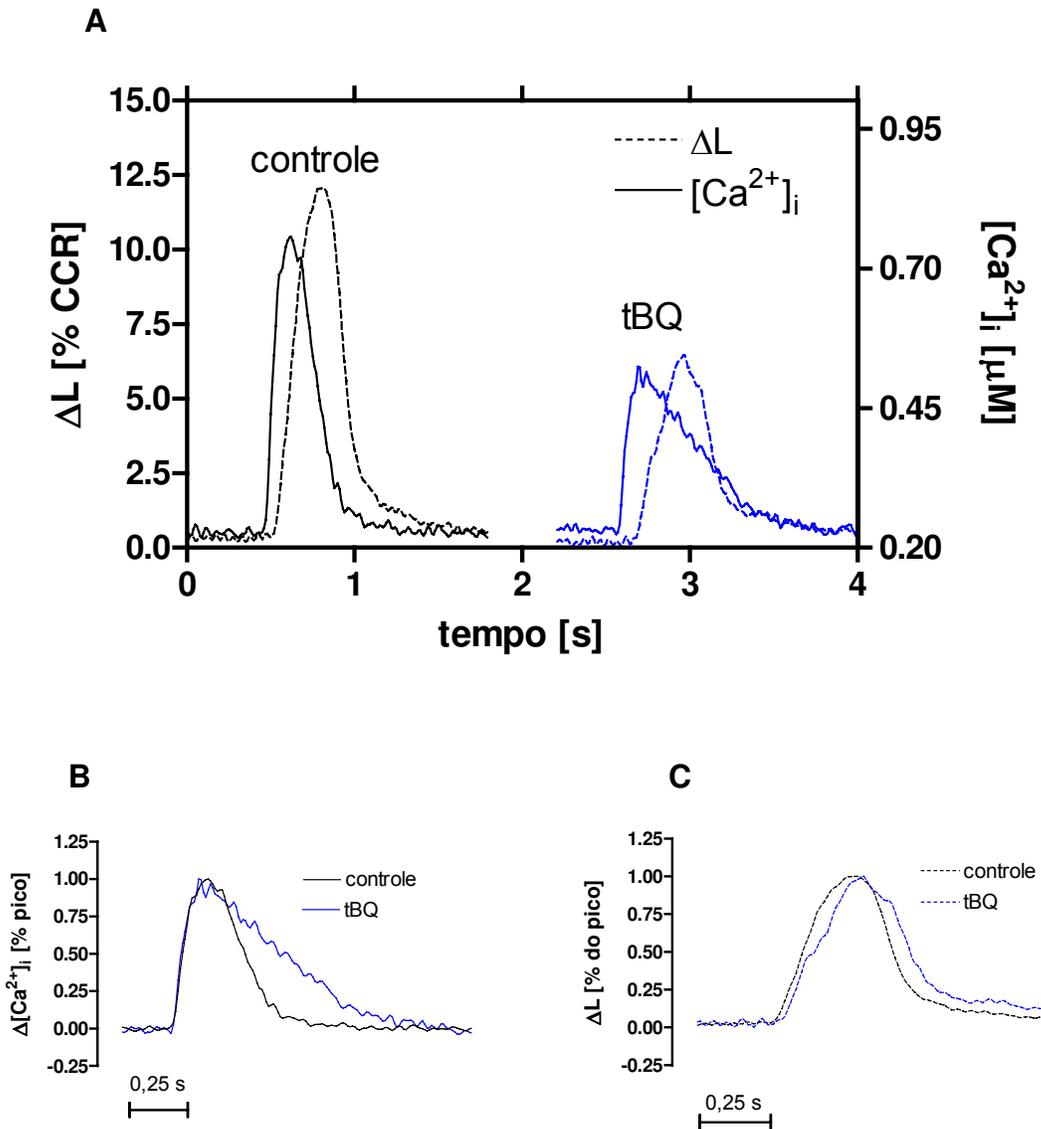


Figura 4.19: O painel A mostra transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular (ΔL , expresso como % do comprimento celular de repouso, % CCR) evocados por estimulação elétrica na ausência e na presença de tBQ. Os painéis B e C mostram, respectivamente, amplitudes de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) e contrações na condição controle e tBQ sobrepostos e normalizados pelas respectivas amplitudes de pico.

Tabela 4.6: Efeitos de 5 μM de tBQ sobre contrações evocadas por estimulação elétrica. Média \pm erro padrão da média para a amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), amplitude de contrações (ΔL em % do comprimento celular de repouso, CCR), $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e relaxamento na ausência (controle) e presença de tBQ. p: determinado com teste t para amostras pareadas (N= 7).

	Controle	tBQ	p
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM)	$0,27 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,03$	0,1586
$t_{1/2}$ queda $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ms)	89 ± 4	155 ± 7	0,0005
ΔL (% CCR)	$7,1 \pm 1,0$	$5,4 \pm 0,7$	0,0492
$t_{1/2}$ relaxamento (ms)	97 ± 9	117 ± 9	0,0002

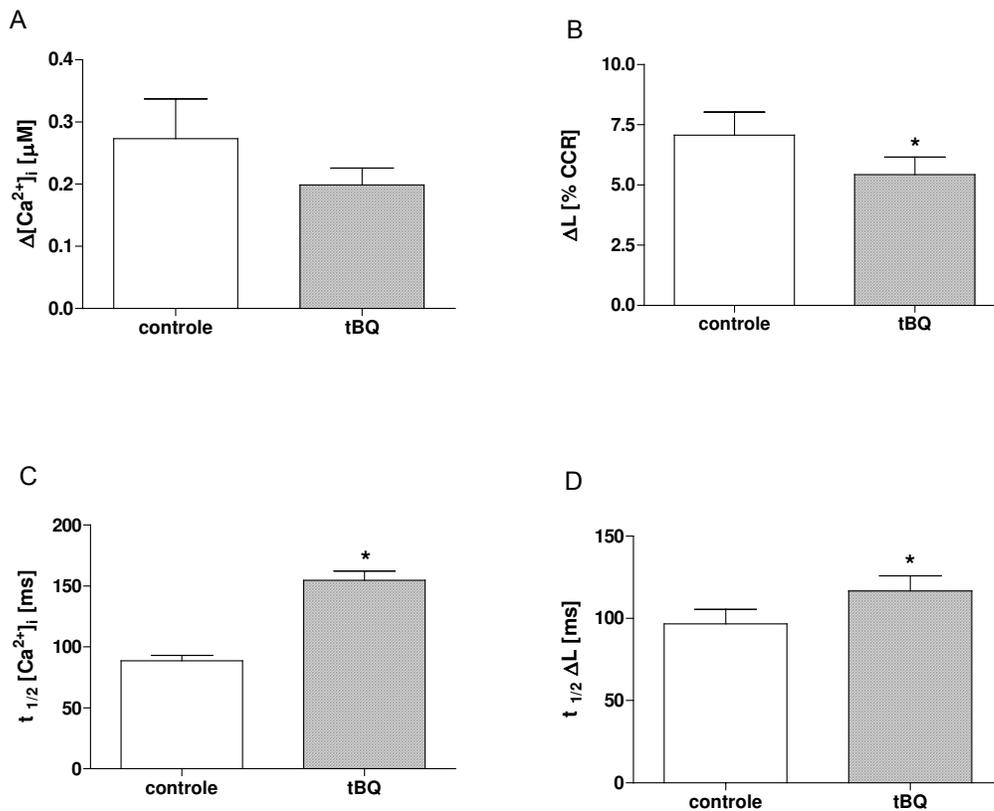


Figura 4.20: Efeitos de 5 μM de tBQ sobre contrações evocadas por estimulação elétrica. Médias \pm erro padrão da média para a amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), amplitude de contrações (ΔL , expresso como porcentagem do comprimento celular de repouso, % CCR), (painéis A e B, respectivamente), $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e relaxamento (painéis C e D, respectivamente). Valores apresentados na Tabela 4.6. * representa $p < 0.05$.

A aplicação de tBQ também provocou uma redução significativa na carga de Ca^{2+} do RS ($p = 0,005$), avaliada pela aplicação mantida de cafeína (Tabela 4.7 e Figura 4.21). A redução observada na carga foi de aproximadamente 10%.

Tabela 4.7: Média \pm desvio padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) antes e após a aplicação de $5 \mu\text{M}$ de tBQ. p: determinado com teste t para amostras pareadas (N= 7).

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ controle [μM]	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ tBQ [μM]	p
$112,3 \pm 10,5$	$103,8 \pm 11,0$	0,005

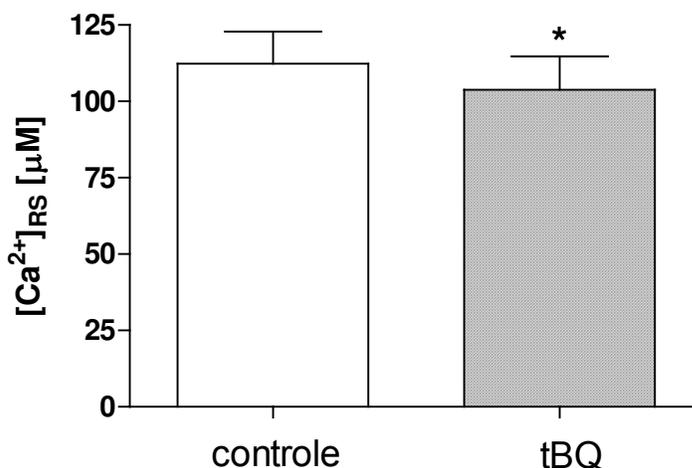


Figura 4.21: Média e erro padrão da média da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) estimada antes e após a aplicação de $5 \mu\text{M}$ de tBQ. Valores apresentados na Tabela 4.7. * representa $p < 0.05$.

4.7 Efeito do ISO e do tBQ sobre transientes e contrações evocados por pulsos curtos de cafeína.

Uma vez observado que o modelo experimental para estudo da recaptção de Ca^{2+} pela SERCA pode ser executado e sabendo que a estimulação beta-adrenérgica causa indiretamente o aumento da taxa de captação de Ca^{2+} pelo RS (Koss & Kranias, 1996; Simmerman & Jones, 1998), o protocolo foi então aplicado para estudar as alterações produzidas na remoção do Ca^{2+} citosólico pela SERCA após a aplicação do agonista de receptores beta-adrenérgicos ISO. A Tabela 4.8 e a Figura 4.22 mostram as amplitudes e $t_{1/2}$ de queda de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocados por pulsos curtos de cafeína na ausência (controle) e na presença de ISO.

Tabela 4.8: Efeitos de 10 nM isoproterenol (ISO) utilizando o protocolo desenvolvido para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA. Para comparação, foi obtida a média da amplitude e $t_{1/2}$ de queda de 3 dos 5 transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocados pelo trem de pulsos de cafeína na ausência (controle) e presença de ISO. Os dados são média \pm erro padrão para as amplitudes dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), e $t_{1/2}$ de queda. p: determinado por teste t para amostras pareadas (N = 10):

	Controle	ISO	p
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM)	$0,32 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,06$	0,47
$t_{1/2}$ queda $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ms)	125 ± 7	94 ± 5	0,0007

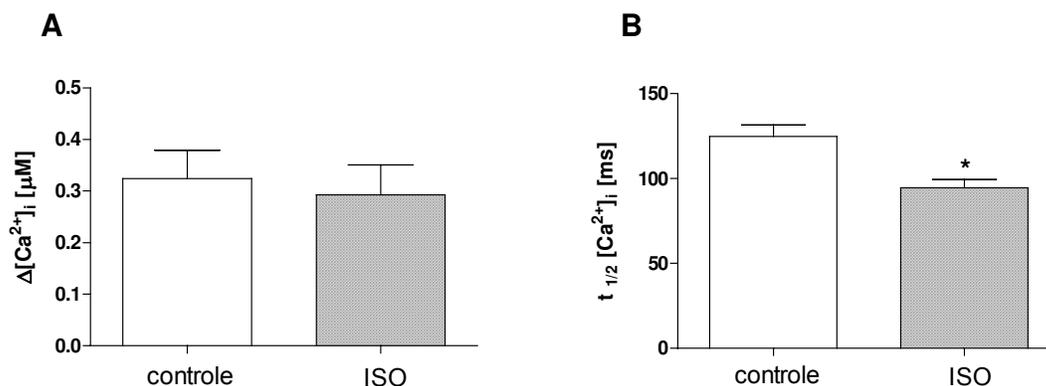


Figura 4.22: Efeitos da estimulação beta-adrenérgica sobre transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtidos com o protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA na situação controle e após a aplicação de ISO. Médias \pm erro padrão da média para a amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, painel A) e $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, (painel B). Valores apresentados na Tabela 4.8. * representa $p < 0,05$.

Observa-se que não houve alteração significativa da amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na presença de ISO ($p = 0,47$). Já a remoção de Ca^{2+} do citosol foi significativamente mais rápida, o que foi representado por uma diminuição de 25% do $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p = 0,0007$).

O protocolo experimental desenvolvido também foi empregado para avaliar as alterações produzidas por 5 μM de tBQ. Este fármaco é um inibidor seletivo da SERCA (Moore *et al.*, 1987), que oclui a enzima por inibir a decomposição do estado E1P (i.e.,

após fosforilação da enzima pelo ATP), o que reduz a taxa de transporte do Ca^{2+} (Nakamura *et al.*, 1992). A Tabela 4.9 e a Figura 4.23 mostram os efeitos do tBQ sobre a amplitude e $t_{1/2}$ de queda de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Tabela 4.9: Efeitos de 5 μM de tBQ sobre a amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) evocados por pulsos curtos de cafeína e seu $t_{1/2}$ de queda. Para comparação, usou-se a média de 3 dos 5 transientes evocados na ausência (controle) e presença de 5 μM de tBQ. Os dados são média \pm erro padrão. p: determinado por teste t para amostras pareadas (N = 9):

	Controle	tBQ	p
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM)	$0,27 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,02$	0,0291
$t_{1/2}$ queda $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ms)	117 ± 8	184 ± 14	0,0004

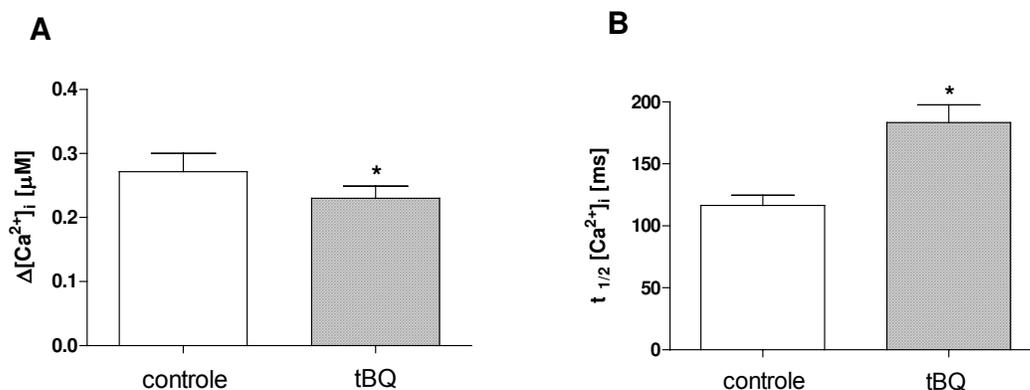


Figura 4.23: Efeitos de 5 μM de tBQ sobre transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtidos com o protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA. Médias \pm erro padrão da média para a amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), (painel A), $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, (painel B). Valores apresentados na Tabela 4.9. * representa $p < 0,05$.

Observa-se na Figura 4.23 que o tBQ provocou uma queda de 15% na amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p = 0,0291$) e um aumento de 57% do $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p = 0,0004$).

A Figura 4.24 mostra $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocadas por pulsos rápidos de cafeína normalizadas pelas respectivas concentrações de pico em uma mesma célula, utilizando o procedimento experimental desenvolvido para estudo da captação de Ca^{2+} na situação

controle, ISO e tBQ. Os sinais foram sobrepostos evidenciando o efeito acelerador do ISO e desacelerador do tBQ sobre a queda de $[Ca^{2+}]_i$.

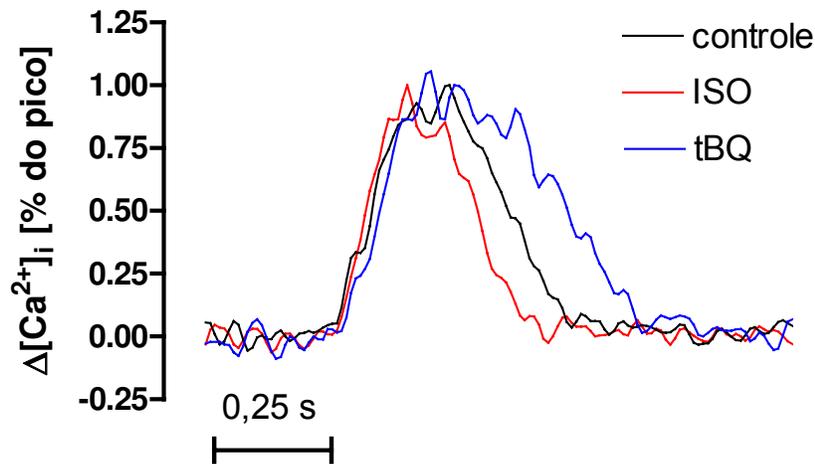


Figura 4.24: Amplitudes de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) normalizadas pelas respectivas amplitudes de pico evocados por pulsos rápidos de cafeína na condição controle, ISO e tBQ aplicados na mesma célula.

4.8 Simulações Computacionais

A Figura 4.25 mostra as formas de onda obtidas quando o modelo de Tang & Othmer (1994) adaptado foi resolvido para estímulos (degraus de Ca^{2+}) aplicados a partir de $t = 5$ s, com amplitude de influxo de Ca^{2+} de $4 \mu M/s$ (parâmetro A_o), duração de 250 ms e frequência de 0,5 Hz. Quando o estímulo é aplicado, uma fração considerável dos RyRs no estado ativável passa para o estado aberto (painel A), o que causa aumento da liberação de Ca do RS (J_{ch} , painel D) e subida de $[Ca^{2+}]_i$ (painel B). Logo em seguida, há um aumento da fração dos RyRs no estado fechado, o que posteriormente é refletido no aumento da fração de RyRs no estado refratário, e mais adiante, na recuperação dos receptores no estado ativável. Desta forma, o sistema recobra o equilíbrio e $[Ca^{2+}]_i$ retorna ao nível diastólico. A cada estímulo aplicado, observam-se oscilações na carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca]_{RS}$, painel C) decorrentes do processo de liberação (J_{ch} – painel D) e recaptação de Ca^{2+} ($J_{p,sr}$, painel D). O curso temporal do fluxo de captação acompanha o de liberação, e as pequenas diferenças observadas entre estes fluxos originam esvaziamento e reenchimento do RS, bem como o aumento de $[Ca^{2+}]$ no citosol. O painel E mostra um pequeno vazamento de Ca^{2+} transmembrana (fluxo passivo de entrada, $J_{L,m}$), que, em repouso, é equilibrado pela extrusão de Ca^{2+} via ATPase de Ca^{2+} e NCX

do sarcolema ($J_{p,m}$). Já o vazamento de Ca^{2+} do RS para o citosol ($J_{L,SR}$) é proporcional a $[Ca]_{RS}$ e, em repouso, é igual à diferença entre os fluxos de liberação e recaptção. O fluxo de Ca^{2+} transportado pelo sarcolema é dependente da $[Ca^{2+}]_i$ e oscila a cada transiente de $[Ca^{2+}]_i$. O painel F mostra os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ simulado e obtido experimentalmente, para comparação. Na simulação, obteve-se um menor valor de $[Ca^{2+}]_i$ diastólica (140 vs. 230 nM), um maior tempo de subida (295 ms vs. 62 ms), e um maior $t_{1/2}$ de queda (104 ms vs. 87 ms). A amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ experimental e simulado foram semelhantes após modificação do valor de v_r originalmente proposto por Tang & Othmer (1994).

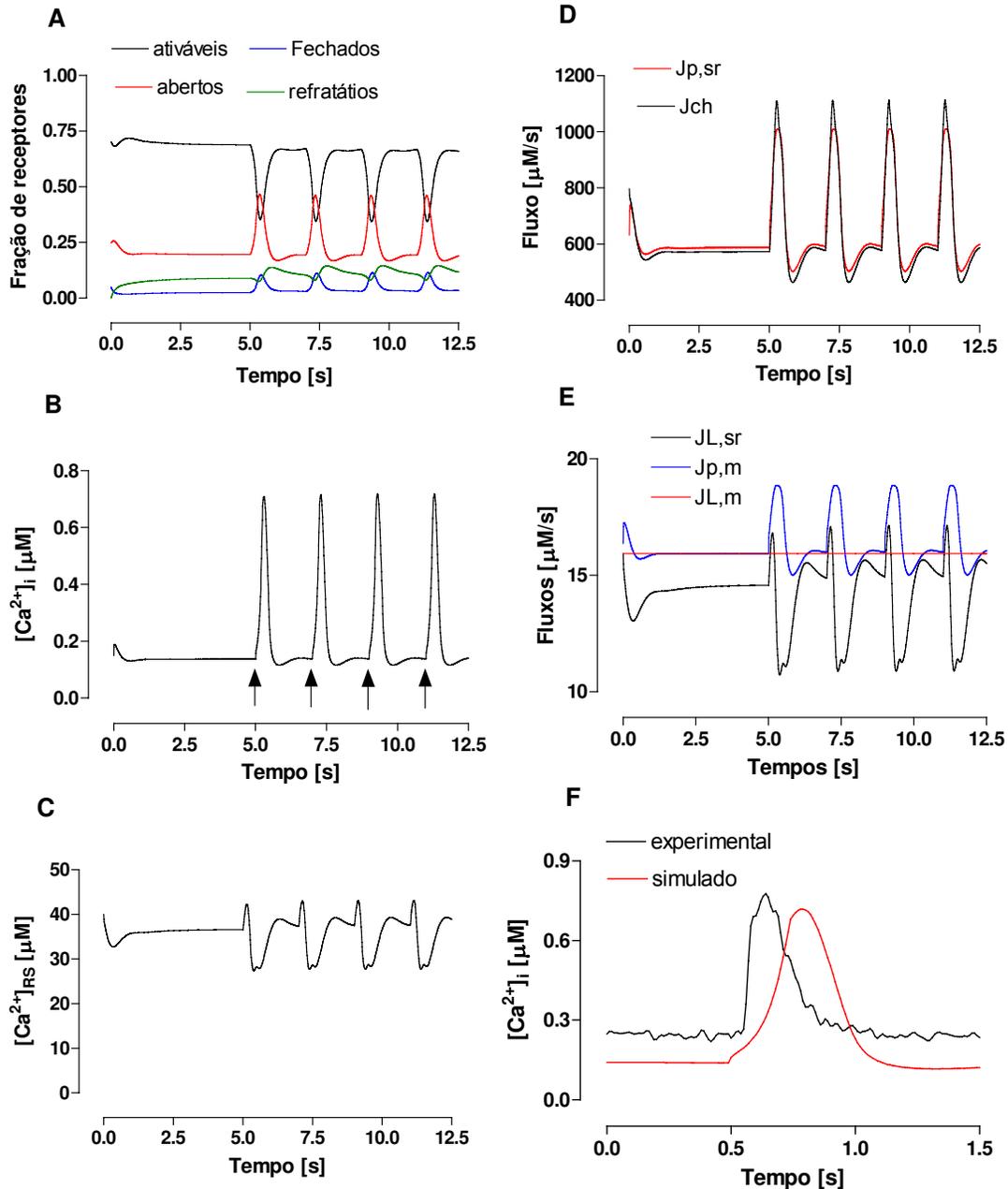


Figura 4.25: Os painéis A, B e C mostram respectivamente as variações da fração dos RyR em cada estado, de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) em resposta a degraus (indicados por setas no painel B) de Ca^{2+} com duração de 250 ms, aplicados a partir do instante $t = 5$ s a 0,5 Hz. O painel D mostra os fluxos de liberação (J_{ch}) e recaptação ($J_{\text{p,sr}}$), enquanto o painel E mostra os fluxos de vazamento ($J_{\text{L,m}}$), fluxo do conjunto troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($J_{\text{p,m}}$) e fluxo de vazamento do RS ($J_{\text{L,sr}}$). Os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtidos experimentalmente e o transiente simulado estão apresentados no painel F.

A Figura 4.26 mostra a simulação do efeito da cafeína sobre a dinâmica do transporte de Ca^{2+} no miócito cardíaco por aumento da afinidade dos RyRs por Ca^{2+} , o que favorece o estado aberto. Sob condições em que a concentração extracelular de Ca^{2+} foi anulada ($C_0 = 0$) e as vias de extrusão trans-sarcolema de Ca^{2+} foram consideradas inoperantes ($q_1 = 0$), o efeito da cafeína foi simulado por alteração das taxas de transição entre os estados dos RyRs, mantida entre os instantes $t = 5$ até 10 s. Observa-se no painel A que, de fato, a alteração dos parâmetros que regem a transição dos estados dos RyRs foi bem sucedida em manter um aumento sustentado da fração em estado aberto, o que conseqüentemente proporcionou um aumento sustentado de J_{Ch} e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (painéis D e B), acompanhado de queda da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ (painel C). O painel D revela um grande pico seguido de queda do fluxo de liberação, que foi depois mantido em nível mais baixo e equilibrado pela recaptção ($J_{p,sr}$), o que impediu a total depleção da carga de Ca^{2+} do RS. O painel E reflete a inoperância da via de efluxo através do sarcolema e mostra que o vazamento de Ca^{2+} do RS também cai devido à queda da carga. O painel F revela o pequeno vazamento passivo de Ca^{2+} transmembrana que contribui para o declínio do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a aplicação da cafeína.

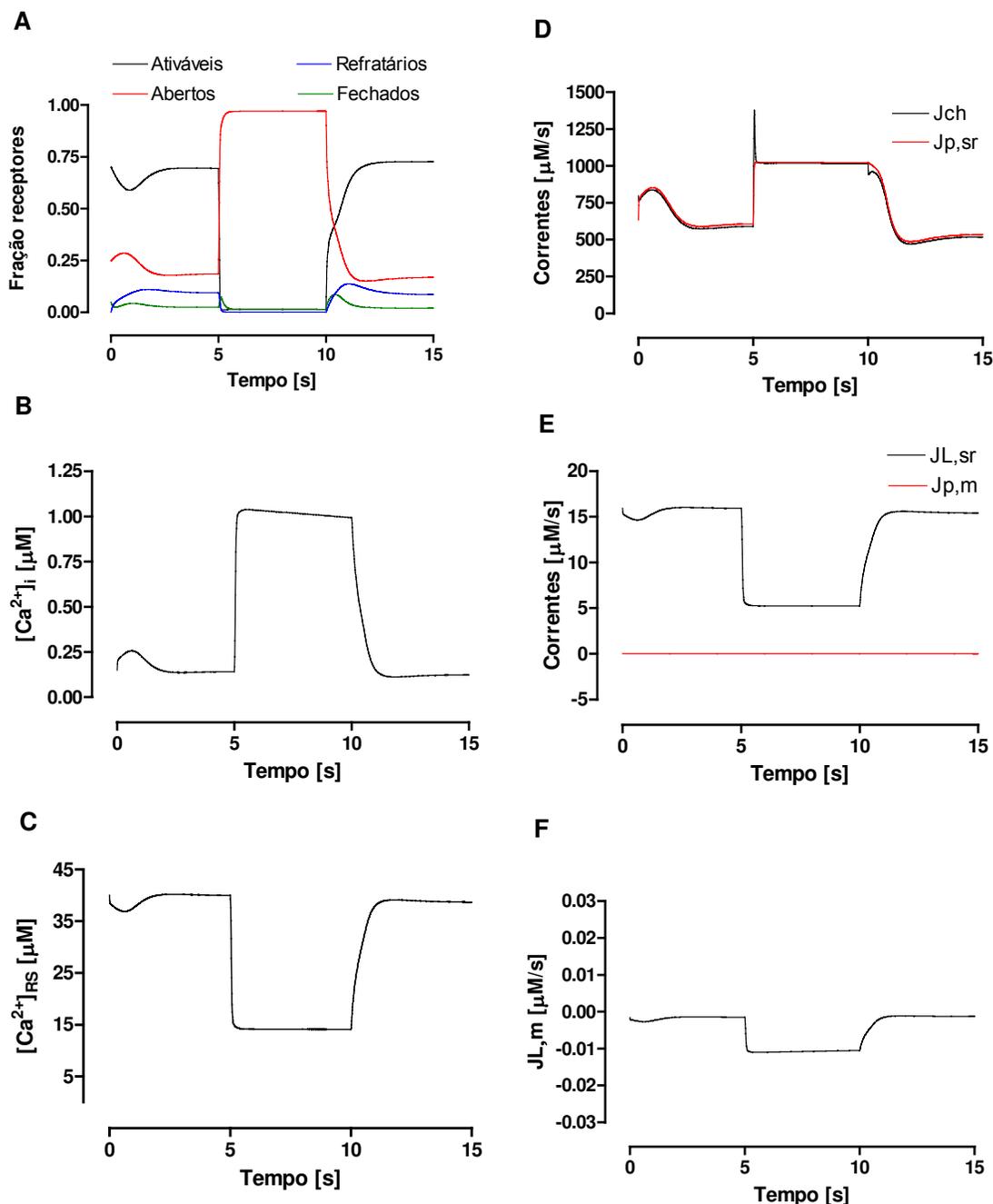


Figura 4.26: Simulação do efeito da cafeína (aplicada entre os instantes $t = 5$ a 10 s, quando a concentração de Ca^{2+} extracelular é anulada e o transportador de Ca^{2+} do sarcolema é tornado inoperante) sobre o curso temporal dos estados dos RyR (painel A), $[Ca^{2+}]_i$ (painel B), carga de Ca^{2+} do RS $[Ca^{2+}]_{RS}$ (painel C), fluxos de liberação (J_{ch}) e recaptção ($J_{p,sr}$) (painel D), fluxo de vazamento de Ca^{2+} do RS ($J_{L,sr}$) e fluxo do conjunto troca Na^+ / Ca^{2+} (NCX) e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($J_{p,m}$) (painel E), fluxo de vazamento de Ca^{2+} transmembrana ($J_{L,m}$) (painel F).

Observa-se em mais detalhe na Figura 4.27 que, apesar da diferença de amplitude, há semelhança do curso temporal dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ obtidos experimentalmente e por simulação durante aplicação prolongada de cafeína.

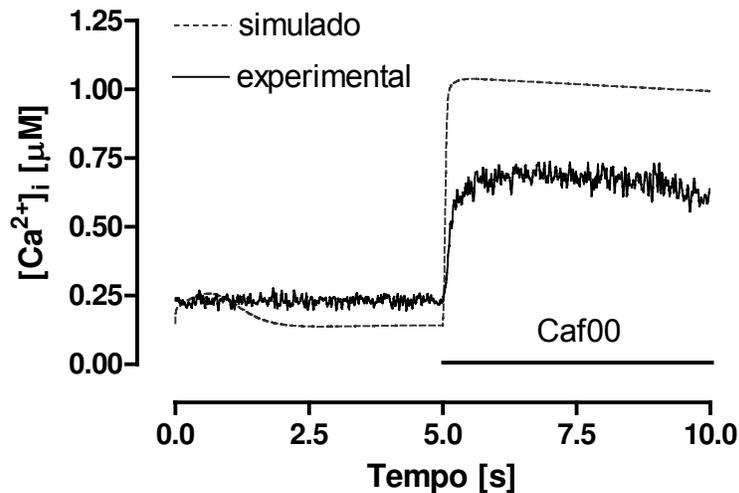


Figura 4.27: Aumento da $[Ca^{2+}]_i$ evocada pela aplicação prolongada de Caf00 entre os instantes $t = 5$ a 10 s. Estão apresentados os transientes obtido experimentalmente e por solução do modelo de Tang & Othmer (1994) após modificação descrita no texto.

A possibilidade de simulação do efeito da cafeína como uma alteração na afinidade dos RyRs ao Ca^{2+} no modelo teórico permitiu simular não só a resposta à aplicação mantida de Caf00 (Figura 4.27), mas também o modelo experimental proposto neste trabalho (Figura 4.28). Neste caso, pulsos rápidos de Caf00, com duração de 60 ms e intervalo entre pulsos de 7 s, foram capazes de evocar transientes de $[Ca^{2+}]_i$ de forma semelhante ao observado experimentalmente.

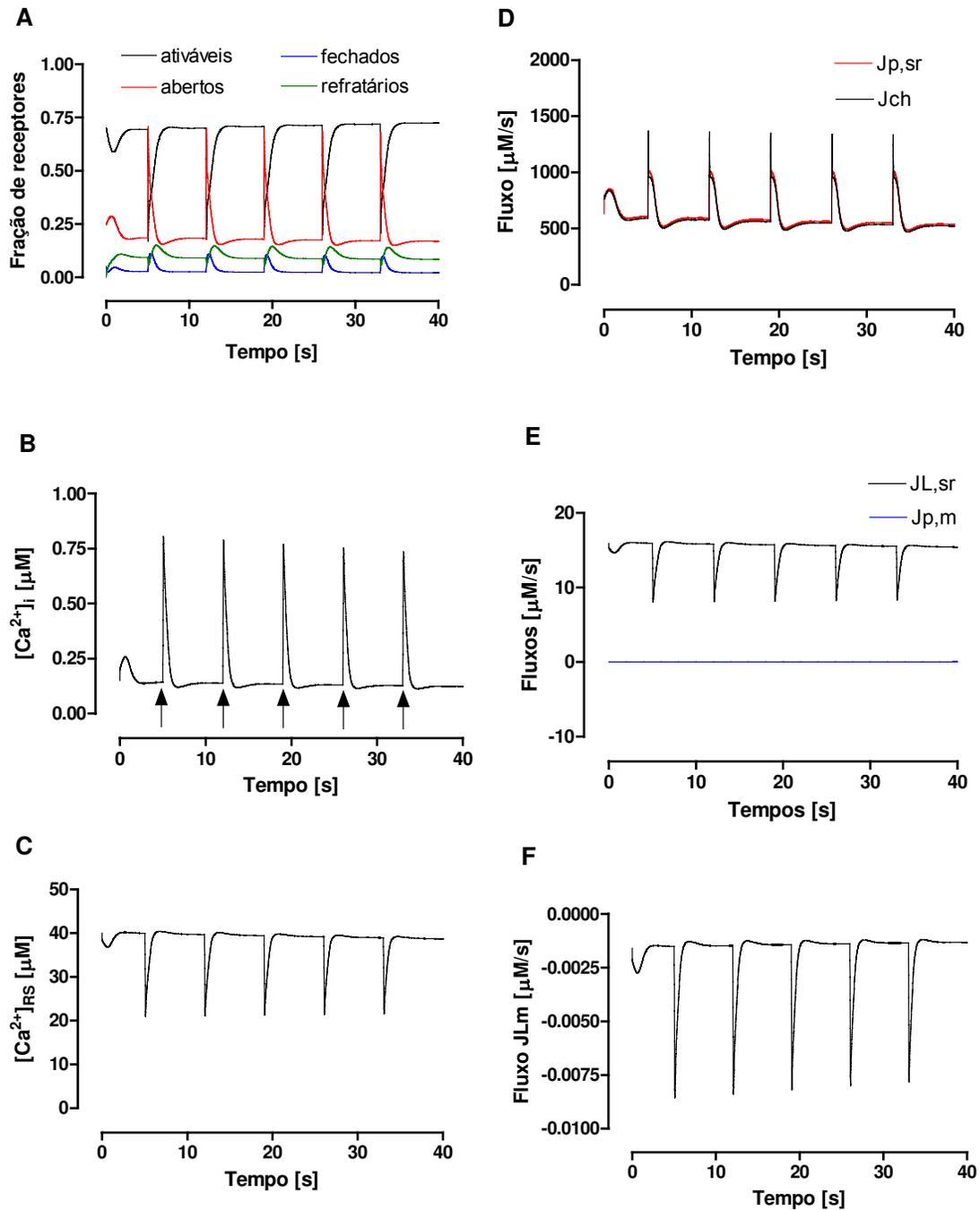


Figura 4.28: Simulação do efeito da aplicação de pulsos rápidos de CaF00 (duração de 60 ms com intervalo de 7s, representados por setas no painel B) sobre os estados dos RyRs (painel A), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (painel B), carga de Ca^{2+} do RS $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ (painel C), fluxos de liberação (J_{ch}) e recaptação ($J_{p,sr}$) (painel D), fluxo de vazamento de Ca^{2+} do RS ($J_{L,sr}$) e fluxo do conjunto troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($J_{p,m}$) (painel E), fluxo de vazamento de Ca^{2+} transmembrana ($J_{L,m}$) (painel F).

O traçado dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ obtido experimentalmente (Figura 4.29A), e por simulação (Figura 4.29B) do protocolo experimental proposto revela amplitudes razoavelmente semelhantes. O painel C mostra amplitudes de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) sobrepostos e normalizados pelas respectivas amplitudes de pico para o caso experimental e simulado. Observam-se diferentes tempos de subida (93 ms do simulado vs. 200 ms do experimental) e $t_{1/2}$ de queda (257 ms do simulado vs. 136 ms do experimental), do mesmo modo que o observado no caso de transientes disparados por influxo de Ca^{2+} (Figura 4.25F).

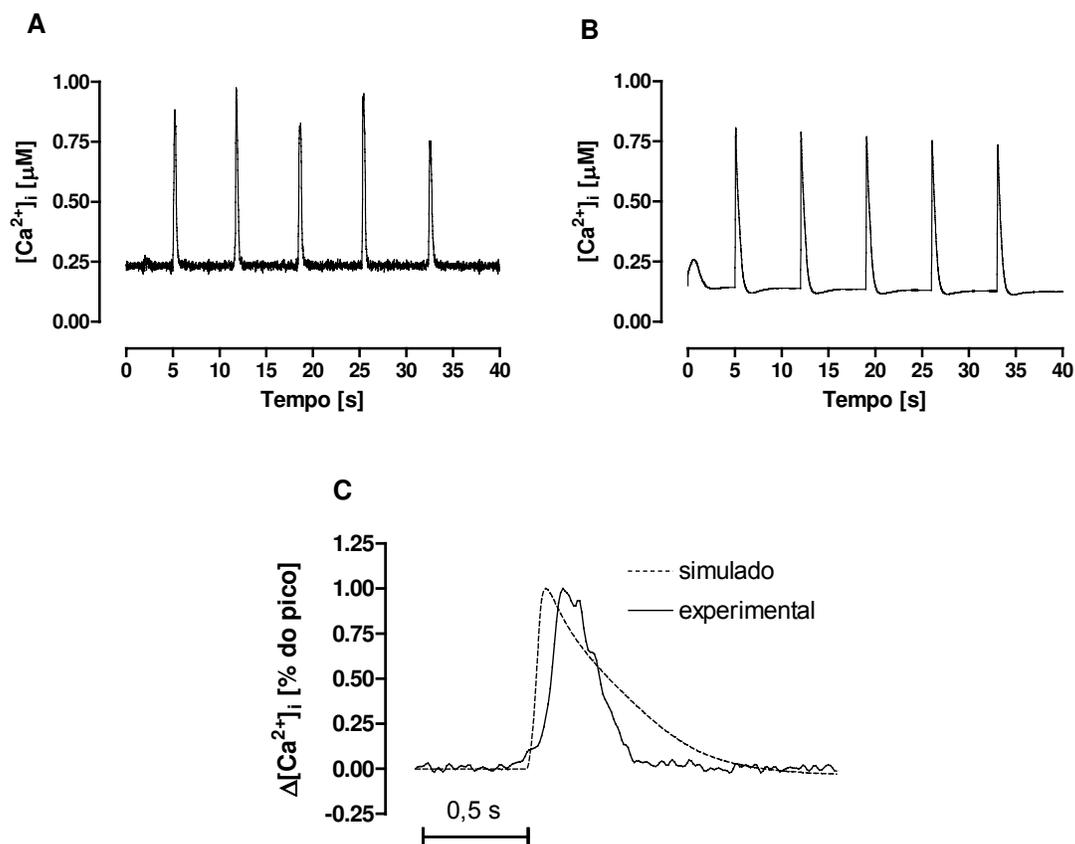


Figura 4.29: São mostrados o curso temporal dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ experimental (painel A), e simulado (painel B) evocados por pulsos rápidos de Caf00 de duração de 60 ms e intervalo de 7 s. O painel C mostra transientes de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) simulado e experimental sobrepostos e normalizados pelas respectivas amplitudes de pico. As formas de onda foram sincronizadas na subida dos transientes.

Uma vez que o modelo teórico foi bem sucedido em reproduzir de forma razoavelmente satisfatória os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por pulsos rápidos de cafeína, ele foi utilizado também para simular o efeito da estimulação e inibição da SERCA por alterações nos parâmetros cinéticos deste transportador. Trabalhos na literatura relatam que a estimulação beta-adrenérgica causa diminuição da concentração de Ca^{2+} na qual a velocidade máxima de captação é metade da máxima (K_m) da SERCA em vesículas isoladas de RS (Odermatt *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1995; 1996) e aumento da velocidade máxima de captação (V_{max}) também em vesículas isoladas de RS cardíaco (Sasaki *et al.*, 1992; Kargacin *et al.*, 1998) associados à estimulação beta-adrenérgica. Diante dos dados apresentados na literatura e das limitações na estabilidade do modelo teórico empregado, optou-se aqui por simular o efeito do ISO como uma diminuição de K_m em 20 % ($K_{m_{ISO}} = 100$ nM vs. $K_{m_{controle}} = 120$ nM) acompanhada de aumento de 10% na velocidade máxima de captação ($V_{max_{ISO}} = 1141$ μ M/s vs. $V_{max_{controle}} = 1038$ μ M/s).

No caso do tBQ, é sabido que há oclusão da SERCA, o que se espera que cause uma diminuição em V_{max} da bomba (Lloppis *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1992). No presente trabalho, este efeito foi simulado como uma redução de 10 % ($V_{max_{tBQ}} = 934$ μ M/s) neste parâmetro.

As alterações implementadas na condição ISO (Figura 4.30A) provocaram um deslocamento para a esquerda (diminuição de K_m) e para cima (aumento de V_{max}) na função que relaciona o fluxo de captação e a $[Ca^{2+}]_i$, implicando em maior fluxo para todos os valores de $[Ca^{2+}]_i$. No modelo, estas modificações resultaram em menor amplitude (redução 50 %) e menor $t_{1/2}$ de queda do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4.30B). Já na situação tBQ, somente a depressão da relação $J_{psr}-[Ca^{2+}]_i$ (diminuição de V_{max} , Figura 4.30A) levou a um aumento de amplitude do transiente (em 9 %) e de $t_{1/2}$ de queda.

Quando as $\Delta[Ca^{2+}]_i$ obtidas por simulação são normalizadas pelas respectivas concentrações de pico observa-se que as modificações dos parâmetros da bomba que resultaram em mais rápida queda de $[Ca^{2+}]_i$ (redução no $t_{1/2}$ de 26 %) no caso do ISO e a queda mais lenta (aumento de 13% no $t_{1/2}$) no caso do tBQ (Figura 4.30C), reproduzindo as alterações observadas experimentalmente nessas situações (Figura 4.30D).

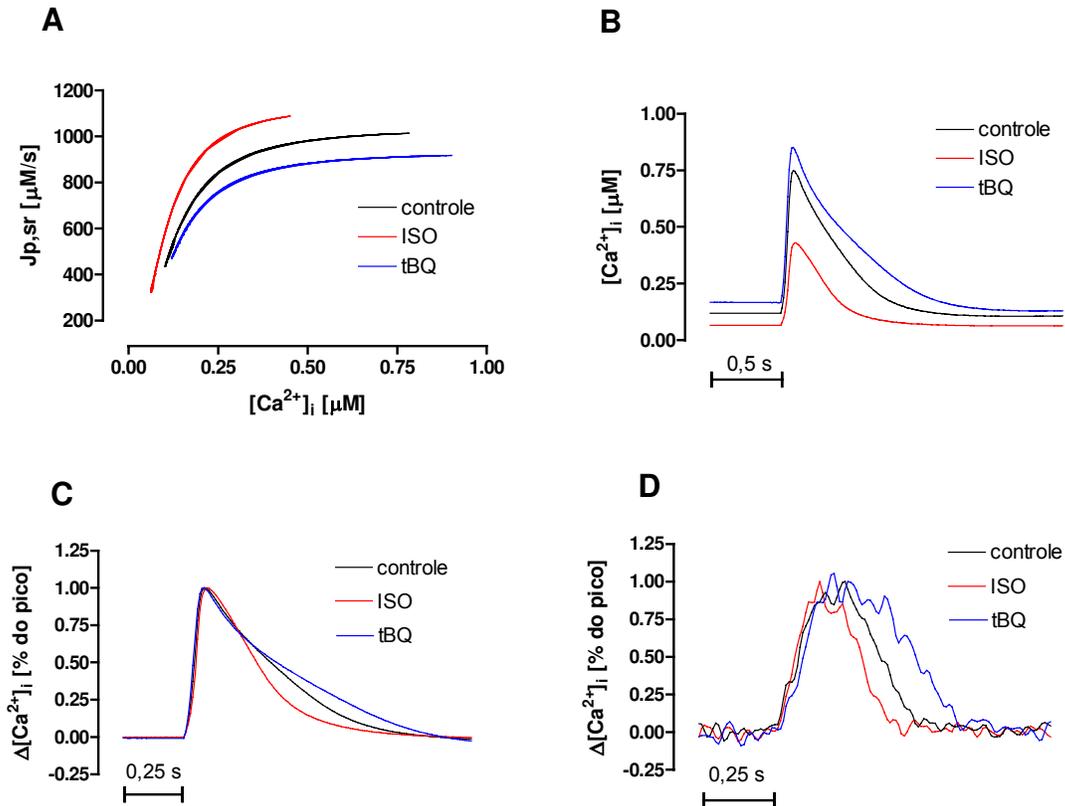


Figura 4.30: Efeito simulado das alterações no fluxo de captação de Ca^{2+} pela SERCA ($J_{p,sr}$) nas condições controle ($K_m = 120$ nM, $V_{max} = 1038$ $\mu\text{M/s}$), ISO ($K_m = 100$ nM, $V_{max} = 1141$ $\mu\text{M/s}$) e tBQ ($K_m = 120$ nM, $V_{max} = 934$ $\mu\text{M/s}$), (painel A), e curso temporal dos respectivos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocados pela aplicação de pulsos rápidos de cafeína obtidos (painel B). As amplitudes dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) obtidos nas simulações apresentadas no painel B foram normalizadas pelas respectivas concentrações citosólicas de pico ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_p$), (painel C), permitindo a comparação com traçados obtidos experimentalmente (painel D).

5. Discussão

5.1 Instrumentação

A montagem preliminar simulando a disposição dos dispositivos utilizados no protótipo foi de fundamental importância para assegurar a viabilidade do projeto. Inicialmente, a montagem foi utilizada para confirmar as distâncias determinadas segundo as relações apresentadas (equações 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4) para a óptica de excitação. As observações feitas a partir da montagem permitiram um refinamento na parte óptica e mecânica do projeto como um todo. Assim, informações sobre a quantidade de luz coletada, uniformidade do campo iluminado pela luz de excitação, qualidade da imagem obtida na câmera *CCD* e do sinal obtido pelo *PMT* foram imprescindíveis para a implementação da instrumentação. Do ponto de vista prático, isto se refletiu na introdução de partes móveis nos tubos de alumínio contendo as lentes do iluminador, inserção de manipuladores no protótipo desenvolvido para ajuste da inclinação dos espelhos dicróico e refletor de vermelho, cuidados na construção de um sistema mecanicamente estável e criação de um ambiente com luminosidade adequada para o bom desenvolvimento dos experimentos com células. A necessidade deste trabalho inicial para refinamento do projeto reside na escassez de dados precisos na literatura sobre a instrumentação para microscopia de fluorescência (Mccomark & Cobbold, 1991; Chen, 1995; Gomes, 1997). De modo geral, estes trabalhos apresentam boas descrições dos dispositivos a serem utilizados, mas com nível de detalhe insuficiente para a construção de instrumento, com exceção de Gomes (1997).

Uma das preocupações iniciais em relação ao protótipo desenvolvido era a estabilidade mecânica do sistema, uma vez que o reduzido campo visual de trabalho (60 x 80 μm) poderia ser sensível a pequenas oscilações provenientes em sua maior parte do sistema de refrigeração (ar condicionado) e dos refrigeradores das fontes de tensão. De fato, uma pequena instabilidade foi observada na montagem preliminar, na qual o cuidado com o isolamento mecânico do sistema não foi rigoroso. Diante deste problema e do elevado custo das bancadas antivibratórias comercialmente disponíveis (sistemas de microscopia de fluorescência possuem bancadas que chegam a custar US\$ 5.000,00), a solução adotada foi projetar e construir uma bancada robusta e de baixo custo (R\$ 600,00) para isolar mecanicamente o protótipo construído. Os resultados obtidos foram

satisfatórios, na medida em que não houve interferências mecânicas durante a realização dos experimentos.

O bloqueio da iluminação ambiente foi alcançado por meio de uma cortina opaca que delimitou a área de trabalho. Com isto, se conseguiu limitar o sinal basal de saída do *PMT* em 250 mV (Figura 4.7A, $t < 2s$), o que permitiu uma boa relação sinal-ruído (Figura 4.7B) e maior confiabilidade dos parâmetros extraídos das medições da emissão do fluo-3 (amplitude, e tempos de subida e de queda dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$).

Uma novidade apresentada neste projeto de instrumentação é a utilização de um *LED* azul de alta intensidade substituindo as lâmpadas de arco de mercúrio ou xenônio, entre outras fontes luminosas tipicamente utilizadas como fontes de energia radiante em microscopia de fluorescência. Os *LEDs* apresentam a vantagem de terem custo relativamente baixo, não produzem muito calor, e terem alta eficiência luminosa dentro da banda de excitação e tempo de vida longo (cerca de 11.000 horas; dados do fabricante, *Opto Technology Corp.*). A tecnologia de semicondutores para a construção de *LEDs* operando em comprimentos de onda menores do espectro visível (verde, azul e violeta) é relativamente nova e tem-se mostrado muito útil em substituir outras fontes luminosas em diversas aplicações na fotônica, especialmente dentro da Engenharia Biomédica (Hogan, 2007).

O sistema de microscopia/microfluorimetria desenvolvido não permite a troca de objetivas para a obtenção de diferentes aumentos, dada a complexidade de se implementar essa operação em um sistema de microscopia invertido e fechado. Assim, o campo visual foi definido respeitando um compromisso entre uma área de trabalho que permita certa facilidade na localização de células, e que, ao mesmo tempo, restrinja partículas fluorescentes próximas à célula, pois estas aumentam o sinal basal de fluorescência e reduzem a faixa de variação do sinal de saída do *PMT*. Embora a inserção de uma fenda controlável que limitasse a região de trabalho pudesse oferecer maior flexibilidade, isto não foi implementado, pois complicaria substancialmente a instrumentação a ser construída. Assim, a área do campo visual foi fixada em aproximadamente $60 \times 80 \mu m$, o que permitiu um sinal de fluorescência basal baixo (Figura 4.7B), sem tornar muito difícil a localização espacial dos miócitos.

Após fixação do campo visual, foi necessário garantir compatibilidade entre a imagem obtida na câmera *CCD* e o sinal de fluorescência que chega ao *PMT*. Tal procedimento foi realizado pela limitação da área sensível exposta do fotodetector, ajustando a abertura da fenda retangular disposta na frente do sensor, de tal forma que a

saída de uma microesfera fluorescente do campo visual implicasse no retorno ao sinal basal de saída do *PMT*. Este procedimento garantiu que a fluorescência de células fora do campo visual não interferisse nas medições realizadas.

A razão de fluorescência obtida (fluorescência de pico / fluorescência diastólica) durante a estimulação elétrica dos miócitos cardíacos foi aproximadamente 2, o que corresponde aos valores típicos encontrados na literatura por outros autores que utilizaram o mesmo indicador (Shannon *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006).

A boa qualidade do sinal de fluorescência registrado deve-se à potência radiante que chega à célula, estimada em aproximadamente 10 μW (apêndice B) e ao cuidado na execução do projeto em eliminar possíveis frestas, bem como fontes luminosas externas. Observou-se também que o sistema de microscopia foi capaz de produzir imagens de boa qualidade (i.e. sem distorções ópticas) de miócitos cardíacos, o que permitiu confiabilidade da medição do encurtamento celular pelo DBV a partir da imagem adquirida. A possibilidade de medição simultânea do curso temporal do encurtamento celular e da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permitiu estabelecer de forma mais clara a relação entre estas grandezas. Desta forma, pôde-se discriminar com clareza que o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ precede a atividade contrátil, o que está de acordo com seu papel de ativador da contração (Bers, 2001).

É importante observar que sistemas de microscopia de fluorescência comercialmente disponíveis têm custo de cerca de US\$ 80,000.00, enquanto o protótipo aqui desenvolvido (excluindo o microcomputador e *software* utilizado na aquisição dos dados), embora menos versátil, tenha tido um custo estimado em cerca de US\$ 5,000.00. A possibilidade de construção de um sistema de microscopia de fluorescência de baixo custo e de fácil manuseio pode tornar viável a aquisição deste tipo de equipamento por mais grupos de pesquisa de diferentes áreas. A medição de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é alvo de interesse de grupos que estudam células musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, neurônios, células glandulares, e outras, nas quais o íon Ca^{2+} desempenha importante papel nos processos fisiológicos (Berridge *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de instrumentação não se restringiu apenas ao protótipo de microscopia/microfluorimetria, mas também incluiu o sistema para troca rápida de soluções nas proximidades da célula para aplicação de cafeína. Este é um problema clássico de mecânica dos fluidos, dado o compromisso entre a alta velocidade de troca e a permanência da célula na câmara de perfusão. Encontram-se na literatura alguns trabalhos dedicados somente a solucionar este problema por meio de sistemas

sofisticados (Spitzer & Bridge, 1989; Heller *et al.*, 2003). Entretanto, esses sistemas podem apresentar alta complexidade, alto custo, difícil manuseio e baixa robustez. Mais uma vez, a instrumentação aqui apresentada visou facilidade de implementação e manuseio, além de baixo custo. A troca de solução foi feita por meio de uma válvula solenóide de rápido chaveamento, automatizada por um circuito oscilador que periodicamente abre e fecha a válvula de forma rigorosamente controlada. A solução de saída da válvula é levada até as proximidades da célula por uma micropipeta posicionada próxima à câmara de perfusão. O conjunto válvula-micropipeta foi fixado em um suporte mecânico que proporcionou estabilidade mecânica e fácil manuseio. A flexibilidade do circuito oscilador para ajustes no tempo de abertura e fechamento da válvula, bem como na definição do intervalo entre pulsos, foi fundamental durante as tentativas iniciais para definição do protocolo experimental.

5.2 Experimentos com células e modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA

5.2.1 Protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA

O modelo experimental proposto tem como objetivo permitir o estudo do fluxo de captação de Ca^{2+} do citosol para RS (mediado pela SERCA) após liberação controlada de Ca^{2+} desta organela. O modelo requer o isolamento destes compartimentos (citosol e RS), de modo que os fluxos de Ca^{2+} ocorram predominantemente entre eles. No caso do protocolo experimental adotado, a liberação de Ca^{2+} do RS foi induzida pela aplicação rápida e controlada de cafeína, e o isolamento dos compartimentos alcançado por meio da retirada do Ca^{2+} e do Na^+ extracelular.

Os pulsos de curta duração de Caf00 (aplicados quando a válvula foi aberta) durante a perfusão com Ty00 conseguiram induzir contrações fásicas em regime bem definido, sem o componente tônico que indica sensitização dos miofilamentos pela cafeína (Bassani *et al.*, 1994a; Bassani & Bassani, 2002). O tempo de aplicação de cafeína ($T_H = 60\text{ms}$) foi estabelecido por tentativa e erro, tomando como limitantes inferior e superior o tempo necessário para a indução de componentes fásico e tônico da contratura de cafeína, respectivamente. Uma baixa frequência de aplicação dos pulsos de Caf00 foi empregada para garantir a lavagem dessa substância da câmara de perfusão no intervalo entre pulsos. O ciclo de liberação e captação de Ca^{2+} induzido com a aplicação

de pulsos curtos de cafeína foi aparentemente estável, conforme confirmado por teste estatístico. O tempo de subida dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ evocados pela aplicação rápida de cafeína (203 ± 9 ms) foram compatíveis com os obtidos por Su *et al.* (2003) (que também utilizaram pulsos rápidos de cafeína) em miócitos ventriculares de humanos, cão, coelho e camundongo (220-240 ms).

Uma premissa importante do modelo experimental proposto é a conservação do Ca^{2+} intracelular, que foi verificada pela ausência de diferença significativa da carga de Ca^{2+} do RS antes e após a inserção do trem de pulsos de cafeína. Isto está de acordo com a proposta de que os transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e uniporter mitocondrial) não são capazes de competir com a SERCA na situação em que o NCX foi tornado inoperante (Bassani *et al.*, 1994a). A premissa de conservação do Ca^{2+} intracelular é fundamental para a manutenção do ciclo de liberação e captação, pois só assim pode-se considerar, dentro de certas aproximações, um sistema isolado composto de citosol e RS.

5.2.2 Efeitos do ISO e tBQ sobre transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e contrações evocadas por estimulação elétrica

Foi observado que o ISO, na concentração de 10 nM (concentração próxima da requerida para produção de uma resposta inotrópica igual a 50 % da máxima em miócitos ventriculares de rato, Carvalho *et al.*, 2006), praticamente dobrou a amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ e das contrações, além de abreviar a queda do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e o relaxamento em aproximadamente 25 %, na situação em que todos os transportadores estão operantes. Estes dados ilustram, respectivamente, os efeitos inotrópico e lusitrópico positivos da estimulação beta-adrenérgica. ISO provocou um pequeno, mas significativo aumento na $[Ca^{2+}]_{RS}$ (6%), o que possivelmente contribuiu para o aumento observado da amplitude dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$, uma vez que a carga e a corrente de entrada de Ca^{2+} são importantes reguladores da $\Delta[Ca^{2+}]_i$. Bassani *et al.*, (1995) mostraram que a quantidade de Ca^{2+} e fração do conteúdo liberadas do RS a cada contração variam de forma não-linear e dependente da $[Ca^{2+}]_{RS}$, e podem sofrer grandes variações com pequenas variações de carga, como também observado por Shannon *et al.*, (2000). É provável que este fenômeno se deva ao aumento da atividade de canais de liberação de Ca^{2+} do RS quando a carga é aumentada. Lukyanenko *et al.* (1996) observaram maior atividade de RyRs isolados e incorporados em bicamada lipídica quando a $[Ca^{2+}]$ foi aumentada no lado *trans* da membrana (equivalente ao compartimento

luminal), embora o real mecanismo pelo qual a carga modula a liberação ainda careça de esclarecimentos (Bers, 2001; Györke *et al.*, 2004).

Diversos estudos na literatura apontam o aumento da I_{Ca} e aumento da atividade da SERCA, via fosforilação do fosfolamban pela PKA, como os dois principais mecanismos para o aumento do inotropismo cardíaco pela estimulação beta-adrenérgica (McDonald *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000, Viatchenko-Karpinski & Györke, 2001; Ginsburg & Bers, 2004). Embora seja difícil quantificar a contribuição de cada um destes componentes de forma isolada, Luo *et al.*, (1994) mostraram significativa atenuação dos efeitos lusitrópico e inotrópico do ISO em corações de ratos geneticamente modificados que não expressavam o fosfolamban (*knockout*). Alterações semelhantes foram observadas na presença de anticorpo contra o fosfolamban (Sham *et al.*, 1991), o que é sugestivo de uma importante participação desta proteína na regulação da carga de Ca^{2+} . Outro conjunto de experimentos com camundongos *knockout* para o fosfolamban (Li *et al.*, 2000) também mostraram redução nos efeitos inotrópico e lusitrópico produzidos pela aplicação de 1 μ M de ISO, tanto em miócito isolado como em músculo cardíaco.

ISO também pode acelerar o relaxamento pela fosforilação de Tnl, o que reduz a afinidade dos miofilamentos por Ca^{2+} e facilita sua dissociação do filamento fino (Bers, 2001). Li *et al.* (2000) mostraram, em músculo de camundongos *knockout* para o fosfolamban, que a fosforilação da Tnl contribuiria apenas com 15 % da aceleração do relaxamento causada por ISO, e atribuíram ao fosfolamban a participação predominante no efeito lusitrópico positivo do agonista.

Os efeitos da estimulação beta-adrenérgica observados no presente estudo foram semelhantes aos relatados por outros grupos de pesquisa. Por exemplo, Ginsburg & Bers (2004) encontraram um aumento significativo na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e redução no tempo de queda em miócitos ventriculares de coelhos e camundongos após a aplicação de ISO. O mesmo foi observado por Llach *et al.* (2004) em miócitos atriais de truta. Aumento significativo na amplitude do encurtamento celular e no $t_{1/2}$ de relaxamento em miócitos ventriculares de rato e camundongo também foram reportados por Spurgeon *et al.* (1990) e Li *et al.* (2000), respectivamente.

Em contraposição ao ISO, também foi utilizado um fármaco que inibe a função do RS, o tBQ, bloqueador seletivo da SERCA (Wictome *et al.*, 1992). Observou-se que a aplicação de 5 μ M de tBQ reduziu $\Delta[Ca^{2+}]_i$ em 25% (não significativo) e aumentou significativamente o $t_{1/2}$ de queda em 74%, o que pôde ser observado mais claramente quando o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foi normalizado pelo pico e sobreposto com o transiente

controle. Este aumento no tempo para remoção do Ca^{2+} do citosol pode ser explicado pela diminuição na taxa de transporte de Ca^{2+} pela SERCA, uma vez que este fármaco oclui o transportador interferindo no seu ciclo de transporte (Nakamura *et al.*, 1992). A menor atividade da SERCA pode ter sido a responsável pela pequena, mas significativa queda na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, a qual, por sua vez, pode ter contribuído para a redução observada na $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. tBQ também causou diminuição significativa de 25% da ΔL e aumento do $t_{1/2}$ de relaxamento em 20 %.

Nakamura *et al.* (1992) reportaram a inibição da SERCA em vesículas de RS isoladas de músculo cardíaco de cão de forma dependente da concentração do tBQ, que, na concentração de 5 μM , reduziu a atividade da ATPase em 75%. Kabbara & Stepheson (1997), utilizando músculo permeabilizado do ventrículo de rato, mostraram que tBQ (50 μM) aumentou o $t_{1/2}$ de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em 144 %, o que foi acompanhado de uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ de 59% e aumento no tempo de relaxamento de 48 %. No entanto, apesar da expressiva queda na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, os autores não encontraram queda significativa na amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Westerblad & Allen (1994) observaram, em fibras isoladas de músculo esquelético de camundongo, rápida morte celular após a indução de tétano por estimulação elétrica depois de 5 minutos de exposição a 10 μM de tBQ. Aumento significativo dos tempos de queda do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de relaxamento também foi observado. Embora este fármaco ainda careça de melhor caracterização, especialmente em miócitos cardíacos isolados, os trabalhos encontrados na literatura reportaram aumento no tempo de permanência do Ca^{2+} no citosol, o que foi atribuído à diminuição na taxa de captação da SERCA devido à inibição provocada pelo tBQ.

5.2.3 Aplicação do protocolo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA e simulações computacionais.

As alterações provocadas pela aplicação de ISO e tBQ observadas durante estimulação elétrica não possibilitam inferência direta sobre o processo de captação de Ca^{2+} pela SERCA, pois estes fármacos têm (ISO) ou podem ter (tBQ) efeitos sobre outras vias de transporte de Ca^{2+} . As dificuldades de se estudar este transportador de forma isolada e próxima da situação fisiológica, bem como a sua grande relevância no processo contrátil, motivaram o desenvolvimento do protocolo experimental baseado em pulsos rápidos de cafeína, descrito na seção 3.12 e testado na seção 4.5.

Com este protocolo, foi possível detectar uma redução de 25% no $t_{1/2}$ de queda do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocado por cafeína após a aplicação de ISO, o que pode ser

explicado pelos mesmos mecanismos responsáveis pelo efeito lusitrópico positivo do agonista. A fosforilação do fosfolamban pela PKA remove o efeito deste inibidor endógeno da SERCA (Odermatt *et al.*, 1996, Kargacin *et al.*, 1998), aumentando a taxa de transporte de Ca^{2+} pela enzima, o que provavelmente contribuiu para a queda no $t_{1/2}$. Embora a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ após a aplicação de ISO tenha aumentado (pouco, mas significativamente), $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos transientes evocados por pulsos rápidos de cafeína foi pouco afetada, o que difere do observado durante a estimulação elétrica, quando todos os transportadores estavam operantes. O fato da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ não ter sido aumentada pelo ISO durante pulsos de cafeína pode ser relacionado com maior captação de Ca^{2+} pela SERCA durante a fase de subida do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, impedindo que este alcance picos maiores. É possível que este fator possa afetar mais fortemente o pico de transientes evocados por cafeína do que aqueles produzido por estimulação elétrica, pois o tempo de subida $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no primeiro tipo de transiente é praticamente o dobro daquele no segundo tipo.

No caso do tBQ, foi observado um aumento de 57% no $t_{1/2}$ de queda do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e redução (significativa) da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 15%. O aumento do tempo de permanência do Ca^{2+} no citosol deve-se provavelmente à menor atividade da SERCA na presença de tBQ. Já a queda na amplitude do transiente pode estar relacionada com a pequena depleção de Ca^{2+} do RS causada por este fármaco, embora, em contraposição, uma menor taxa de captação de Ca^{2+} pela SERCA pudesse permitir que o pico do transiente atingisse amplitudes maiores.

As diferenças na amplitude dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocados pelos pulsos rápidos de cafeína após a aplicação dos fármacos devem ser consideradas com cautela, uma vez que, além da influência da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ e da taxa de captação de Ca^{2+} pela SERCA, não se sabe até onde a aplicação de ISO ou tBQ pode alterar o processo de liberação. Valdivia *et al.*, (1995) e Marx *et al.*, (2000) mostraram, em experimentos com canais de liberação de Ca^{2+} do RS de músculo cardíaco em bicamadas lipídicas, um aumento da sensibilidade dos RyRs ao Ca^{2+} associada à sua fosforilação pela PKA, o que poderia aumentar a liberação deste íon após a aplicação de ISO. Existem evidências (Wehrens *et al.*, 2003) que a PKA pode interagir com a FKBP12.6 (uma proteína relacionada com a estabilidade dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS), provocando uma desestabilização do canal, o que pode aumentar o vazamento de Ca^{2+} dos RyRs em miócitos isolados, e portanto, alterar o processo de liberação. Entretanto, Ginsburg & Bers (2004) mostraram em miócitos cardíacos que, para uma mesma $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ e corrente de entrada de Ca^{2+} , ISO

não aumenta a liberação fracional de Ca^{2+} do RS em relação ao controle. No caso do tBQ, não há registro na literatura de alterações no processo de liberação. Deve-se observar que, no caso do protocolo experimental aqui adotado, a liberação foi induzida por cafeína e não por Ca^{2+} , o que torna ainda mais escassa as informações sobre alterações neste processo após a aplicação dos fármacos.

Mesmo dentro da abordagem reducionista adotada no presente modelo experimental para estudo da captação de Ca^{2+} pela SERCA, os efeitos das alterações nos parâmetros cinéticos deste transportador podem ter implicações longe de serem óbvias, dadas a complexidade do sistema e os diversos mecanismos reguladores envolvidos. Visando o melhor entendimento e enriquecimento da discussão dos dados experimentais observados, buscou-se na literatura um modelo computacional simples e passível de adaptação para descrever o modelo experimental desenvolvido. O modelo teórico que melhor atendeu a estes requisitos foi o de Tang & Othmer (1994), que se caracteriza por descrever apenas a dinâmica do transporte de Ca^{2+} , ignorando as propriedades elétricas de membrana e sua complexa relação com os diversos transportadores iônicos. Esta abordagem mostrou-se extremamente conveniente, uma vez que, no protocolo experimental proposto, a membrana é mantida em repouso elétrico e não há corrente de entrada de Ca^{2+} . Portanto, as adaptações adotadas limitaram-se a anulação da concentração extracelular de Ca^{2+} ($C_0 = 0$) e da função do conjunto NCX e ATPase de Ca^{2+} do sarcolema ($q_1 = 0$), bem como inserção do efeito da cafeína. Sabe-se que este composto aumenta a sensibilidade dos RyRs ao Ca^{2+} , causando liberação do íon mesmo na manutenção de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica (100-200 nM), (Rousseau & Meissner, 1989; O'Neill *et al.*, 1990b; Sitsapesan & Williams, 1990). Este efeito foi implementado no modelo teórico como uma abrupta alteração nas taxas de ligação e dissociação de Ca^{2+} dos RyRs de modo a favorecer a permanência do canal no estado aberto durante o tempo de aplicação da cafeína, ou seja, aumentando a probabilidade de transição dos estados ativável e fechado para aberto, e diminuindo a probabilidade de transições no sentido inverso. Esta estratégia para simular o efeito da cafeína já foi utilizada por Shannon *et al.* (2005) em um modelo computacional distinto e bem mais complexo. Tanto no caso das simulações desenvolvidas nesta dissertação, como no trabalho de Shannon *et al.* (2005), o simples aumento da afinidade dos RyRs por Ca^{2+} foi bem sucedido em reproduzir o efeito da cafeína em liberar Ca^{2+} do RS.

Observou-se inicialmente a resposta do modelo de Tang & Othmer (1994) a degraus de Ca^{2+} correspondentes a influxo via canais de Ca^{2+} do sarcolema. Foi possível

gerar, com o modelo, transientes de $[Ca^{2+}]_i$ com amplitudes e curso temporal razoavelmente compatíveis com os obtidos experimentalmente por estimulação elétrica, na situação em que todos os transportadores estavam operantes. Deve-se observar, no entanto, que o tempo de subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no caso simulado foi bem maior do que o observado experimentalmente. Esta diferença reside na competição entre os fluxos de captação de Ca^{2+} para o RS ($J_{p,sr}$) e liberação de Ca^{2+} desta organela (J_{ch}). Quando um pulso de Ca^{2+} é aplicado, observa-se inicialmente um aumento da $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Figura 4.25C), devido ao fato da captação ter uma resposta mais rápida que a liberação (Figura 4.25D). Assim, a elevação de $[Ca^{2+}]_i$ só procede a uma taxa maior quando a J_{ch} torna-se maior que J_{psr} . Outro fator que pode contribuir para uma subida mais lenta do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ é a ausência de um compartimento subsarcolêmico, como encontrado em modelos teóricos mais complexos e completos na literatura (Jafri *et al.*, 1998), reproduzindo um “acoplamento” espacial entre canais de entrada de Ca^{2+} do sarcolema e canais de liberação de Ca^{2+} do RS. O espaço subsarcolêmico proporcionaria este “acoplamento” devido ao seu reduzido volume, o que resultaria em concentrações elevadas de Ca^{2+} (entre 10 e 30 μM , aproximadamente, Jafri *et al.*, 1998) para rápida ativação dos RyRs, mesmo que I_{Ca} seja relativamente pequena. Este fator parece desempenhar um papel importante na cinética de $[Ca^{2+}]_i$, pois simulações com degraus de entrada com maior amplitude produziram transientes com tempo de subida menores (Tang & Othmer, 1994).

As formas de onda obtidas em resposta à aplicação mantida de cafeína (resposta ao degrau) e pulsos rápidos de cafeína (resposta impulsiva) mostraram-se razoavelmente compatíveis com os dados experimentais. As principais diferenças residem no maior tempo de queda e menor tempo de subida dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ obtidos na simulação da aplicação rápida de cafeína. O menor tempo de subida nesta simulação (oposto do encontrado no caso dos degraus de Ca^{2+}) pode estar relacionado à ativação imediata dos RyR, enquanto no caso experimental o tempo de difusão deste composto até a célula e através da membrana celular pode contribuir para que a subida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ seja mais lenta (O'Neill *et al.*, 1990a; Su *et al.*, 2003).

A possibilidade de simulação de pulsos rápidos de cafeína em um sistema que, dentro de certas aproximações, pode ser utilizado para descrever o modelo experimental proposto permitiu estudar os efeitos de alterações nos parâmetros cinéticos da SERCA correspondentes à ação do ISO e tBQ, e comparar estes resultados com os obtidos experimentalmente.

No caso dos parâmetros alterados pela estimulação beta-adrenérgica, Reddy *et al.* (1995, 1996) mostraram que a adição de fosfolamban recombinante a vesículas de RS nas quais havia sido incorporada SERCA purificada causou significativo aumento de Km, sem efeito sobre a velocidade máxima (Vmax) de captação de Ca²⁺. Odermatt *et al.* (1996) também relataram uma diminuição de 45% do Km sem efeito em Vmax do transporte em vesículas privadas de fosfolamban, ou após aplicação de anticorpo seletivo contra esta proteína. Entretanto, Kargacin *et al.* (1998) encontraram uma diminuição de Km de 32% e aumento de Vmax de 40% em vesículas isoladas de SR cardíaco após fosforilação do fosfolamban pela PKA. Outra importante contribuição foi feita por Sasaki *et al.* (1992), que identificaram uma seqüência de aminoácidos do fosfolamban (em vesículas restituídas de RS contendo SERCA reconstituída) responsável pela regulação apenas de Km (localizada no domínio transmembrana do RS), e outra seqüência responsável pela regulação apenas de Vmax (localizada no domínio citoplasmático). Estes autores também mostraram que os efeitos inibitórios do fosfolamban sobre a SERCA são removidos após fosforilação catalisada pela PKA, o que indica não só que ambos os parâmetros cinéticos da enzima parecem estar sujeitos à regulação pelo fosfolamban, como também que a regulação de cada parâmetro envolve a interação de diferentes regiões da molécula do PLB com SERCA.

A simples redução de Km para simular o efeito do ISO com o modelo de Tang & Othmer adaptado não foi capaz de reproduzir a aceleração da queda do [Ca²⁺]_i observada experimentalmente, e provocou pequena redução de amplitude. Já a redução de 20% do Km acompanhada de um aumento de 10% da Vmax da SERCA produziu uma redução no t_{1/2} de queda semelhante a encontrada nos experimentos (26 % vs. 25 %, respectivamente). Já a queda de amplitude foi muito mais expressiva na simulação (50% vs. 10% nos experimentos), o que pode estar relacionado com um efeito compensatório desempenhado pelo aumento da [Ca²⁺]_{RS} (e maior liberação de Ca²⁺) na presença de ISO obtido experimentalmente, efeito este que não foi incorporado ao modelo teórico. Fica evidente na simulação que o aumento da captação de Ca²⁺ pela SERCA teve grande efeito durante a subida do transiente de [Ca²⁺]_i, enquanto a aceleração durante a fase de queda produziu uma redução proporcional ao observado experimentalmente no t_{1/2}.

No caso do tBQ, Nakamura *et al.* (1992) mostraram uma redução de 50% na Vmax da SERCA em vesículas isoladas de RS de músculo esquelético de coelho após a aplicação de 2 µM deste fármaco, enquanto não foi encontrada evidência na literatura de alteração de Km. A simulação do efeito deste fármaco pela redução de 10 % da Vmax da

SERCA resultou em um aumento de 9 % em $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (vs. queda de 15 % observada experimentalmente) e aumento de 13 % no $t_{1/2}$ (vs. aumento de 57 % observado experimentalmente). A diferença entre simulação e experimentação na amplitude pode ter sido parcialmente provocada pela deficiência do modelo em reproduzir as diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. Uma maior redução na V_{max} da SERCA na busca de um aumento mais próximo do obtido experimentalmente para o $t_{1/2}$ do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi impossibilitada pelo comprometimento da estabilidade do modelo.

Pode-se afirmar que as simulações apresentam razoável semelhança qualitativa com dados experimentais da cinética de remoção do Ca^{2+} do citosol, tanto no caso do ISO como do tBQ. Também foi observado um papel fundamental da atividade da SERCA na determinação da amplitude, o que pode explicar a redução na $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ observada após a aplicação de ISO. Já no caso do tBQ, a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ pode ter tido um papel fundamental na queda observada experimentalmente na amplitude, o que não pôde ser reproduzido pelo modelo teórico.

É importante lembrar que, embora o modelo teórico seja uma ferramenta interessante para o entendimento dos dados experimentais, ele assume simplificações drásticas na descrição de um mecanismo fisiológico complexo, o que faz com que as simulações devam ser analisadas com cautela. Entre as limitações do modelo de Tang & Othmer (1994), deve-se apontar a ausência de sítios de ligação passiva de Ca^{2+} no interior do RS, simulando o papel desempenhado pela calsequestrina. Esta proteína é um importante regulador da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, ligando-se ao Ca^{2+} no interior do RS e sofrendo alterações conformacionais que podem influenciar o processo de liberação (Zhang *et al.*, 1997; Györke *et al.*, 2004). Experimentalmente, foi observado que a superexpressão de aproximadamente 10x de calsequestrina no coração de camundongos provocou a redução da amplitude de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em 65% (Jones *et al.*, 1998). Estes resultados mostram que, embora o mecanismo de regulação de carga pela calsequestrina seja desconhecido, alterações funcionais significativas são observadas quando propriedades deste sítio passivo são modificadas, e sua inserção no modelo teórico poderia ter grande relevância, conforme mostrado por Shannon *et al.* (2005).

Outra limitação do modelo teórico de Tang & Othmer (1994) é a falta de menção da procedência dos valores escolhidos para os parâmetros. Vários destes valores diferem dos parâmetros adequados para ratos, que foi a espécie utilizada nos experimentos aqui realizados. Por exemplo, os valores de K_m e V_{max} utilizados originalmente por Tang & Othmer (1994) são, respectivamente, 3 vezes menor e 4 vezes maior do que o sugerido

por Bers (2001) para ratos. Entretanto, deve-se observar que estes valores variam bastante nos diversos trabalhos encontrados na literatura, conforme apontado por este último autor. A adequação rigorosa destes parâmetros (com exceção da implementada em v_r) não foi realizada, pois isto exigiria uma readaptação complexa do modelo, o que foge dos objetivos deste trabalho.

A dinâmica do transporte de Ca^{2+} em miócitos cardíacos é algo extremamente complexo, o que torna difícil determinar quantitativamente o papel desempenhado por um transportador específico. A SERCA é um transportador de extrema relevância para o acoplamento excitação-contração e relaxamento, e qualquer procedimento relativamente simples que permita avaliar a sua atividade, mesmo que de forma indireta (no presente caso, pelo tempo de remoção de Ca^{2+} do citosol), torna-se uma importante ferramenta de estudo. Existem poucas maneiras de se ter acesso à função da SERCA do RS em células intactas. Os métodos existentes, alguns desenvolvidos por esta equipe (Bassani *et al.*, 1992; 1994a; Bassani *et al.*, 1995; Bassani & Bassani, 2003), requerem intenso trabalho laboratorial e processamento de dados. Assim, o modelo experimental aqui proposto apresenta-se como uma alternativa a ser empregada para estudar a ação de diversos compostos sobre a SERCA, ou mesmo alterações provocadas neste transportador em condições especiais, como modelos de doenças e animais transgênicos. Uma vantagem importante do método é o efeito reversível da cafeína, o que possibilita que a captação de Ca^{2+} do RS seja estudada na mesma célula antes e depois da aplicação de um determinado composto, permitindo a utilização de testes estatísticos pareados. O método também utiliza células intactas e, portanto, possui a vantagem da permanência de mecanismos fisiológicos que são perdidos, por exemplo, quando se estuda vesículas isoladas da organela (Reddy *et al.*, 1995; Odermatt *et al.*, 1996; Kargacin *et al.*, 1998), ou mesmo durante perfusão intracelular em experimentos de *patch-clamp* (Llach *et al.*, 2004).

6. Conclusão

No presente trabalho foi desenvolvido um protótipo de microscopia/microfluorimetria que permitiu quantificar a $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular de forma simultânea, com boa relação sinal-ruído e baixo custo. Também foi desenvolvida instrumentação específica para realizar trocas rápidas de soluções próximas a células isoladas. Os equipamentos foram aplicados para estudar o papel da ATPase de Ca^{2+} do RS na captação de Ca^{2+} do citosol por meio de um modelo experimental que simplifica a dinâmica do transporte de Ca^{2+} . O protocolo experimental desenvolvido foi sensível o bastante para detectar a diminuição do tempo de permanência do Ca^{2+} no citosol após estimulação beta-adrenérgica com ISO, bem como aumento deste tempo pela inibição da enzima com tBQ, o que foi consistente com o mecanismo de ação destes fármacos. O procedimento proposto apresenta-se como uma alternativa a ser empregada para estudar a ação de diversos compostos sobre a SERCA, ou mesmo, alterações neste transportador em condições patológicas ou após manipulações genéticas. As vantagens do método são a possibilidade de seu uso em células intactas, e de realizar medições em uma mesma célula antes e depois da adição de fármacos. Além da abordagem experimental, buscou-se na literatura um modelo teórico simples, e passível de adaptação para descrever matematicamente a situação experimental proposta. As simulações com alterações nos parâmetros cinéticos da SERCA (conforme sugerida na literatura para os fármacos utilizados) foram razoavelmente bem sucedidas em reproduzir os dados experimentais do tempo de remoção do Ca^{2+} do citosol, embora discrepâncias na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ tenham sido observadas. Estas diferenças sugerem a necessidade de adequação do modelo teórico empregado.

7. Referências Bibliográficas

Art J. Photon Detectors for confocal microscopy. In: Pawley PB (Editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2nd Ed. Plenum Press, New York, 1995. 632 p.

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, 265: 533-540, 1993.

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology*, 476: 279-293, 1994a.

Bassani JWM, Yuan W, Bers DM. Fractional RS Ca release is regulated by trigger Ca and RS Ca content in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*, 268: C1313-1329, 1995.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca transport can reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 453: 591-608, 1992.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *Journal of Physiology*, 476: 295-308, 1994b.

Bassani RA, Bers DM. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest potentiation of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26: 1335-1347, 1994.

Bassani RA, Bers DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal* 68: 2015-2022, 1995.

Bassani RA, Shannon TR, Bers DM. Passive Ca^{2+} binding in ventricular myocardium of neonatal and adult rats. *Cell Calcium*, 23: 433-442, 1998.

Bassani RA, Bassani JWM. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *American Journal of Physiology*, 282: H2406-H2413, 2002.

Bassani RA, Bassani, JWM. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchange to ventricular myocyte relaxation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 1717-23, 2003.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews*, 1: 11-21, 2000.

Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 2001. 427 p.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415: 198-205, 2002.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79: 763-854, 1999.

Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews*, 51: 651-681, 1999.

Carvalho BMR, Bassani RA, Franchini KG, Bassani JWM. Enhanced Calcium Mobilization in Rat Ventricular Myocytes During the Onset of Pressure Overload-Induced Hypertrophy. *American Journal of Physiology*, 291: H1803-H1813, 2006.

Chen V. Non-laser light sources. In: Pawley PB (Editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2nd Ed. Plenum Press, New York, 1995. 632 p.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262: 740-744, 1993.

Clarke DM, Mauryama K, Loo TW, Leberer E, Inesi G, MacLennan DH. Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine, and asparagine mutations in the stalk sector of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 11246-11251, 1989a.

Clarke DM, Loo TW, Inesi G, MacLennan DH. Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 339: 476-478, 1989b.

Cortassa S, Aon MA, O'Rourke B, Jacques R, Tseng HJ, Marban E, Winslow RL. A computational model integrating electrophysiology, contractions, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophysical Journal*, 91: 1564-1589, 2006.

Díaz ME, Graham HK, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium*, 38: 391-396, 2005.

Eisner DA, Díaz ME, Li Y, O'Neill SC, Trafford AW. Stability and instability of regulation of intracellular calcium. *Experimental Physiology*, 90: 3-12, 2004.

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

Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca²⁺ load and Ca²⁺ current trigger. *Journal of Physiology*, 556: 463-480, 2004.

Gomes PAP. *Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de [Ca²⁺] e limiar de estimulação*. Tese de doutorado, Depto. de Eng. Biomédica, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

Gomes PAP, Bassani RA, Bassani JWM. Measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. *Cell Calcium*, 24: 17-26, 1998.

Guerini D, Garcia-Martin E, Zecca A, Guidi F, Carafoli, E. The calcium pump of the plasma membrane: Membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression. *Acta Physiologica Scandinavica*, 163: 265-273, 1998.

Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophysical Journal*, 86: 2121-2128, 2004.

Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM. Resting myoplasmatic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophysical Journal*, 65: 865-881, 1993.

Heller LJ, Mohrman DE, Smith JA, Wallace KB. Multitrack system for superfusing isolated cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*: 284, H1872-H1878, 2003.

Hogan H. LEDs Have a Bright Future in Biomedical Instruments. *Biophotonics International*, 14(3): 36-40, 2007.

Horowitz P, Hill W. *The art of electronics*. 2nd Ed. The Cambridge Press, New York, 1989. 1125 p.

Huang J, Xu L, Thomas M, Whitaker K, Hove-Madsen L, Tibbits GF. L-type Ca^{2+} channel function and expression in neonatal rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, 290: H2267-2276, 2006.

Hussain M, Orchard CH. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content, L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transient in rat myocytes during β -adrenergic stimulation. *Journal of Physiology*, 505: 385-402, 1997.

Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164: 1356-1366, 1969.

Jafri MS, Rice JJ, Winslow RL. Cardiac Ca^{2+} Dynamics: The Roles of Ryanodine Receptor Adaptation and Sarcoplasmic Reticulum Load. *Biophysical Journal*, 74: 1149-1168, 1998.

Jekins FA, White HE. *Fundamentals of Optics*. McGraw-Hill Book Co., Singapura 1985. 746 p.

Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleeman L, Morad M. Regulation of Ca²⁺ Signaling in Transgenic Mouse Cardiac Myocytes Overexpressing Calsequestrin. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 1385-1393, 1998.

Kabbara AA, Stephenson DG. Effects of 2,5-di-*tert*-butylhydroquinone on rat cardiac muscle contractility. *American Journal of Physiology*, 272: H1001-1010, 1997.

Kargacin ME, Ali Z, Kargacin GJ. Anti-phospholamban and protein kinase A alter the Ca²⁺ sensitivity and maximum velocity of Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 331: 245-249, 1998.

Keizer L, Levine L. Ryanodine receptor adaptation and Ca²⁺ induced Ca²⁺ release-dependent Ca²⁺ oscillations. *Biophysical Journal*, 71: 3477-3487, 1996.

Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Research*, 79: 1059-1063, 1996.

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers, DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology*, 278: H769-H779, 2000.

Llach A, Huang J, Sederat F, Tort L, Tibbits G, Hove-Madsen L. Effects of β -adrenergic stimulation on the relationship between membrane potential, intracellular [Ca²⁺] and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in rainbow trout atrial myocytes. *Journal of Experimental Biology*: 207, 1369-1377, 2004.

Llopis J, Chow SB, Kass GEN, Gahm A, Orrenius S. Comparison between the effects of the microsomal Ca²⁺-translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di-(*t*-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes. *Biochemical Journal*, 277: 553-556, 1991.

Lukyanenko VI, Györke I, Györke S. Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 432: 1047-1054, 1996.

Luo C, Rudy Y. A Dynamic Model of the Cardiac Ventricular Action Potential. *Circulation Research*, 74: 1071-1096, 1994.

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman D, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of β -agonist stimulation. *Circulation Research*, 75: 401-409, 1994.

MacLennan DH, Clarke DM, Loo TW, Skerjanc IS. Site-directed mutagenesis of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Physiologica Scandinavica*, 607: 141-150, 1992.

MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasma reticulum ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 28815-28818, 1997.

MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews*, 4: 566-577, 2003.

Marx OS, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayraman T, Burkhoff D, Rosembit N. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from calcium release channels: defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-376, 2000.

Mccormack JG, Cobbold PH. *Cellular Calcium – A Practical Approach*. Oxford University Press, 1991. 448 p.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation end modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 74: 365-507, 1994.

Moore GA, McConkey DJ, Kass GEN, O'Brien PJ, Orrenius S. 2,5-Di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone – a novel inhibitor of liver microsomal Ca^{2+} sequestration. *FEBS Letters*, 224: 331-336, 1987.

Nakamura H, Nakasaki Y, Matsuda N, Shigekawa M. Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase by 2,5-Di(*Tert*-Butyl)-1,4-Benzohydroquinone. *Journal of Biochemistry*, 112: 750-755, 1992.

Odermatt A, Kurzydowski K, MacLennan DH. The V_{max} of the Ca^{2+} -ATPase of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum (SERCA2a) Is Not Altered by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Phosphorylation or by Interaction with Phospholamban. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 14206-14213, 1996.

O'Neill SC, Donoso P, Eisner DA. The role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]$ sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{caffeine}]_i$. *Journal of Physiology*, 425: 55-70, 1990a.

O'Neill SC, Eisner DA. A mechanism for the effects of caffeine on Ca^{2+} release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 430: 519-536, 1990b.

Page E, McCallister LP, Power B. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68: 1465-1466, 1971.

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na/Ca exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circulation Research*, 85:1009-1019, 1999.

Puglisi JL, Wang F, Bers DM. Modeling the isolated cardiac myocyte. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 85: 163-178, 2004.

Reddy LG, Jones LR, Carla SE, O'Brian JJ, Tatulian SA, Stokes DL. Functional reconstitution of recombinant Phospholamban with rabbit skeletal Ca^{2+} ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 9390-9397, 1995.

Reddy LG, Jones LR, Pace RC, Stokes DL. Purified reconstituted cardiac Ca^{2+} ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 14964-14970, 1996.

Rousseau E, Meissner G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel: activation by caffeine. *American Journal of Physiology*, 256: H328-H333, 1989.

Sasaki T, Inui M, Kimura Y, Kuzuya T, Tada M. Molecular Mechanism of Regulation of Ca^{2+} Pump ATPase by Phospholamban in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 1674-1679, 1992.

Sham JSK, Jones LR, Morad M. Phospholamban mediates the β -adrenergic-enhanced Ca uptake in mammalian ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, 261: H1344-H1349, 1991.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Potentiation of Fractional Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release by Total and Free Intra-Sarcoplasmic Reticulum Calcium Concentration. *Biophysical Journal*, 78: 334-343, 2000.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca^{2+} leak-load relationship. *Circulation Research*, 91: 594-600, 2002.

Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A Mathematical Treatment of Integrated Ca Dynamics within the Ventricular Myocyte. *Biophysical Journal*, 87: 3351-3371, 2004.

Shannon TR, Wang F, Bers DM. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca release by luminal $[\text{Ca}]$ and altered gating assessed with a mathematical model. *Biophysical Journal*, 89: 4096-4110, 2005.

Simmerman HKB, Jones LR. Phospholamban: Protein Structure, Mechanism of Action, and Role in Cardiac Function. *Physiological Reviews*, 78: 921-947, 1998.

Sitsapesan R, Williams AJ. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, 423: 425-439, 1990.

Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ. Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 68: 2588-2600, 1995.

Spitzer KW, Bridge JHB. A simple device for rapidly exchanging solution surrounding a single cardiac cell. *American Journal Physiology*, 256: C441-C447, 1989.

Spurgeon HA, Stern MD, Baartz G, Raffaelli S, Hansford RG, Talo A, Lakatta EG, Capogrossi MC. Simultaneous measurements of Ca^{2+} , contraction, and potential in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*, 258: H574-H586, 1990.

Stern MD, Song LS, Cheng H, Sham JS, Yang HT, Boheler KR, Rios E. Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. A possible role for allosteric interactions between ryanodine receptors. *Journal of General Physiology*, 113: 469-489, 1999.

Su Z, Li F, Spitzer KW, Yao A, Ritter M, Barry WH. Comparison of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function in human, dog, rabbit, and mouse ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35: 761-767, 2003.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman, B. Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews*, 79: 1089-1125, 1999.

Tang Y, Othmer HG. A model of Calcium Dynamics in Cardiac Myocytes Based on the Kinetics of Ryanodine-Sensitive Calcium Channels. *Biophysical Journal*, 67: 2223-2235, 1994.

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GCR, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: Modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. *Science*, 267: 1997-2000, 1995.

Vennetucci LA, Trafford AW, Eisner DA. Increasing Ryanodine Receptor Open Probability Alone Does not Produce Arrhythmogenic Calcium Waves: Threshold Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Is Required. *Circulation Research*, 100: 105–111, 2007

Viatchenko-Karpinski S, Györke S. Modulation of the Ca^{2+} induced Ca^{2+} release cascade by β -adrenergic stimulation in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 533: 837-848, 2001.

Wehrens XH, Lenart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosin S, Song LS, Rosemblyt N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercised-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-840, 2003.

Westerblad H, Allen DG. The role of sarcoplasmic reticulum in relaxation of mouse muscle; effects of 2,5-di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Journal of Physiology*, 474: 291-301, 1994.

Wictome M, Michelangeli F, Lee AG, East JM. The inhibitors thapsigargin and 2,5-di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone favor the E2 form of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases. *FEBS Letters*, 304: 109-113, 1992.

Wilson J, Hawkes JFB. *Optoelectronics, An Introduction*. Prentice-Hall International Inc., New Jersey, 1983. 445 p.

Zahradníková A, Zahradník. A Minimal Gating Model for the Cardiac Calcium Release Channel. *Biophysical Journal*, 71: 2996-3012, 1996.

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional

sarcoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 23389-23397, 1997.

Zhou Z, Matlib MA, Bers, DM. Cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 507: 379-403, 1998.

Apêndice A – Introdução à fluorescência

A fluorescência é um fenômeno molecular decorrente da absorção de um fóton por um átomo, modificando sua configuração energética devido à energia transferida no processo. A tendência natural que se segue ao estado excitado do átomo (maior energia) é relaxar para uma distribuição eletrônica menos energética. Esse fenômeno pode ocorrer de várias formas segundo níveis discretos de energia (Rendell, 1987).

Uma das formas de relaxamento é por meio da luminescência, na qual o átomo em seu estado excitado acaba por emitir fótons para promover a sua redistribuição eletrônica. A luminescência pode ser subdividida em fluorescência e fosforescência, pois ambos os fenômenos fazem referência à emissão de fótons como forma de relaxamento. A fluorescência é um tipo de transição em que o átomo libera um fóton em uma transição quântica rápida da ordem de 10^{-12} s. Trata-se de uma transição entre estados de mesmo número quântico de spin.

Já a fosforescência consiste em uma transição lenta que pode durar de 10^{-4} a 10^2 s, pois envolve uma transição desfavorável, uma vez que essa ocorre entre números quânticos de spin diferentes (Rendell, 1987).

Deve-se observar que a molécula não possui apenas estados eletrônicos, mas também estados energéticos relacionados com sua rotação e vibração. Os estados energéticos de uma molécula podem ser descritos pelo Diagrama de Jablonski. Segundo essa descrição, pode-se afirmar que a radiação emitida pelo átomo não será exatamente aquela absorvida anteriormente pelo mesmo. Observa-se no Diagrama de Jablonski (Figura A.1) a existência do estado fundamental (S_0), os estados excitados singletes (S_1 e S_2) e o estado tripleto (T_1). Quando uma molécula absorve um fóton de energia igual ao produto $h\nu_a$ (h é a constante de Planck e ν é a frequência da onda eletromagnética), ela atinge um dos estados singletes, seguido por acomodações energéticas vibracionais e rotacionais sem a emissão de radiação. A partir desse estado a molécula pode relaxar para o estado fundamental S_0 emitindo um fóton com menor energia, produzindo o fenômeno da fluorescência. Um caminho alternativo para esta molécula seria seguir para o estado energético tripleto T_1 , a partir do qual podem ocorrer transições quânticas não permitidas resultando em fosforescência.

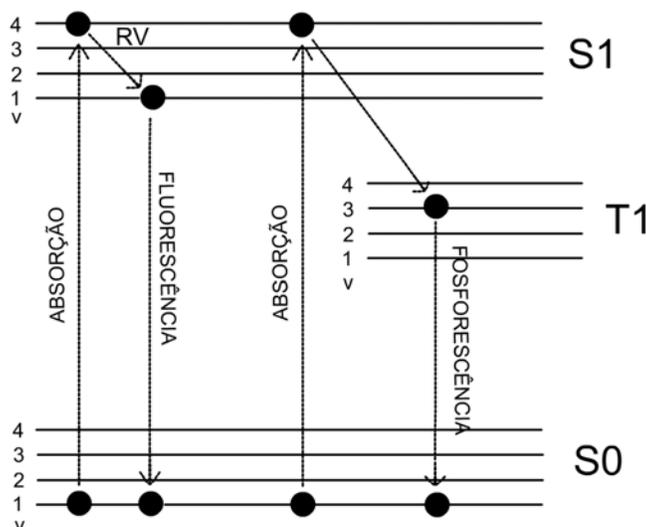


Figura A.1: Descrição dos estados energéticos assumidos pelas moléculas responsáveis pela fluorescência por meio do diagrama de Jablonski. RV - transições decorrentes de acomodações vibracionais e rotacionais. Modificado de Rendell, 1987.

As transições de retorno que ocorrem dos estados singletes para o fundamental apresentam uma menor diferença de energia, implicando em emissões de maior comprimento de onda, uma vez que:

$$\Delta E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (\text{A.1})$$

onde ΔE é a diferença de energia entre os estados relacionados na transição; h é a constante de Planck; c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética.

A este deslocamento entre o espectro de absorção e emissão dá-se o nome de deslocamento de Stokes (Figura A.2).

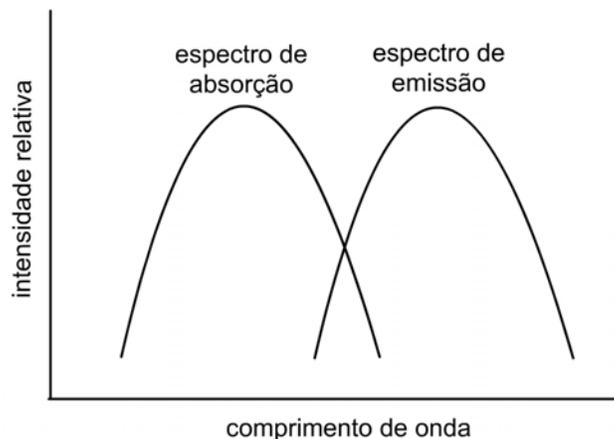


Figura A.2: desenho ilustrativo representando o deslocamento de Stokes. Devido à perda de energia nos processos de transição, o comprimento de onda de emissão é maior que o de absorção.

As transições energéticas representadas pelo Diagrama de Jablonski podem ou não emitir fótons na passagem do estado excitado para o fundamental. Esta probabilidade de emissão é denominada *Quantum Yield* (Q). Este parâmetro é numericamente igual ao número de fótons emitidos dividido pelo número de fótons absorvidos pela amostra.

A potência radiante em W / m^2 emitida por uma amostra depende da potência radiante absorvida. A absorvância ou densidade óptica é definida por, Lakowicz, 1991:

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_0}{P} \right) \quad (A.2)$$

onde P_0 é a potência radiante incidente e P a potência radiante que atravessa uma camada de solução absorvente de espessura infinitesimal (Figura A.3). A taxa de decaimento da potência radiante (dP') para esse processo é dada por:

$$dP' = -\beta \cdot P' \cdot c \cdot dx \quad (A.3)$$

onde P' é a potência radiante que incide na solução de espessura infinitesimal, β é uma constante de proporcionalidade, c é a concentração da espécie absorvente e dx é a espessura da seção.

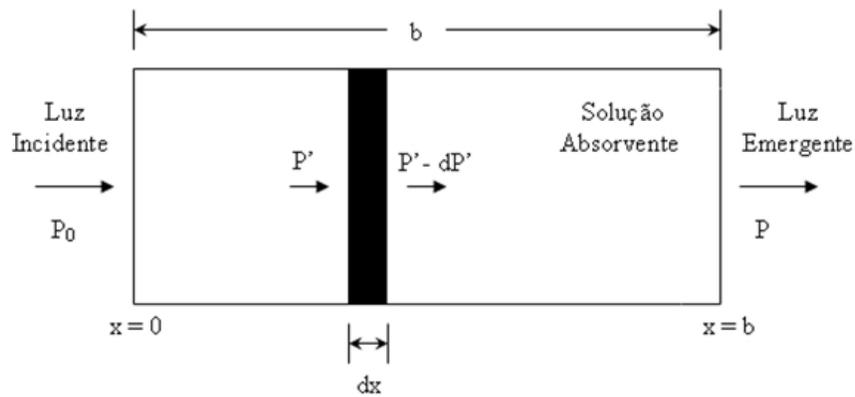


Figura A.3: Absorção da potência radiante ao longo de uma solução absorvente.

A equação (A.3) pode ser colocada na seguinte forma:

$$-\frac{dP'}{P'} = \beta \cdot c \cdot dx \quad (\text{A.4})$$

integrando membro a membro:

$$\begin{aligned} - \int_{P_0}^P \frac{dP'}{P'} &= \beta \cdot c \cdot \int_0^b dx \\ - \ln P - (- \ln P_0) &= \beta \cdot c \cdot b \\ \ln \left(\frac{P_0}{P} \right) &= \beta \cdot c \cdot b \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

onde que b representa a espessura total da espécie absorvente. Agora, por meio da transformação:

$$\ln z = \ln 10 \cdot \log_{10} z$$

tem-se então a seguinte expressão:

$$\log_{10}\left(\frac{P_0}{P}\right) = \frac{\beta}{\ln 10} \cdot c \cdot b \quad (\text{A.6})$$

Como o primeiro membro é definido como a própria absorvância da equação A.2, tem-se finalmente a lei Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (\text{A.7})$$

onde a grandeza ε é chamada de coeficiente de extinção [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]. O produto $\varepsilon \cdot c \cdot b$ é adimensional. O coeficiente de extinção é a característica da substância que representa a quantidade de luz absorvida em um determinado comprimento de onda.

A lei de Beer fornece um substrato sólido para o tratamento físico e matemático referente à potência radiante absorvida, entretanto, no fenômeno de fluorescência a emissão apresenta níveis menores de energia nas transições eletrônicas envolvidas, sendo a eficiência do processo introduzida por meio da grandeza quantum yield, Q.

Assim, para se obter a probabilidade de emissão dentro de um intervalo λ e $\lambda + d\lambda$, deve-se normalizar o espectro de emissão (curva Intensidade vs. comprimento de onda) de forma que sua integral seja numericamente igual a Q. A partir da normalização feita e da banda passante definida, pode-se chegar ao fator pelo qual a energia absorvida deve ser multiplicada para se obter a energia emitida pela amostra.

Por meio da expressão A.6 e A.7 pode-se analisar quanto da energia radiante é absorvida pela amostra. Reescrevendo a expressão:

$$\begin{aligned} \log_{10}\left(\frac{P_0}{P}\right) &= \varepsilon \cdot c \cdot b = -\log_{10}\left(\frac{P}{P_0}\right) \\ \frac{P}{P_0} &= 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot b} \\ P &= P_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot b} \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

Considerando a absorção pequena, pode-se fazer uma aproximação por série de Taylor, (Gomes, 1997):

$$P \approx P_0 \cdot (1 - \varepsilon \cdot c \cdot b) \quad (\text{A.9})$$

Assim, a energia radiante absorvida (P_{ab}) é dada por:

$$P_{ab} \approx P_0 - P = P_0 - P_0 + P_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b = P_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (\text{A.10})$$

Acrescenta-se agora a eficiência do processo, ou seja, o quantum yield, fornecendo a seguinte expressão para a energia radiante emitida (P_{em}):

$$P_{em} = P_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b \cdot Q \quad (\text{A.11})$$

A energia radiante emitida pode ser colocada em função do comprimento de onda λ substituindo o quantum yield por $I(\lambda) \cdot d\lambda$ referente à porção do espectro relacionado com a banda passante $d\lambda$:

$$P_{em} = P_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b \cdot I(\lambda) \cdot d\lambda \quad (\text{A.12})$$

Logo, a partir das equações (A.11 e A.12), evidenciam-se as variáveis relevantes no processo de emissão da fluorescência. Conclui-se do trabalho matemático aqui apresentado que a fluorescência a ser detectada é diretamente proporcional à energia radiante que chega à amostra emitida pela fonte de excitação. O coeficiente de extinção e o *quantum yield* são características intrínsecas do indicador, e de extrema relevância no processo, o que pode influenciar de forma substancial na escolha do indicador a ser utilizado. A concentração do indicador também tem influência direta no sinal de fluorescência obtido e pode interferir no processo de medição (Takahashi *et al.*, 1999). As características da célula também influenciam na emissão de fluorescência, pois a sua espessura é dos fatores determinantes da expressão A.12.

O desenvolvimento dos indicadores de fluorescência nos anos 80 permitiu uma nova abordagem ao estudo da dinâmica das variações intracelulares de íons (Grynkiewicz *et al.*, 1985). O procedimento para medir $[Ca^{2+}]_i$ a partir de indicadores de fluorescência consiste no carregamento da célula com o indicador, excitação do composto, detecção do sinal de fluorescência e conversão para $[Ca^{2+}]_i$. Um grande volume de informação a respeito desta técnica de medição pode ser encontrado na literatura (Kao, 1994; Takahashi *et al.*, 1999). Existem dois tipos de indicadores: os ratiométricos e os não ratiométricos.

Os indicadores ratiométricos apresentam como principal característica a emissão de fluorescência em dois comprimentos de onda distintos. A razão entre os sinais adquiridos permite eliminar as interferências que ocorrem em ambos os comprimentos de onda. Assim, o método contorna a perda de sinal pelo desbotamento (*photobleaching*) do indicador (Song *et al.*, 1995), e vazamento para o meio extracelular (Gomes *et al.*, 1998). Entretanto, indicadores ratiométricos exigem uma instrumentação mais sofisticada para a detecção de fluorescência. Esta maior complexidade implica na utilização de mais de um foto-detector e mais filtros ópticos para sua implementação, o que pode aumentar os custos envolvidos. Entre os indicadores ratiométricos mais populares encontra-se o indo-1 e o Fura-2.

Indicadores não ratiométricos apresentam como característica a emissão de fluorescência em apenas um comprimento de onda, permitindo portanto, sistemas de medição mais simples em relação aos indicadores ratiométricos, o que tem impacto direto na redução dos custos e na facilidade de implementação. No entanto, a possibilidade de eliminar interferências (*photobleaching* e vazamento) ficam inviabilizadas neste caso.

O indicador escolhido para as medições realizadas nesta dissertação foi o fluo-3 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, E.U.A.). Este indicador não ratiométrico apresenta como característica um grande aumento na fluorescência medida quando o íon Ca^{2+} liga-se a sua molécula, o que permite a obtenção de sinais com boa relação sinal-ruído, e portanto, maior confiabilidade nos parâmetros extraídos a partir dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ registrados. A banda de excitação do indicador vai de 450 a 510 nm, enquanto a banda de emissão está compreendida entre 520 a 590 nm. As características químicas e as reações que dão origem ao indicador podem ser encontradas em Minta *et al.*, 1989 e Kao *et al.*, 1989. A Tabela A.1 mostra as características relevantes do fluo-3.

Tabela A.1: Características do indicador fluorescente fluo-3. São apresentados a constante de dissociação K_d (estimada *in vitro*), os comprimentos de onda de máxima absorção e emissão, o coeficiente de extinção (ϵ) máximo e em 488 nm, o quantum yield (Q) e a razão entre a fluorescência emitida no estado ligado e livre ($F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$). Dados do fabricante Molecular Probes.

Propriedade	Fluo-3
K_d (Ca^{2+})	325 nM
λ de absorção máximo	506 nm
ϵ máximo (Ca^{2+} ligado)	$100000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
ϵ (Ca^{2+} ligado) em $\lambda = 488\text{nm}$	$43000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
λ de emissão máxima	526 nm
Q	0.15
($F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$)	> 100

A Figura A.4 mostra como a fluorescência emitida pelo indicador aumenta segundo a concentração de Ca^{2+} do meio, o que também é dependente do comprimento de onda. Este espectro de emissão foi determinado *in vitro* utilizando $10 \mu\text{M}$ do indicador na sua forma ácida (dados do fabricante).

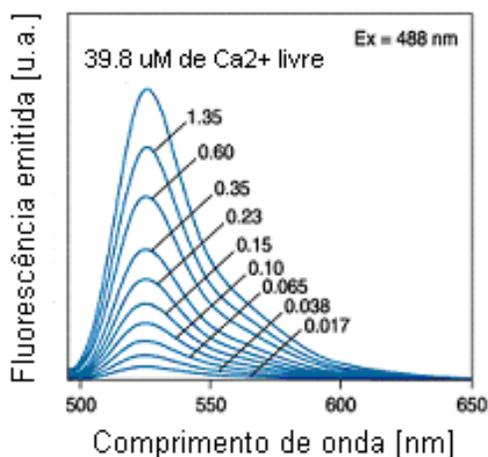


Figura A.4: Espectro de emissão do indicador fluorescente fluo-3 (10 μM) na sua forma ácida para diferentes concentrações de Ca^{2+} . Dado do fabricante Molecular Probes.

Referências Bibliográficas

Gomes PAP. *Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de $[\text{Ca}^{+2}]$ e limiar de estimulação*. Tese de doutorado, Depto. de Eng. Biomédica, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

Gomes PAP, Bassani RA, Bassani JWM. Measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. *Cell Calcium*, 24: 17-26, 1998.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 3440-3450, 1985.

Kao JPY, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 8179-8184, 1989.

Kao JPY. Practical aspects of measuring $[Ca^{2+}]$ with fluorescent indicators. In: Nuccitelli, R (Editor). *Methods in cell biology: A practical guide to the study of calcium in living cells*, vol. 40. San Diego: Academic Press, Inc, 1994. 386 p.

Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd Ed. Springer, New-York, 2006. 954 p.

Minta A, Kao JPY, Tsien RY. Fluorescence indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 8171-8178, 1989.

Rendell D. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York, 1987. 419 p.

Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ. Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 68: 2588-2600, 1995.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman, B. Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews*, 79: 1089-1125, 1999.

Apêndice B – Fotômetro e estimativa da potência radiante de excitação

A fim de quantificar a potência radiante que chega até a amostra biológica, um fotômetro utilizando um fotodiodo de Silício (mod. OPT 101, Burr-Brown, Tucson, AZ, E.U.A.) foi construído. O circuito para obtenção de um sinal de tensão proporcional à potência radiante que chega à amostra pode ser visualizado na Figura B.1. A Figura B.2 mostra a relação entre potência radiante e o sinal de tensão obtido a partir da medição (manual do fabricante, Burr-Brown). A sensibilidade do sensor é dada pelo parâmetro R_f (Figura B.2), cujo padrão é $1 \text{ M}\Omega$. A sensibilidade pode ser ajustada por um circuito externo ao fotodiodo conforme apresentado na Figura B.1. Quando a chave CH1 é fechada, o resistor R1 é colocado em paralelo com a resistência interna de $1 \text{ M}\Omega$, o que corresponderia na curva da Figura B.2 ao deslocamento de $R_f = 1 \text{ M}\Omega$ para aproximadamente $R_f = 50 \text{ k}\Omega$, o que seria adequado para medir potências radiantes maiores.

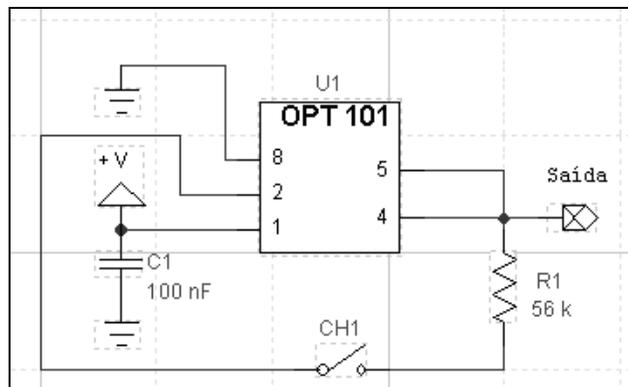


Figura B.1: Circuito do fotômetro para mediação da potência óptica que chega até a célula.

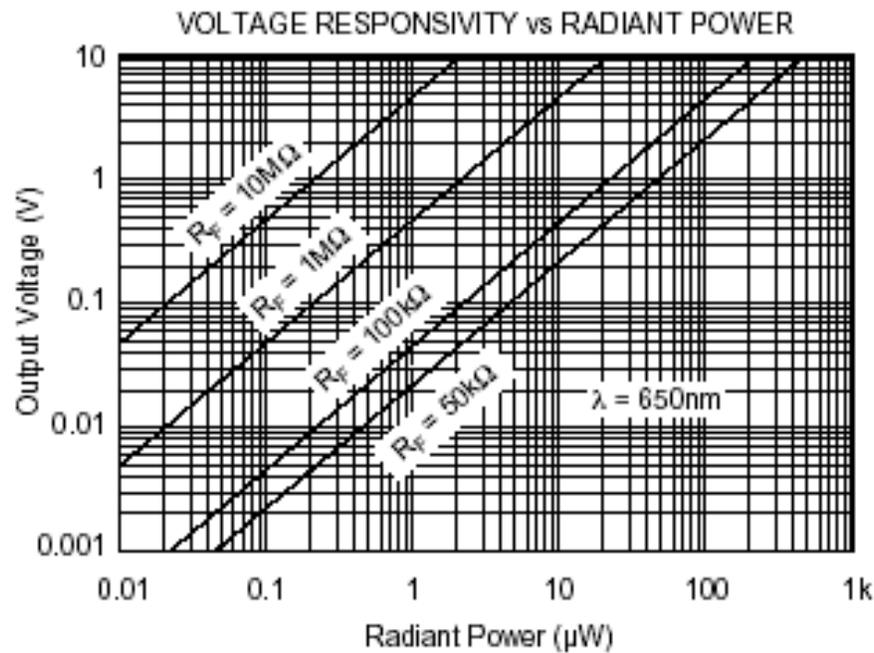


Figura B.2: Responsividade do foto diodo de Si OPT 101. Dados do fabricante (Burr-Brown, Tucson, AZ, E.U.A.).

Deve-se observar que a responsividade mostrada na Figura B.2 foi levantada para o comprimento de onda do vermelho ($\lambda = 650\text{ nm}$), enquanto a luz de excitação no caso da instrumentação desenvolvida encontra-se dentro da banda do azul ($\lambda = 480$). Por meio da Figura B.3 (manual do fabricante Burr-Brown) tem-se a responsividade espectral normalizada, na qual se observa que a sensibilidade para o comprimento de onda do azul é 2,5 vezes menor que para o vermelho. Logo, antes de realizar a devida conversão do sinal de tensão para potência radiante por meio da curva na Figura B.2, um fator multiplicativo devido a sensibilidade espectral do sensor deve ser inserido.

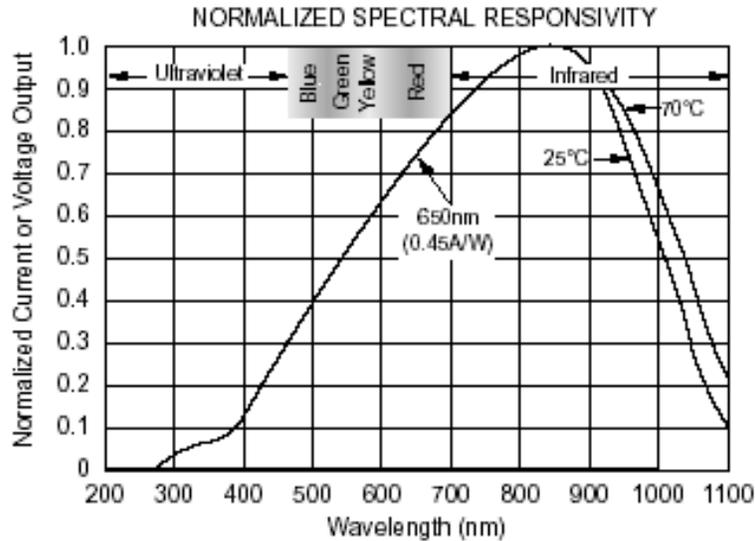


Figura B.3: Responsividade espectral normalizada para o fotodiodo de Si (OPT 101). Dados do fabricante (Burr-Brown, Tucson, AZ, EUA).

O sensor foi acondicionado em uma caixa de acrílico (Figura B.4) e posicionado na distância de trabalho da objetiva, onde supostamente o miócito cardíaco se encontraria. O sinal de tensão medido quando a luz de excitação foi colimada no sensor foi de 2 V. Como a sensibilidade para o comprimento de onda do azul é 2,5 vezes menor do que para o vermelho, a tensão de saída para conversão para potência radiante é $2,5 \cdot 2 = 5$ V, o que equivale a uma potência radiante de aproximadamente $10 \mu\text{W}$ (Figura B.2). Existem poucos trabalhos na literatura que quantificam a potência radiante que chega à amostra biológica, o que prejudica a comparação da eficiência da óptica de excitação da instrumentação desenvolvida em relação a outros equipamentos. Entretanto, conforme demonstrado na seção resultados, fica evidente que a potência radiante aqui alcançada é suficiente para obtenção de transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com boa relação sinal ruído, e compatível com os equipamentos comerciais disponíveis.

De maneira geral, pode-se dizer que o fotômetro desenvolvido mostrou-se uma solução de baixo custo (R\$ 30,00) e versátil, uma vez que o mesmo pode funcionar à bateria, é leve, pequeno e de fácil mobilidade, sendo adequado para medir potência radiante absoluta dentro de uma determinada banda espectral, como no caso aqui empregado (entre 450 e 500 nm - azul).

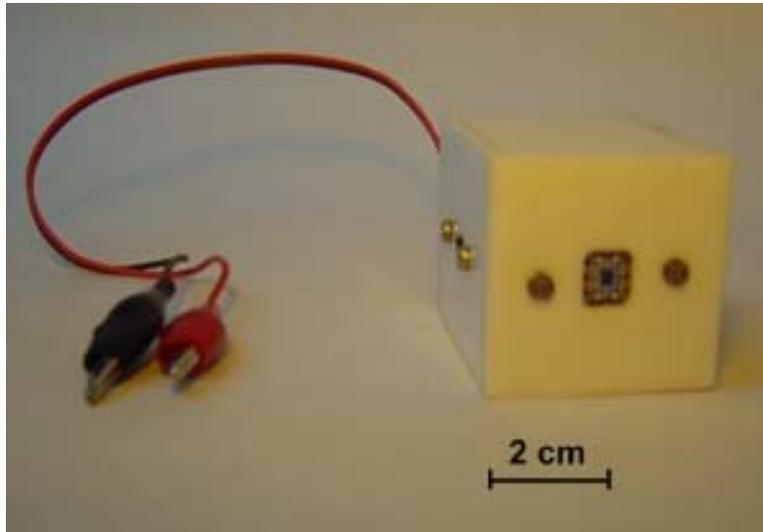


Figura B.4: Fotômetro construído para estimar a potência radiante que chega até a amostra biológica.

Referência Bibliográfica

Burr-Brown. OPT 101, Tucson, AZ, EUA. Disponível em:

“<http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=OPT101P>”. Acessado em 11 Maio 2007.

Apêndice C – Circuito oscilador para acionamento de válvula solenóide

A Figura C.1 mostra o circuito construído para acionar a válvula solenóide utilizada na troca rápida de soluções fisiológicas próximo à célula. O circuito permite o controle rigoroso do tempo de abertura e fechamento da válvula na medida em que alguns de seus parâmetros são ajustados pelo usuário, definindo a forma de onda de oscilação para a saída.

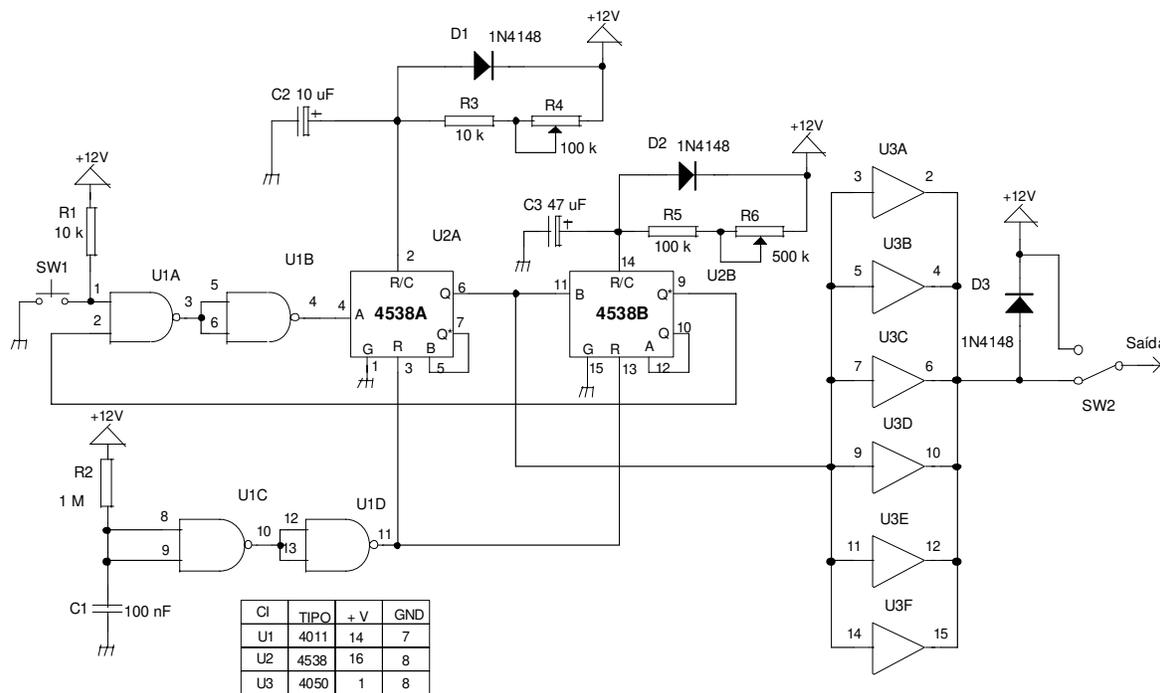


Figura C.1: Esquemático do circuito oscilador para aplicação controlada dos pulsos de café.

O circuito oscilador é composto pelos circuitos integrados MC14011B (manual do fabricante Motorola Inc.), M14538 (manual do fabricante Motorola Inc.) e MC14050 (manual do fabricante Motorola Inc.), que são, respectivamente, portas lógicas *NAND*, multivibrador monoestável e um *buffer* não inversor. O multivibrador monoestável 4538A produz pulsos de duração definida pela constante de tempo do circuito RC ligado ao pino 2 (capacitor de 10 μ F e trimpot de 100 K Ω) controlando a duração do pulso de saída (T_H), e portanto, o tempo que a válvula fica aberta. O monoestável 4538B define o intervalo

entre pulsos (T_L) através da constante de tempo associada ao mesmo (capacitor de $47 \mu\text{F}$ e trimpot de $500 \text{ K}\Omega$ - pino 14). Na configuração estabelecida por este circuito, o pulso é produzido na sua respectiva saída quando a entrada passa de nível lógico 0 para 1, ou seja, o multivibrador é sensível à borda de subida.

Quando o circuito é alimentado pela fonte de tensão, os multivibradores são iniciados (o que é feito pelo circuito de *power on reset* implementado a partir de portas lógica *NAND*, um resistor de $1 \text{ M}\Omega$ e um capacitor de 100 nF). A forma de onda de saída passa a oscilar apenas após o botão Início (SW1) ser pressionado, produzindo a saída desejada até que a alimentação seja cortada. Um *buffer* não inversor foi colocado na saída do circuito oscilador para fornecer um ganho de corrente adequado para acionamento da válvula solenóide, que necessita de uma tensão de 12 V e 41 mA (manual do fabricante The Lee Company) para sua abertura. A chave SW2 permite que o usuário coloque a alimentação diretamente nos terminais da válvula, abrindo-a quando e durante o tempo desejado pelo usuário, sem interferência do oscilador. Esta possibilidade foi inserida para permitir a aplicação de pulsos de cafeína de longa duração controlados pelo usuário.

O circuito foi projetado pelo engenheiro Sérgio Moura (CEB - Unicamp) e adaptado para a aplicação específica neste trabalho. A forma de onda de saída do circuito oscilador é mostrada na Figura C.2.

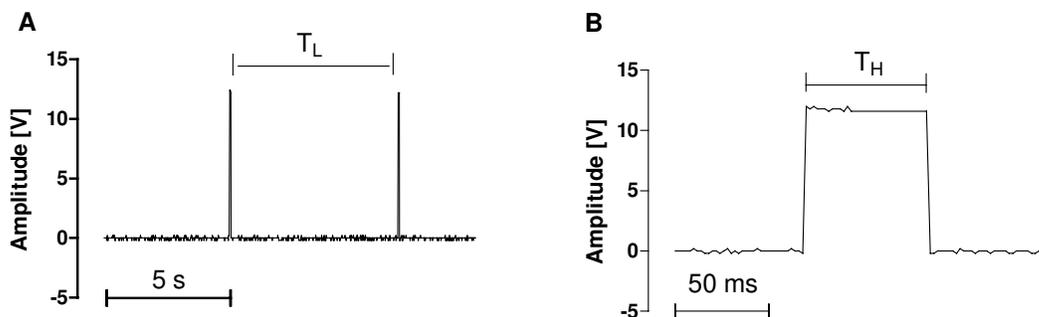


Figura C.2: Forma de onda de saída do circuito acionador da válvula solenóide. Os tempos T_L (painel A) e T_H (painel B) definem, respectivamente, o tempo em que a válvula fica aberta (e conseqüentemente o tempo de aplicação da cafeína) e o intervalo de tempo para o próximo pulso.

Referência Bibliográfica

Motorola Inc. MC14538 - Dual Precision Retiggerable/Resetable Monostable Multivibrator
Disponível em: “<http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=MC14538>”. Acessado em: 11 Maio 2007.

Motorola Inc. MC14050 - Hex Buffer. Disponível em:
“<http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=MC14050>”. Acessado em: 11 Maio 2007.

Motorola Inc. MC14011B - B-suffix series CMOS gates. Disponível em:
“<http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=MMC4011>”. Acessado em: 11 Maio 2007.

The Lee Company. LFAA 12016 18H Solenoid Valve. Westbrook, Connecticut, EUA.