

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

Atividade contrátil e mobilização de cálcio em miócitos ventriculares na presença de solução hiperosmótica de NaCl

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Rafael de Almeida Ricardo
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
2005

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

Atividade contrátil e mobilização de cálcio em miócitos ventriculares na presença de solução hiperosmótica de NaCl

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor: Rafael de Almeida Ricardo

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. Eduardo Tavares Costa
DEB, FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Antônio Augusto Fasolo Quevedo
DEB, FEEC, UNICAMP

Profa. Dra. Idagene Aparecida Cestari
INCOR/USP

Campinas
2005

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

R357a Ricardo, Rafael de Almeida
Atividade contrátil e mobilização de cálcio em miócitos
ventriculares na presença de solução hiperosmótica de NaCl
/ Rafael de Almeida Ricardo. --Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: 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. Células musculares.
3. Cálcio. 4. Fluorescência. 5. Choque hemorrágico. 6. Uso
terapêutico de solução hipertônica. 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: Contractile activity and calcium cycling in ventricular
myocytes exposed to NaCl hyperosmotic solution

Palavras-chave em Inglês: Heart, Isolated myocyte, Calcium, Fluorescence,
Hemorrhagic shock, Hyperosmolarity, Sodium
chloride

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Eduardo Tavares Costa, Antônio Augusto Fasolo
Quevedo e Idagene Aparecida Cestari

Data da defesa: 03/08/2005

É mais fácil quebrar um
átomo que um preconceito.

Albert Einstein

Dedico este trabalho à Helena que,
mesmo distante, esteve sempre ao meu lado.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani, meu muito obrigado pela efetiva orientação por todos estes anos; pelo acompanhamento (de perto), sugestões e conselhos que contribuíram de maneira muito importante para a conclusão deste trabalho e principalmente para minha formação.

Agradeço especialmente a Prof. Dra. Rosana Almada Bassani, pela convivência quase que diária no “escurinho” do laboratório (acompanhada de muito “Solitaire”), pelas dicas e ensinamentos. Agradeço também pelo apoio nos experimentos de medição de $[Ca^{2+}]_i$ e preparo de miócitos.

A todos os funcionários e estagiários da Coordenadoria de P&D – CEB – UNICAMP, em especial às secretárias Nirlei e Marlene; ao engenheiro Sérgio Moura e técnicos Eugênio, Mauro e Toledo, pelo apoio técnico em eletrônica e mecânica; à Elisângela pelo preparo de miócitos e soluções fisiológicas e ao engenheiro Marcos, pelo auxílio na medição de osmolaridade das soluções.

Aos alunos e ex-alunos do departamento, em especial ao Pedro, Nivaldo e Diogo, pelo convívio e amizade.

Agradeço principalmente a toda minha família, em especial ao Durval, Fátima e Hélio, pelo apoio e incentivo em todos os sentidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma apoiaram o desenvolvimento deste trabalho.

Apoio

Este trabalho teve o apoio da Fapesp (Proc.: 03/04688-5 e 00/08836-0)

Resumo

A infusão intravenosa de solução hiperosmótica de NaCl tem se mostrado eficaz como tratamento único para a condição de choque hemorrágico, mas o conhecimento de seus efeitos sobre o coração ainda é limitado. Neste trabalho, desenvolvemos instrumentação para registro de encurtamento celular e investigamos o efeito direto de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a atividade contrátil e transientes de Ca^{2+} em miócitos ventriculares isolados de rato. A amplitude do encurtamento celular (ΔEC) e dos transientes de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, medida com indo-1) foi registrada em miócitos estimulados a 0,5 Hz antes e depois do incremento da osmolaridade extracelular em 85 mOsm/l pela adição de sacarose (HiperSac) ou NaCl (HiperNac) à solução de perfusão. Variações do conteúdo de Ca^{2+} e da liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) também foram avaliadas. Simulação computacional (LabHeart v. 4.9.5) de transientes de Ca^{2+} e curva corrente-tensão da troca $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) foram usados para auxiliar o entendimento dos resultados. A perfusão dos miócitos com solução HiperNac provocou redução transitória, seguida de recuperação de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ΔEC . Por outro lado, a perfusão com HiperSac reduziu de maneira persistente a ΔEC , sem alterar $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. O aumento da liberação fracional de Ca^{2+} do RS ($p < 0,05$) provocado pela solução HiperNac pode ter contribuído para a recuperação de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. A hiperosmolalidade *per se* prolongou o relaxamento, sem afetar a cinética de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, possivelmente por aumento da viscosidade intracelular. A queda mais lenta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante o transiente induzido por cafeína é compatível com redução da extrusão de Ca^{2+} via NCX devida ao acúmulo intracelular lento de Na^+ na condição de hiperosmolaridade. Os resultados da simulação computacional estão de acordo com esta hipótese.

Abstract

Intravenous injection of hyperosmolar NaCl solution has been used as the sole treatment for hemorrhagic shock, but its effects on heart muscle are not completely elucidated. In this work, we developed instrumentation for cell shortening measurement and investigated the direct effects of hyperosmolar NaCl solution on contractile activity and cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in isolated rat ventricular myocyte. Cell shortening (ΔEC) and Ca^{2+} transient amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, measured with indo-1) were recorded in myocytes stimulated at 0.5 Hz before and after increasing extracellular osmolarity in 85 mOsm/l by sucrose (HiperSac) or NaCl (HiperNac) addition to the perfusate. Sarcoplasmic reticulum (RS) Ca^{2+} load and fractional release were estimated. Computational simulation (LabHeart, v. 4.9.5) of Ca^{2+} transient and Na^+ - Ca^{2+} exchange voltage-current relationship was performed. HiperNac perfusion caused transient decrease of $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ and ΔEC , followed by a gradual recovery. HiperSac perfusion caused a monophasic decrease of ΔEC , but did not change $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Increased fractional RS Ca^{2+} release ($p < 0.05$) in the presence of HiperNac may have contributed to the delayed recovery of $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Hyperosmolarity *per se* prolonged cell relaxation, but did not affect $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline kinetics, possibly by increased intracellular viscosity. Slower $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decay during caffeine-induced transients indicates decreased NCX-mediated Ca^{2+} efflux transport following progressive intracellular $[\text{Na}^+]$ accumulation due to extracellular hyperosmolarity. Computational simulation results agree with this hypothesis.

Lista de Abreviaturas

SCV – sistema cardiovascular

CH – choque hemorrágico

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

$[Ca^{2+}]_o$ – concentração extracelular de Ca^{2+}

$[Na^+]_i$ – concentração intracelular de Na^+

$[Na^+]_o$ – concentração extracelular de Na^+

RS – retículo sarcoplasmático

NCX – troca Na^+/Ca^{2+}

PA – potencial de ação

E_m – potencial de membrana

I_{NCX} – corrente de membrana mediada pela troca Na^+-Ca^{2+}

I_K – corrente tardia retificadora de potássio

CEB – Centro de Engenharia Biomédica

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

HiperSac – solução hiperosmótica de sacarose

HiperNac – solução hiperosmótica de NaCl

DBV – detector de borda de sinal de vídeo

CCD – *charge coupled device*

UV – ultra-violeta

LED – *light emitting diode*

PMT – tubo fotomultiplicador

VCR – aparelho gravador de vídeo cassete

CCR – comprimento celular em repouso

IC95% – Intervalo de confiança para 95%

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

LF – liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

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

$[Ca^{2+}]_{dia}$ – concentração intracelular de Ca^{2+} diastólica

ΔEC – amplitude da contração celular

$t_{1/2-rel}$ – tempo necessário para que a célula relaxe o equivalente à metade do valor da amplitude da contração

$t_{1/2-Ca}$ – tempo necessário para que o transiente de Ca^{2+} decline até metade do seu valor de pico

twitch – contração evocada por estimulação elétrica

Sumário

1. Introdução	01
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	15
3.1 – Animais	17
3.2 – Soluções fisiológicas	17
3.3 – Isolamento de miócitos ventriculares	21
3.4 – Instrumentos e dispositivos	21
3.5 – Testes da Instrumentação	26
3.6 – Calibração do indicador indo-1	28
3.7 – Protocolos experimentais	30
3.6 – Simulação computacional	35
3.9 – Análise estatística dos dados	37
4. Resultados	39
4.1 – Calibração do indicador indo-1	41
4.2 – Efeito do aumento da osmolaridade extracelular sobre a amplitude do encurtamento celular e transiente de Ca^{2+}	41
4.3 – Aumento iso e hiperosmótico da $[\text{Na}^+]_o$	47
4.4 – Diagrama Ca^{2+} - encurtamento	51
4.5 – Carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático	53
4.6 – Liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático	55
4.7 – Reversibilidade do efeito osmótico	57
4.8 - $t_{1/2}$ de relaxamento e $t_{1/2}$ declínio de Ca^{2+}	59
4.9 – Simulação computacional	66
5. Discussão e Conclusões	67
5.1 – Instrumentação	69
5.2 – Calibração do indicador indo-1	69
5.3 – Efeitos da perfusão dos miócitos com soluções hiperosmóticas	70
5.4 – Conclusões finais	80
6. Referências bibliográficas	81
Apêndice A – Medição da concentração intracelular de Ca^{2+}	93

1 Introdução

1 Introdução

O sistema cardiovascular (SCV) tem como função principal transportar sangue a uma pressão adequada a todos os tecidos, de modo que nutrientes, hormônios, oxigênio e calor sejam distribuídos por todas as células do organismo, e os produtos do metabolismo celular sejam removidos e transportados para seus sítios de eliminação. Assim, o SCV é um grande sistema de transporte, no qual o coração atua como principal elemento ativo de propulsão, e o fluxo de sangue para cada leito vascular é determinado por regulação local e neuro-humoral da resistência vascular.

Vários são os fatores que podem alterar o equilíbrio e a manutenção da pressão e do fluxo sanguíneo, tanto de ordem fisiológica (*e.g.* exercício físico) quanto não-fisiológica (*e.g.* insuficiência cardíaca, choque circulatório) (Milnor, 1980). Neste trabalho, estudamos células musculares cardíacas (miocárdicas) submetidas a uma condição que está presente em uma das abordagens terapêuticas para a condição de choque circulatório.

Quando, em um processo hemorrágico, a perda de sangue é pequena, ocorre redução transitória da pressão de enchimento circulatório e queda da pressão arterial, condição compensada pelos mecanismos de regulação a curto prazo da pressão arterial, como a inibição da atividade baroreceptora, o que causa ativação simpática e inibição parassimpática. Estas modificações do tônus neural autonômico levam ao aumento do tônus vascular e, conseqüentemente, ao aumento de resistência periférica e redução da complacência venosa, aumento da freqüência cardíaca e contratilidade miocárdica. Esta série de eventos permite a recuperação da pressão aos níveis normais. Quando a perda de sangue é elevada (cerca de 2/3 do volume sangüíneo total) e persiste por período prolongado, estes mecanismos compensatórios não revertem o quadro de hipotensão, e o choque hemorrágico (CH), um dos tipos de choque circulatório, instala-se. Nesta condição de hipotensão, há drástica redução do fluxo sanguíneo para vários leitos vasculares (*e.g.* renal, mesentérico, cutâneo, hepático) em proveito da manutenção de fluxo para os leitos cerebral, pulmonar e cardíaco. Se esta condição perdurar por um longo período (cerca de 40 min a 1 hora no cão, Velasco *et al.*, 1980), o choque se torna irreversível devido a lesão e morte celular nos tecidos mal irrigados. Nesta condição de choque prolongado, não se conhece terapia capaz de salvar o indivíduo da morte.

As terapias convencionais para abordagem ao CH, que incluem reposição de volume por meio de transfusão sangüínea ou infusão de grande volume de soluções

cristalóides isotônicas (Auler Júnior & Fantoni, 1999), podem acarretar um grande número de problemas, desde o risco de sobrecarga de volume até os perigos típicos das transfusões, como contaminação por vírus e microorganismos e problemas de compatibilidade antigênica.

O tratamento do CH ganhou novos horizontes quando foi descoberto que a infusão intravenosa de pequeno volume (cerca de 10% do volume perdido) de solução hiperosmótica de NaCl (7,5% ou 2400 mOsm/l) poderia reverter o quadro do CH em cão (Velasco *et al.*, 1980) e no homem (De Fellipe *et al.*, 1980), sem a necessidade de transfusão sanguínea. O emprego deste tipo de solução passou a ser uma nova alternativa ao tratamento do CH, com inúmeras vantagens: diminuição do volume administrado ao paciente, redução dos riscos inerentes à transfusão sanguínea, facilidade de transporte e administração, e o baixo custo relativo do cloreto de sódio (Rocha-e-Silva, 1998).

O uso de soluções hiperosmóticas no tratamento do CH pode causar variações locais e generalizadas na osmolaridade plasmática. Estas variações afetam drasticamente a hemodinâmica do SCV por influir no tônus vascular, na distribuição de líquidos entre compartimentos e no volume plasmático (Mellander, 1973; Rocha-e-Silva *et al.*, 1992). Estudos experimentais possibilitaram visualizar um quadro geral dos efeitos da infusão de soluções hiperosmóticas na circulação. Este quadro inclui redução de resistência ao fluxo sanguíneo (Gerber *et al.*, 1979) com intensidade e persistência dependentes do soluto infundido e da região perfundida (Gazitua *et al.*, 1971), venoconstrição (Gazitua *et al.*, 1971; Hauge & Bo, 1971) e queda da pressão arterial sistêmica (Raizner *et al.*, 1973). Além dos efeitos diretos no SCV, a eficácia do tratamento do CH com soluções hiperosmóticas de NaCl parece depender também da participação de vias neurais. Pisarri *et al.* (1992) demonstraram que a infusão de solução salina hiperosmótica na circulação pulmonar aumenta a frequência de potenciais de ação em fibras nervosas tipo C em cães. Outros estudos sugerem a necessidade de uma inervação pulmonar íntegra para que a reversão do choque ocorra (Lopes, *et al.*, 1981; Younes *et al.*, 1985; Allen *et al.*, 1992). Recentemente, Velasco & Baena (2004) demonstraram que o bloqueio da ação vagal em cães submetidos ao CH praticamente eliminou a sobrevida de animais tratados com solução hiperosmótica de NaCl. Além disso, Barbosa *et al.* (1992) constataram que a reversão do CH por este tratamento é inibida pela lesão irreversível hipotalâmica na região da área pré-óptica medial e da lâmina terminal.

Apesar de seus mecanismos de ação não estarem totalmente esclarecidos, as soluções hiperosmóticas de NaCl são ainda a melhor alternativa à transfusão sanguínea na reversão do CH (Rocha-e-Silva & Poli de Figueiredo, 2005; Cabrales *et al.*, 2004; Muller & Gerhards, 2003; Chiara *et al.*, 2003). O que se pode afirmar com certeza é que os efeitos das soluções hiperosmóticas são múltiplos e muito se tem a fazer para elucidá-los.

Um dos pontos que há vários anos vem sendo motivo de estudo no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv, CEB, Unicamp) é a ação da osmolaridade e dos solutos de soluções hiperosmóticas sobre o miocárdio. Bassani (1987) e Bassani *et al.* (1987) demonstraram que a hiperosmolaridade *per se* (*i.e.*, sacarose como osmólito) reduz a frequência de contrações espontâneas do átrio direito isolado de rato e aumenta a força contrátil do tecido atrial esquerdo estimulado eletricamente em diferentes frequências. Curiosamente, soluções hiperosmóticas de NaCl, ao mesmo tempo que produzem redução de frequência espontânea, provocam marcante redução transitória da força desenvolvida pelo tecido cardíaco, seguida de recuperação para um nível estável, cuja amplitude mantém uma relação negativa com a concentração do soluto para uma dada osmolaridade (Bassani *et al.*, 1987; Bassani & Bassani, 1989; Bassani *et al.*, 1990). O efeito de soluções hiperosmóticas sobre o coração inclui ainda redução de resposta à noradrenalina no tecido atrial esquerdo isolado de rato (Bassani & Bassani, 1991). No tecido ventricular esquerdo, este tipo de solução também apresenta, aparentemente, efeito inotrópico negativo, causando diminuição do pico e derivada temporal máxima da pressão do ventrículo esquerdo e redução do débito cardíaco (Bem-Haim *et al.*, 1992).

Os efeitos das soluções hiperosmóticas sobre a contratilidade do tecido cardíaco podem ter origem no processo de contração no nível celular. Este processo tem início com a ativação elétrica da célula, caracterizada por uma variação rápida, ativa e não linear do potencial de membrana, conhecido como potencial de ação (PA), que dispara uma série de eventos que resultam na contração celular (processo conhecido como acoplamento excitação-contração; AEC). A Figura 1 ilustra as principais estruturas celulares envolvidas no AEC.

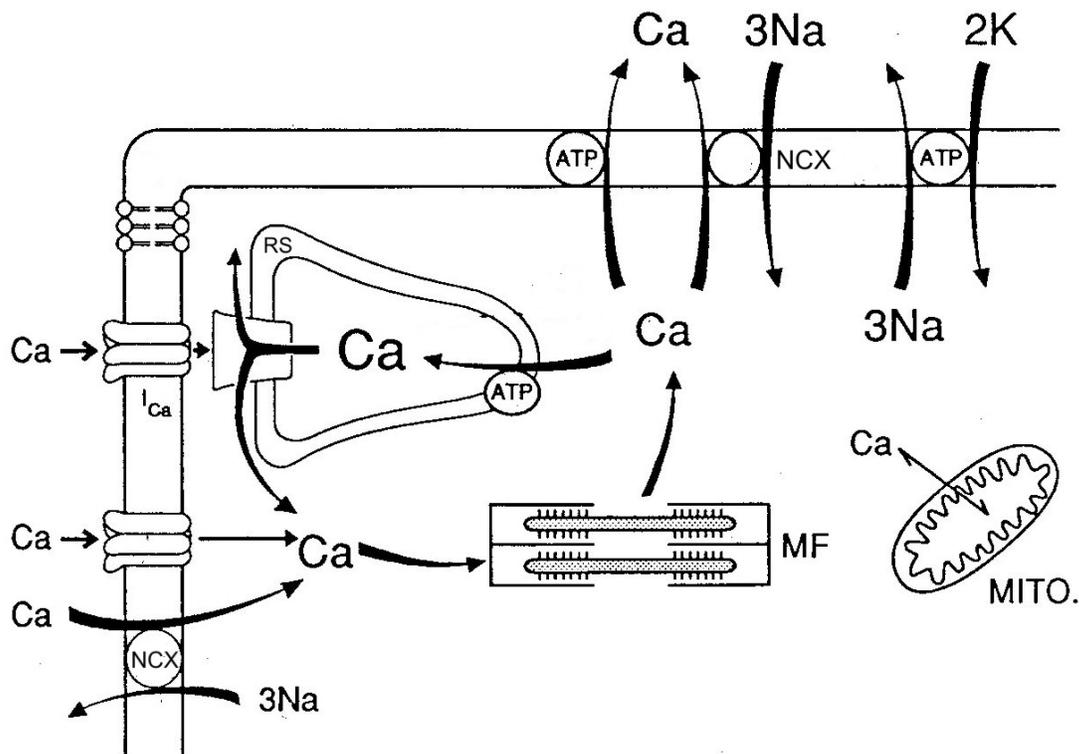


Figura 1.1 – Mecanismos celulares envolvidos no AEC em miócito cardíaco de mamífero. O influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes¹ induzem a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} proveniente desta organela se difunde para os miofilamentos (MF) e dispara a contração. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é reduzida pela ATPase do RS e pela NCX do sarcolema, permitindo o relaxamento celular. Outros mecanismos também contribuem para a redução de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, porém com participação relativa em torno de 2 % (*i.e.*, mitocôndria, ATPase de Ca^{2+} do sarcolema). A ATPase de Na^+ - K^+ contribui indiretamente para o transporte de Ca^{2+} , mantendo o gradiente eletroquímico dos íons Na^+ e K^+ na ocorrência de PA's. Modificado de Bers (2001).

Durante o PA, Ca^{2+} entra na célula por meio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes presentes na membrana (sarcolema). O Ca^{2+} que entra, além de diretamente ativar os miofilamentos, liga-se aos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), provocando a liberação de grande quantidade do íon da organela que contém o principal estoque do Ca^{2+} ativador da contração (Bers, 2001). Este mecanismo é denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato, 1983). Com isto, a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), de cerca de 200 nM em repouso, eleva-se bruscamente para cerca de 1 μM . No citosol, Ca^{2+} se difunde para os miofilamentos e

liga-se à troponina C, disparando o processo de encurtamento celular (contração) e geração de força, processo que se explica com base na teoria dos filamentos deslizantes (Huxley, 1969). Para que o relaxamento ocorra, $[Ca^{2+}]_i$ deve ser reduzida. A maior parte do íon é recaptada para o RS por meio da ATPase de Ca^{2+} do RS, e o restante é transportado para fora da célula pelo mecanismo de troca Na^+-Ca^{2+} (NCX) e pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (Bassani *et al.*, 1994).

Conhecidamente, a perfusão de miócitos com soluções anisomóticas provoca variação do volume celular (Roos, 1986; Vandenberg, *et al.*, 1996), que depende do soluto utilizado e da osmolaridade da solução. Esta variação de volume pode induzir diversas respostas celulares: alteração da concentração intracelular de diversos íons (*e.g.*, K^+ , Na^+ e Ca^{2+}), estresse mecânico do citoesqueleto e variação da distância que separa os filamentos contráteis finos e grossos (Vandenberg *et al.*, 1996). A remoção de água do meio intracelular provocada pela hiperosmolaridade extracelular aumenta a viscosidade citosólica e, assim, pode alterar a dinâmica de contração e desenvolvimento de força pelo miócito (Allen & Smith, 1987). Além disso, a compressão volumétrica da célula reduz o espaçamento entre os miofilamentos, podendo, desta maneira, alterar a probabilidade de ligação entre actina e miosina (Fuchs & Wang, 1996). Existem também, na literatura, diversos trabalhos que indicam modificação da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} em miócitos submetidos a choque osmótico (McDonald & Moss, 1995; Fuchs & Wang, 1996; Fukuda *et al.*, 2001; Konhilas, *et al.*, 2002).

De maneira direta ou indireta, a hiperosmolaridade pode influir em diversos tipos de transportadores iônicos e ATPases de membrana. Whalley *et al.* (1991) demonstraram que soluções hiperosmóticas de sacarose têm efeito direto sobre o trocador Na^+-H^+ , aumentando a extrusão de prótons e influxo de Na^+ , gerando assim alcalose e acúmulo de Na^+ no citosol. Em trabalho posterior, Whalley *et al.* (1993) realizaram também medições da corrente gerada pela atividade da ATPase Na^+-K^+ em miócitos ventriculares de coelho submetidos a choque osmótico, e mostraram que soluções hiperosmóticas inibem e soluções hiposmóticas estimulam esta ATPase. Demonstraram ainda que estes efeitos são dependentes, respectivamente, do aumento e da redução da afinidade da ATPase ao Na^+ e não dependem da $[Ca^{2+}]_i$ e pH intracelular. A corrente de membrana mediada pela NCX (I_{NCX}) também é modulada pela variação da osmolaridade extracelular. Utilizando miócitos ventriculares de cobaia, Wright *et al.* (1995) observaram que o aumento moderado da osmolaridade extracelular (30% acima do valor controle por adição de sacarose) provoca aumento estável da I_{NCX} (aumento de 25%) enquanto o aumento da

osmolaridade em 50% provoca aumento acentuado porém transitório do valor de pico desta corrente (aumento de 55%). No entanto, a alteração da I_{NCX} não foi acompanhada de variação do potencial de reversão do trocador, o que sugere que este efeito não seja devido primariamente a modificação das concentrações intracelulares de Na^+ e Ca^{2+} .

O curso temporal do PA cardíaco depende da somatória das correntes iônicas mediadas por todos canais, trocadores e ATPases de membrana. Portanto, espera-se que a modulação destas correntes induzida pela variação de osmolaridade extracelular possa alterar não só o curso temporal do PA, mas também o potencial de repouso da membrana. Ogura *et al.* (1997) demonstraram em miócitos ventriculares de cobaia que a adição de 50 mM de sacarose à solução de perfusão causa hiperpolarização diastólica da membrana (cerca de 10 mV; estimulação a 1 Hz). Estes autores observaram também diminuição transitória, seguida de aumento da duração do PA, além de diminuição da corrente de Ca^{2+} mediada por canais tipo L ($I_{Ca,L}$), que foi atribuída ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Estes resultados foram confirmados por Kasamaki *et al.* (1998), que demonstraram ainda que o aumento da duração do PA após 10 min de perfusão com solução hiperosmótica de sacarose se deve à redução (cerca de 55%) da corrente tardia retificadora de potássio (I_K), que tem papel importante da fase de repolarização do PA cardíaco, com redução de 30% e 50%, respectivamente, de seus componentes de ativação rápida (I_{Kr}) e de ativação lenta (I_{Ks}) (Ogura *et al.*, 2003). A corrente retificadora de entrada de potássio (I_{K1}) também é sensível a variações da osmolaridade extracelular. Missan *et al.* (2004) relataram aumento da amplitude da I_{K1} em miócitos de cobaia após 5 min de perfusão com solução hiperosmótica, que foi atribuída a um aumento da condutância do respectivo canal. Observaram também deslocamento do potencial de reversão deste canal para valores mais negativos, supostamente em função de um aumento da concentração intracelular de K^+ ($[K^+]_i$).

Um dos aspectos pouco explorados na literatura é o emprego de técnicas que permitam estudar o papel dos transportadores de Ca^{2+} no efeito inotrópico das soluções hiperosmóticas de NaCl. Várias propostas de modelos quantitativos já foram feitas, tanto para explicar de que modo os diversos transportadores de Ca^{2+} atuam em conjunto, na promoção do relaxamento (Bassani *et al.*, 1994), quanto para propor um novo mecanismo regulador da atividade contrátil no coração (Bassani *et al.*, 1995a). Procuramos, neste trabalho, fazer uso destas propostas para investigar o efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre os transportadores de Ca^{2+} em miócitos ventriculares. Além da motivação gerada pelo tratamento do CH com soluções hiperosmóticas, o estudo do efeito da

hiperosmolaridade pode ser aplicado a diversas circunstâncias na qual ela ocorre, como a isquemia fisiológica (*e.g.*, exercício) ou não fisiológica (*e.g.*, problemas vasculares ou cardíacos), e hipertonicidade extracelular devido à desidratação ou excesso de perda urinária de água (*e.g.*, diabetes mellitus e diabetes insípitus). Além da metodologia experimental, fizemos uso de um modelo matemático (Puglisi & Bers, 2001) do PA e transporte celular de Ca^{2+} no miócito ventricular para auxiliar o entendimento dos resultados.

No presente trabalho, procuramos caracterizar, por meio da medição do encurtamento celular (contração) e transientes de Ca^{2+} , o curso temporal dos efeitos causados pelo aumento da osmolaridade, por adição de NaCl ou sacarose ao meio extracelular. Foi possível investigar o envolvimento do RS na atividade contrátil celular na presença de soluções hiperosmóticas. Fez parte ainda desse trabalho o desenvolvimento de instrumentação para registrar o curso temporal das contrações de miócitos ventriculares de rato.

2 Objetivos

2 Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- a) Desenvolvimento de instrumentação específica para medição e registro da atividade contrátil de miócitos isolados;
- b) Caracterização o curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a atividade contrátil e transientes de Ca^{2+} em miócitos ventriculares isolados de rato;
- c) Determinação da carga de Ca^{2+} e da liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático de miócitos ventriculares na presença de solução hiperosmótica de NaCl.

3 Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar adultos de ambos os sexos, pesando de 250-400 g, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, recebendo água e ração *ad libitum*, em regime de iluminação de 12 horas, e não sofreram manipulação experimental até o dia do sacrifício.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – Instituto de Biologia – UNICAMP (certificados P-637-1 e P-775-1).

3.2 *Soluções Fisiológicas*

3.2.1 Composição

As concentrações de todos os sais e compostos listados abaixo estão expressas em milimolar (mM). Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada, com exceção das soluções utilizadas no isolamento de miócitos, que foram preparadas com água ultrafiltrada (mod. Easypure UF, Barnstead International, Dubuque, Iowa, EUA).

Solução de Tyrode normal (NT): NaCl 140; KCl 6; MgCl₂.6H₂O 1,5; HEPES (ácido hidroxietilpiperazina–N''–2 etanosulfônico) 5; glicose 11,1; CaCl₂.2H₂O 1; pH 7,4 a 23°C (ajustado com NaOH).

Solução NT sem cálcio e sódio (Tyr-00): Cloreto de colina 140; MgCl₂.6H₂O 2.5; HEPES 5; glicose 11,1; EGTA (ácido etileno-glicol-bis(β-aminoetil-eter)-N,N,N',N' tetracético) 1; pH 7,4 a 23°C (ajustado com KOH).

Solução hiperosmótica de NaCl (HiperNac): Adição de NaCl (50 mM) à solução NT para obtenção de um incremento de osmolaridade de aproximadamente 85 mOsm/l (ver item 3.2.2).

Solução hiperosmótica de Sacarose (HiperSac): Adição de sacarose (100 mM) à solução NT para obtenção de um incremento de osmolaridade de aproximadamente 85 mOsm/l (ver item 3.2.2).

Solução de Tyrode isosmótico com baixa concentração de cálcio (Hipo-Cal): NaCl 140; KCl 6; MgCl₂.6H₂O 1,5; HEPES 5; glicose 11,1; CaCl₂.2H₂O 0,47; pH 7,4 à 23°C (ajustado com NaOH).

Solução de Tyrode isosmótico com baixa concentração de sódio e cálcio (Hipo-Tyr): NaCl 40; cloreto de lítio 100; KCl 6; MgCl₂.6H₂O 1,5; HEPES 5; glicose 11,1; CaCl₂.2H₂O 0,47; pH 7,4 à 23°C (ajustado com NaOH).

Soluções de cafeína contendo sódio e cálcio (Caf-NaCa): 10 mM de cafeína adicionados à solução NT, HiperSac, HiperNac, Hipo-Cal ou Hipo-Tyr.

Solução de cafeína em Tyr-00 (Caf-00): 10 mM de cafeína adicionados à solução Tyr-00.

Solução estoque de indo-1: indo-1 AM (acetoximetil-éster, 10 mM, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

Solução de indo-1 para incubação de miócitos (NT-indo): 10 µl de solução estoque de indo-1 adicionados a 10 µl de solução 2% (v/v) de *Pluronic* (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em DMSO (*Pluronic* é um agente dispersante que facilita a difusão do indo-1 para o interior da célula), e diluídos em 980 µl de NT.

Todos os sais e demais compostos químicos foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA) e Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), salvo quando indicado no texto.

3.2.2 Medição de osmolaridade

A capacidade de uma solução induzir osmose é caracterizada por sua osmolaridade, que é expressa em osmoles por litro de água (Osm/l). A osmolaridade depende do número de partículas de soluto por volume de solvente, e não da concentração do soluto. Uma solução contendo 1 mol de soluto não dissociável dissolvido em 1 l de água (portanto, de concentração 1 M) é definida como tendo osmolaridade de 1 Osm/l. Por outro lado, uma solução de igual concentração de um soluto que se dissocia em 2 partículas (e.g., íons), terá osmolaridade teórica máxima de 2 Osm/l (assumindo dissociação completa do soluto). Na prática, sabe-se que esta dissociação é apenas parcial; portanto, a osmolaridade desta solução deverá assumir um valor maior que 1 e menor que 2 Osm/l (Procópio-Araújo, 1999).

Neste trabalho, utilizamos soluções hiperosmóticas obtidas pela adição de sacarose e NaCl ao NT. A sacarose é um composto não dissociável e o NaCl se dissocia em íons Na^+ e Cl^- . Desta maneira, para que fosse possível garantir o mesmo incremento de osmolaridade em ambas as soluções utilizadas (HiperNac e HiperSac), tornou-se necessário o levantamento de curvas de calibração de osmolaridade para ambos os solutos.

Foram preparadas soluções-padrões de sacarose e NaCl pela adição de 0 a 150 mM (passo de 25 mM) e de 0 a 75 mM (passo de 12,5 mM), respectivamente, à solução NT. Cada solução foi preparada separadamente para eliminar os erros decorrentes da diluição seriada de uma solução de estoque. A osmolaridade de cada solução (4 réplicas em soluções independentes) foi medida por meio de um osmômetro (modelo Osmette A, Precision Systems, Inc., Natick, Massachusetts, EUA). As curvas de calibração estão apresentadas na Figura 3.1.

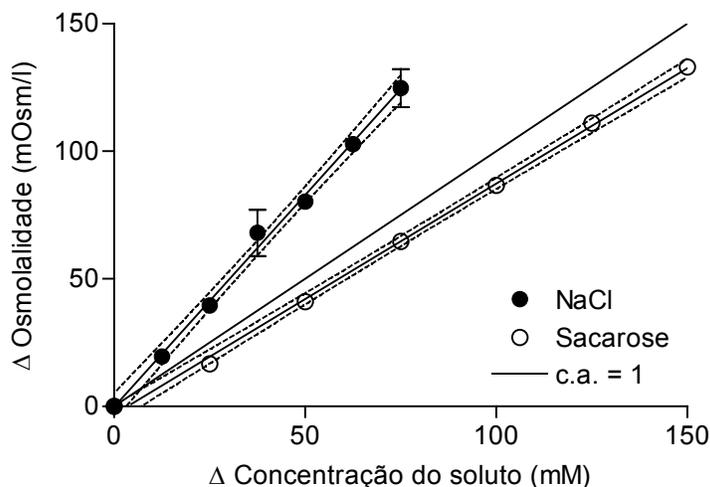


Figura 3.1 – Curva de calibração de osmolaridade de soluções preparadas da pela adição de sacarose e NaCl à solução NT ($n=4$ para cada solução testada). No eixo das abscissas, está representado o incremento de molaridade (mM) do soluto na solução, e no das ordenadas, o incremento de osmolaridade (mOsm/l) da solução. Resultados da regressão linear: Sacarose: $y = 0,9048x - 3,143$; $r^2=0,998$. NaCl: $y = 1,661x - 0,1964$; $r^2=0,996$. As linhas tracejadas representam os intervalos de confiança de 95% dos coeficientes angulares (c.a.) das retas ajustadas. A reta teórica para um soluto ideal não dissociável está indicada por c.a.=1.

Quando o incremento de osmolaridade foi obtido por adição de sacarose, o coeficiente angular (c.a.) da reta ajustada aos pontos, embora próximo ao esperado teórico (c.a.=1), foi estatisticamente diferente deste valor, pois seu intervalo de confiança para 95% (IC95%; linhas tracejadas) não incluiu 1. Este desvio pode estar relacionado a erros no preparo das soluções e na medição da osmolaridade. Quando o soluto foi o NaCl, o c.a. da reta ajustada aos pontos foi cerca de 80% maior que aquele para soluções de sacarose, o que indica que o sal se dissocia em meio aquoso, mas não totalmente, conforme esperado. Podemos, por meio das curvas ajustadas, calcular o incremento da concentração molar necessária para causar um dado incremento de osmolaridade efetiva da solução. Estimamos que seria necessário adicionar 50 e 100 mM de NaCl e sacarose, respectivamente, para obtermos o incremento de osmolaridade escolhido, de aproximadamente 85 mOsm/l, ou cerca de 30% acima da osmolaridade da solução NT.

3.3 *Isolamento de Miócitos Ventriculares*

Os miócitos ventriculares foram isolados por digestão enzimática, conforme já descrito detalhadamente (Bassani *et al.*, 1992; Bassani & Bassani, 2002). De modo simplificado, o coração foi perfundido em sistema de Langendorff com solução de Tyrode sem cálcio por 5 minutos (37 °C). Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,2-0,7mg/ml de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) para digestão enzimática por cerca de 20 minutos ou até que o coração se tornasse flácido. O tecido ventricular foi então separado, fragmentado e agitado em solução de *Tyrode* sem cálcio, para dissociação das células. A suspensão de células foi submetida a repetidas lavagens, com aumento gradual da concentração extracelular de cálcio para 1 mM.

3.4 *Instrumentos e Dispositivos*

3.4.1 Sistema de medição de encurtamento celular

Uma das propostas deste trabalho era o desenvolvimento de um sistema capaz de registrar o comprimento miócitos ventriculares e sua variação durante uma contração. O sistema de microscopia foi projetado tendo em vista três objetivos: ter baixo custo, ser compacto e possibilitar uma futura expansão mecânica, com a implementação de um sistema de fluorescência para medições de concentração intracelular de Ca^{2+} .

A Figura 3.2 ilustra esquematicamente este sistema (demarcado pela linha tracejada) juntamente com os equipamentos que integram o *set-up* experimental completo. Os miócitos eram depositados na câmara de perfusão (patente registrada sob o n° PI 0302.403-2). Esta câmara, construída em acrílico transparente, possibilitava a perfusão dos miócitos com fluxo em regime laminar e permitia a troca rápida da solução de perfusão, necessária para obtenção da contratatura induzida por aplicação rápida de cafeína. Os miócitos eram iluminados por um diodo emissor de luz de alta intensidade (*Super Bright LED*, Jumbo, 5000 mcd, 1.85 V, 20 mA, Archer, N. Cat. 276 - 086). Sua imagem era ampliada por uma objetiva (mod. DPlan 40, Olympus, Japão), refletida em um espelho plano a 45° e projetada no dispositivo CCD (*charge coupled device*) de uma câmara de vídeo (mod. ICD-31, Ikegami Tsushinki Co., Tóquio, Japão). O sinal de vídeo era enviado a um aparelho gravador de vídeo cassete (mod. NV-SJ405BR, Panasonic,

Manaus, AM), cuja saída estava conectada a um detector de borda de sinal de vídeo (DBV, Centro de Engenharia Biomédica, Unicamp, Campinas, SP). O sinal de tensão elétrica gerado pelo DBV, correspondente ao encurtamento celular durante a contração, era enviado a um conversor analógico-digital (mod. CAD 12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP) e armazenado em um microcomputador (mod. AT486 DX4 100 MHz, Acer do Brasil Ltda, São Paulo, SP). Pelo monitor de vídeo (mod. M008, Oriental, Seul, Coréia), era possível se visualizar os miócitos. Os miócitos depositados na câmara de perfusão eram estimulados por meio de um estimulador elétrico (Centro de Engenharia Biomédica, Unicamp, Campinas, SP).

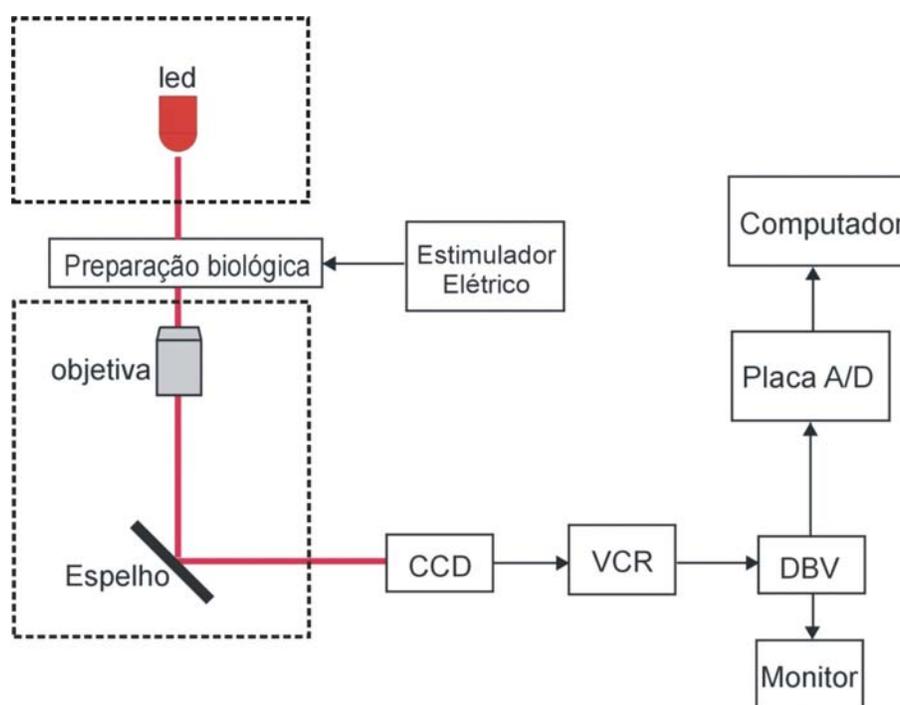


Figura 3.2 – Representação esquemática do *set-up* experimental usado durante este trabalho. A linha tracejada indica o sistema de microscopia desenvolvido. Na câmara de perfusão, os miócitos (preparação biológica) eram estimulados eletricamente por meio de eletrodos conectados a um estimulador elétrico. A imagem dos miócitos, após ser ampliada pela objetiva e refletida por um espelho plano a 45°, era registrada por uma câmara de vídeo (CCD) conectada a um gravador de vídeo cassete (VCR), cujo sinal de saída era enviado a um detector de borda de sinal de vídeo (DBV). A tensão de saída do DBV era proporcional à amplitude da contração do miócito. Este sinal era adquirido por meio de um conversor analógico-digital (Placa A/D) e armazenado em um microcomputador sob a forma de arquivo. Um monitor de vídeo conectado à saída do DBV permitia a visualização do miócito e seu posicionamento em relação à janela de medição do DBV.

Na Figura 3.3, apresentamos uma fotografia do sistema de microscopia desenvolvido durante este trabalho. Este sistema apresentou uma boa estabilidade mecânica quando utilizado em conjunto com a bancada anti-vibração (também desenvolvida neste projeto, vide item 3.4.3), facilidade de operação e dimensões reduzidas, o que facilitou consideravelmente a rotina de trabalho no laboratório.

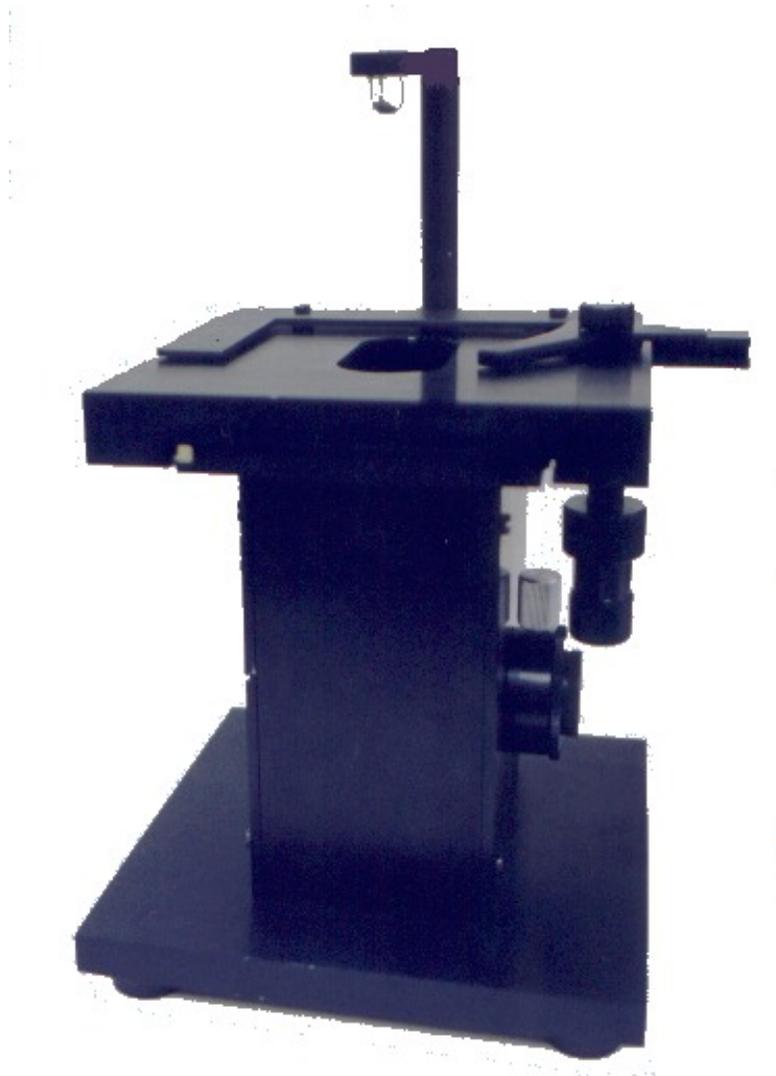


Figura 3.3 – Sistema de microscopia desenvolvido neste trabalho.

3.4.2 Sistema de medição da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Este *setup* experimental é formado por um microscópio invertido (mod. Diaphot 300, Nikon Corp., Tóquio, Japão), um sistema de medição de fluorescência (mod. RatioMaster, Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ, EUA) e um sistema para captação de imagens.

O sistema de captação de imagens funciona de maneira análoga ao sistema descrito no item anterior, e o caminho percorrido pela luz (comprimento de onda de aproximadamente 650 nm) pode ser observado na Figura 3.4 (traçado vermelho).

O indicador fluorescente (indo-1, ver Apêndice A) presente no interior das células era excitado com luz na faixa do ultravioleta (UV), proveniente de uma lâmpada de arco de xenônio de 75 W (mod. UXL-75XE, Ushio Inc., Tóquio, Japão). Esta fonte luminosa estava localizada em compartimento separado (*lamp housing*, não mostrado na figura). Após passar por um monocromador (pico em 360 nm), a luz era conduzida até o microscópio por uma fibra óptica, e passava por um filtro de interferência (pico em 360 nm) antes de chegar aos miócitos. Para o controle do tempo de exposição dos miócitos à iluminação UV (nociva a tecidos biológicos), era utilizado um *shutter*, localizado entre o *lamp housing* e o monocromador.

A fluorescência emitida pelo indicador nos dois comprimentos de onda de interesse (picos em 405 nm e 485 nm) passava pela objetiva, era refletida pelo prisma e separada pelo cubo óptico. Este cubo era composto por um espelho dicróico (que efetivamente fazia a separação dos dois comprimentos de onda) e dois filtros de interferência (com picos em 405 nm e 485 nm). A emissão em cada comprimento de onda era registrada em tubos fotomultiplicadores separados (PMT_{405} e PMT_{485}).

Os sinais provenientes das PMTs (tensão elétrica proporcional à intensidade luminosa) e do DBV (tensão elétrica proporcional à amplitude da contração celular) eram enviados a um conversor analógico-digital (Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ, EUA) controlado pela interface Felix (versão 1.1, Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ, EUA). A taxa de aquisição dos sinais foi de 50 Hz e apenas o sinal de fluorescência passou por filtragem digital (decimação, utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay, com *buffer* igual a 15).

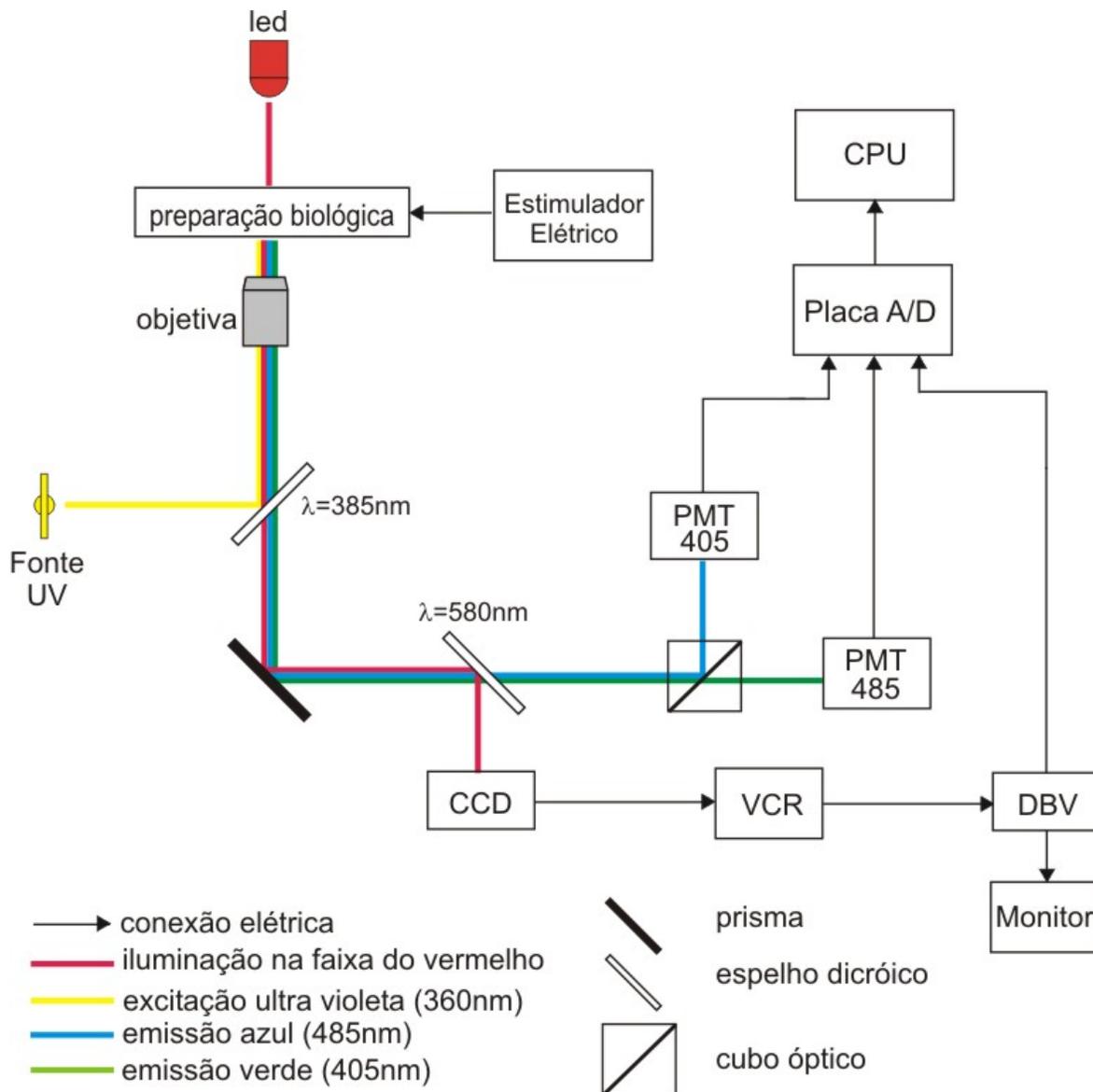


Figura 3.4 – *Set-up* experimental utilizado na medição de transientes de Ca^{2+} . CCD: câmera de vídeo CCD; VCR: aparelho gravador de vídeo cassete; DBV: detector de borda de sinal de vídeo; Monitor: monitor de vídeo; PMT₄₀₅ e PMT₄₈₅: tubos fotomultiplicadores para registro da fluorescência com picos em 405nm e 485nm, respectivamente; Placa A/D: placa conversora de sinal analógico em digital; CPU: microcomputador. Em cada espelho dicróico está apresentado o comprimento de onda de reflexão (λ).

3.4.3 Bancada anti-vibração (Centro de Engenharia Biomédica, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil)

Uma importante característica de um sistema desenvolvido para adquirir sinais de encurtamento celular é a estabilidade mecânica. Portanto, uma bancada antivibração foi projetada e construída durante a realização deste trabalho (projeto em colaboração com o Eng^o. Pedro Xavier de Oliveira). Esta bancada foi projetada de modo a garantir um bom espaço de trabalho, incluindo local adequado para montagem de todos os equipamentos e minimização de vibrações mecânicas. O corpo da bancada foi construído com perfis metálicos e chapas de alumínio e o sistema antivibratório, constituído de uma pedra de granito apoiada sobre quatro bolas de tênis.

3.5 Testes da Instrumentação

3.5.1 Linearidade espacial do sistema de microscopia

Este procedimento foi realizado para verificar se a tensão de saída do DBV (E_{DBV}) em função de um deslocamento conhecido de um objeto apresentado no monitor de vídeo (Δx) era mantida constante em qualquer região do mesmo. Uma gráticula-padrão com precisão de 10 μm (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) foi devidamente posicionada no sistema de microscopia e o foco foi ajustado. Sua imagem observada no monitor de vídeo foi dividida em quatro quadrantes e, por meio de um osciloscópio digital (mod. TDS-360, Tektronix Inc., Beaverton, Oregon, EUA), foi medida a E_{DBV} relativa a um Δx de 10 μm ($n=5$) em cada um dos quadrantes Q-I, Q-II, Q-III e Q-IV. Os resultados obtidos deste teste estão apresentados na Figura 3.5.

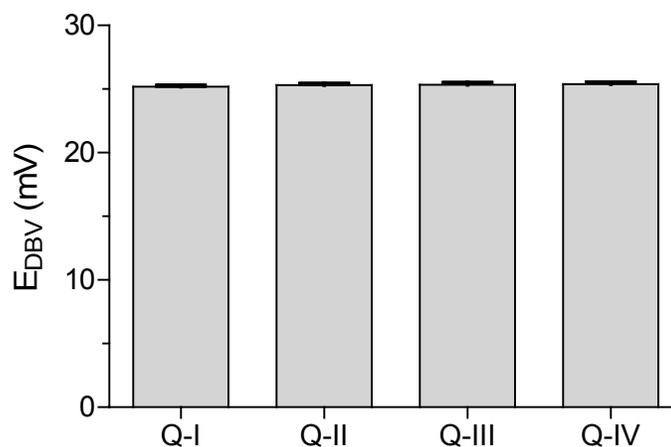


Figura 3.5 – E_{DBV} registrado nos quatro quadrantes do monitor de vídeo ($\Delta x = 10 \mu\text{m}$). $n = 5$.

E_{DBV} não variou significativamente em função da região do monitor onde está sendo realizada a medição ($p > 0,05$; análise de variância monofatorial para dados pareados), indicando que não houve distorções ou paralaxe que interferissem na exatidão da medição.

3.5.2 Linearidade da relação $E_{DBV} : \Delta x$

O procedimento já descrito foi repetido para Δx igual a $20 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$ e $40 \mu\text{m}$, medidos em regiões aleatórias do monitor de vídeo ($n=5$). Uma reta foi ajustada aos pontos experimentais para verificação da linearidade da relação $E_{DBV} : \Delta x$. Os resultados deste teste estão apresentados na Figura 3.6.

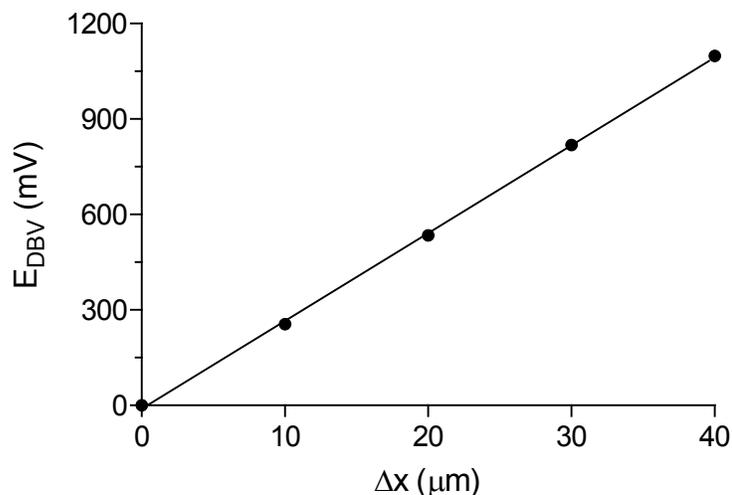


Figura 3.6 – Linearidade da relação $E_{\text{DBV}} : \Delta x$. Regressão linear: $E_{\text{DBV}} = 27,59 \Delta x - 10,72$; $r^2=0,9996$. $n = 5$. Devido à baixa dispersão das medições, não é possível observar as barras de erro na figura.

Podemos observar que a variação de E_{DBV} em função de Δx obedeceu a uma relação linear ($r^2 = 0,9996$). O coeficiente angular desta reta indica que uma variação de 1 μm do comprimento celular equivale a uma tensão de 27,59 mV na saída do DBV, dado utilizado na calibração deste equipamento.

3.6 Calibração do indicador indo-1

O indo-1 é um indicador fluorescente ratiométrico, ou seja, permite o uso do método da razão que consiste em analisar a razão entre a intensidade da fluorescência emitida pelo indicador ligado ao Ca^{2+} e aquela emitida pelo indicador não ligado ao Ca^{2+} (após a subtração da fluorescência de fundo). Este método tem como principal vantagem a diminuição de erros de medida causados por variação da concentração do indicador no interior da célula, intensidade da iluminação de excitação, ganho da medição da fluorescência, artefatos de movimento, entre outros.

Para que seja possível a análise da variação da $[Ca^{2+}]_i$ no interior da célula, devemos converter o sinal de fluorescência medido em $[Ca^{2+}]_i$. Para isso, é utilizada a Eq. 3.1 (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

$$[Ca^{2+}] = k_d \beta \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \quad (3.1)$$

onde R é a razão de fluorescência; R_{\min} e R_{\max} são os limites inferior e superior de R, respectivamente; K_d é a constante de dissociação aparente do indo-1; β é a razão das intensidades de fluorescência medidas em $\lambda = 485$ nm, com $[Ca^{2+}]$ mínima e máxima.

Determinação de R_{\max} e R_{\min}

Estes parâmetros foram determinados segundo Bassani *et al.* (1994). Para a obtenção de R_{\min} (razão de fluorescência com $[Ca^{2+}]$ mínima), os miócitos foram perfundidos com solução de Tyrode sem Ca^{2+} por cerca de 20 minutos, com aplicação da mesma solução contendo 10 mM cafeína a cada 5 min, para depletar o estoque de Ca^{2+} do RS. Em seguida, o meio de incubação foi trocado por uma solução sem cálcio contendo 7 mM de EGTA (quelante de Ca^{2+} utilizado para garantir a redução do Ca^{2+} contaminante da solução para níveis nanomolares). Um registro de fluorescência foi realizado em aproximadamente 30 células. O limite inferior do IC95% das 10 razões de fluorescência de menor valor foi considerado como sendo R_{\min} .

Para a obtenção de R_{\max} (razão de fluorescência com $[Ca^{2+}]$ máxima), foi necessário elevar $[Ca^{2+}]_i$, de modo a saturar os sítios de ligação do indo-1. Para isso, adicionou-se 20 mM de Ca^{2+} à solução de perfusão. Este processo resulta em uma contratura irreversível da célula, seguida, em alguns casos, de morte celular. Durante esta etapa, a fluorescência foi registrada em aproximadamente 30 células. O limite superior do IC95% das 10 razões de fluorescência de maior valor foi considerado como sendo R_{\max} (Gomes *et al.*, 1998).

O parâmetro β foi determinado segundo Gomes *et al.* (1998). Resumidamente, mediu-se a intensidade de fluorescência nos dois comprimentos de onda em pelo menos três pontos de um transiente de Ca^{2+} típico, incluindo o pico. Estes pontos foram traçados em um gráfico no qual o eixo das abscissas representava a fluorescência emitida em 485 nm e o das ordenadas a fluorescência emitida em 405 nm. Por meio de regressão linear,

estimou-se a equação da reta que melhor se ajustava a esses pontos. Com isso, β foi determinado pela Eq. 3.2:

$$\beta = \frac{R_{\max} - a}{R_{\min} - a} \quad (3.2)$$

onde "a" é o coeficiente angular da reta.

O valor de β foi considerado com a média dos valores determinados em cada célula. A constante de dissociação aparente do indicador indo-1 (K_d) foi considerada com sendo igual a 844 nM (Bassani *et al.*, 1995b).

3.7 *Protocolos Experimentais*

Antes de depositar a suspensão de células no interior da câmara de perfusão, era aplicada uma solução de colágeno sobre a lamínula (local onde se sedimentavam os miócitos) com o objetivo de aumentar a adesão dos mesmos à superfície da lamínula. Após a sedimentação, os miócitos eram incubados com solução NT-indo por 15 minutos, e a seguir perfundidos com solução NT por 20 minutos para lavagem e deesterificação do indicador. O indicador na forma éster que, durante a incubação, entra na célula, é deesterificado por esterases celulares durante a lavagem, resultando na sua forma ácida que não é lipossolúvel e, portanto, permanece presa no interior da célula.

Após este procedimento, os miócitos eram perfundidos com solução NT e estimulados eletricamente (pulsos bipolares de tensão, 20% acima do limiar de estimulação, duração de 8 ms e frequência 0,5 Hz) por um período de aproximadamente 5 minutos, para estabilização da amplitude das contrações e transientes de Ca^{2+} .

Todos os protocolos apresentados a seguir foram realizados em temperatura ambiente (23 °C).

3.7.1 Efeito do aumento da osmolaridade extracelular sobre a amplitude do encurtamento celular e transiente de Ca^{2+}

Este protocolo foi utilizado para analisar o efeito produzido pelo aumento rápido e mantido da osmolaridade externa com solução de NaCl (HiperNac) ou de sacarose

(HiperSac). A sacarose produz, teoricamente, um efeito puramente osmótico, pois não tem a capacidade de transpor a membrana celular. Por este motivo, a sacarose foi utilizada no auxílio ao entendimento dos efeitos causados pela solução de NaCl, a qual, além do efeito osmótico, tem um efeito iônico em função da dissociação da molécula de NaCl em íons de Na^+ e Cl^- .

Após o período de estabilização de cerca de 5 minutos sob perfusão com solução controle (NT, exceto quando indicada outra), foi feito o primeiro registro de contrações e transientes de Ca^{2+} . Em seguida, a estimulação elétrica foi interrompida e a solução de perfusão substituída por Tyr-00 por cerca de 15 s. Substituindo-se a solução de perfusão por Caf-00, foi induzida uma contração por aplicação rápida e mantida de cafeína (registrada juntamente com o transiente de Ca^{2+}), com o objetivo de avaliar a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (Bassani & Bers, 1995), uma vez que este fármaco causa liberação do conteúdo de Ca^{2+} armazenado no RS (Bassani *et al.*, 1993a; Bers *et al.*, 1993). Retomando a perfusão com solução NT e a estimulação elétrica por cerca de 5 minutos (tempo necessário para a estabilização da amplitude das contrações e transientes de Ca^{2+}), novamente foram registrados contrações e transientes de Ca^{2+} .

Após as medições na solução controle, foi aplicada a solução-teste (hiperosmótica). Os registros de contrações e transientes de Ca^{2+} foram realizados 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 e 15 min após o início da perfusão com a solução-teste. Depois de 15 min (*i.e.*, estabilização do efeito), repetiu-se o procedimento de obtenção da contração evocada por Caf-00.

Por fim, a osmolaridade foi retornada ao valor de controle por perfusão com solução NT e, 15 min depois, foram registradas contrações evocadas por estimulação elétrica e contração evocada por Caf-00, bem como os respectivos transientes de Ca^{2+} , para testar a reversibilidade do efeito produzido pela solução hiperosmótica.

Em alguns experimentos, foi utilizada a solução Caf-NaCa com objetivo de investigar a taxa de extrusão de Ca^{2+} pela NCX (Bassani *et al.*, 1992;1994). Foram obtidas contrações evocadas por estas soluções após a interrupção da estimulação elétrica na presença da solução controle, e depois de 2 e 15 min de perfusão com a solução hiperosmótica. Observe-se que a solução na qual a cafeína foi dissolvida é a mesma que perfundia a célula antes da aplicação deste fármaco.

Para a análise dos efeitos das soluções hiperosmóticas, utilizamos algumas variáveis extraídas dos registros de contrações celulares e transientes de Ca^{2+} , que foram: a) amplitude da contração celular (evocada por estimulação elétrica e por cafeína

normalizada pelo comprimento celular em repouso (CCR); b) amplitude (*i.e.*, diferença entre o valor de pico e o valor diastólico) dos transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica e por Caf-00; c) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica; d) valores de $t_{1/2}$ de relaxamento ($t_{1/2\text{-rel}}$ - tempo necessário para que a célula relaxe o equivalente à metade do valor da amplitude da contração) e de declínio da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($t_{1/2\text{-Ca}}$ - tempo necessário para que o transiente de Ca^{2+} decline até metade do seu valor de pico) de contrações evocadas por estimulação elétrica e por solução Caf-NaCa.

3.7.2 Aumento isosmótico da concentração extracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$)

Para possibilitar melhor separação dos efeitos causados pelo aumento da $[\text{Na}^+]_o$ e da osmolaridade, tornou-se necessário estudar os efeitos do aumento da $[\text{Na}^+]_o$ sem concomitante aumento da osmolaridade do meio. Isto foi feito sob condições hiperosmótica e isosmótica, como explicado a seguir:

a) Para o aumento de $[\text{Na}^+]_o$ em condição hiperosmótica, usou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.7.1, com aplicação da solução HiperSac por 15 min. No entanto, a seguir, o perfusato foi mudado diretamente para a solução HiperNac (no caso, a solução-teste), de osmolaridade idêntica à da solução Hipersac. Contrações e transientes de Ca^{2+} foram medidos durante os 15 min subseqüentes.

b) Na condição de isosmolaridade, utilizou-se como controle uma solução (Hipo-Tyr) de osmolaridade igual à da solução NT, na qual 50 mM de NaCl foram substituídos de modo equimolar por cloreto de colina (*i.e.*, $[\text{Na}^+]_o$ foi reduzida em 50 mM). A redução de $[\text{Na}^+]_o$, no entanto, altera a força motriz para o transporte de Na^+ e Ca^{2+} pela NCX, sendo necessária redução paralela da concentração extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). Considerando a NCX um sistema no qual um íon Ca^{2+} é transportado paralelamente ao contra-transporte de n íons Na^+ , de forma dependente do gradiente eletroquímico destes íons através da membrana celular, temos (Blaunstein & Lederer, 1999):

$$\Delta\mu_{\text{Ca}} = n\Delta\mu_{\text{Na}} \quad (3.3)$$

onde $\Delta\mu_{\text{ion}}$ é o gradiente eletroquímico dos íons Ca^{2+} e Na^+ .

Pela definição de gradiente eletro-químico, a Eq. 3.3 pode ser reescrita como:

$$\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^n \exp \left[\frac{(2-n)V_m F}{RT} \right] \quad (3.4)$$

onde $[Ion]_o$ e $[Ion]_i$ são as concentrações extra e intracelulares, respectivamente, dos íons Ca^{2+} e Na^+ , V_m é o potencial de membrana, F é a constante de Faraday, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta.

Inúmeros estudos experimentais indicam consistentemente que a estequiometria da NCX no miocárdio seja 2:1 (dois íons Na^+ transportados para cada íon Ca^{2+} , Blaustein & Lederer, 1999), o que resulta em uma enorme simplificação da Eq. 3.4, e elimina a necessidade de se medir V_m (Bassani, 1987):

$$\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^2 \quad (3.5)$$

De acordo com esta equação, é possível estimar valores de $[Ca^{2+}]_o$ em função da $[Na^+]_o$ (e vice-versa) nos quais a força motriz para o transporte iônico pela NCX (e, portanto, a carga intracelular de Ca^{2+}) permaneça inalterada. Assim, calculou-se que, para acompanhar a redução de $[Na^+]_o$ de 140 para 90 mM, $[Ca^{2+}]_o$ deveria ser reduzida de 1 para 0,41 mM. Porém, após alguns testes que revelaram grande queda da amplitude dos transientes Ca^{2+} com esta $[Ca^{2+}]_o$, optamos por utilizar $[Ca^{2+}]_o = 0,47$ mM.

Após a estabilização das contrações com solução NT, a célula foi perfundida com solução Hipo-Tyr (solução controle neste protocolo, com $[Na^+]_o$ e $[Ca^{2+}]_o$ reduzidas) e, após 15 min de estabilização, contrações e transientes de Ca^{2+} controles foram registrados. A seguir, aplicou-se a solução-teste (Hipo-Cal), com composição igual à solução NT, exceto $[Ca^{2+}]_o$, que era 0,47 mM, o que permitiu aumento da $[Na^+]_o$ sem alteração dos demais constituintes e da osmolaridade do meio externo. Contrações e transientes de Ca^{2+} foram registrados até 15 min depois, quando a solução-teste foi substituída por solução NT. Após estabilização do efeito de cada solução, foram evocados e registrados contraturas e transientes de Ca^{2+} por aplicação de Caf-00.

3.7.3 Determinação da carga de Ca^{2+} do RS

A carga de Ca^{2+} do RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) foi estimada como o aumento da concentração citosólica total de Ca^{2+} em resposta à aplicação de cafeína em solução sem Na^+ e sem Ca^{2+} (Caf-00; Bassani & Bers, 1995; Ginsburg & Bers, 2004). A remoção de Na^+ e Ca^{2+} da solução tem por objetivo inibir o transporte de Ca^{2+} pela NCX, que poderia modificar a amplitude do transiente de Ca^{2+} evocado pela cafeína. A presença de EGTA nesta solução assegura a rápida remoção do Ca^{2+} extracelular contaminante (Bassani *et al.*, 1992). A cafeína adentra a célula e sensibiliza os canais de Ca^{2+} do RS ao íon Ca^{2+} , provocando sua abertura e liberação do conteúdo de Ca^{2+} da organela. Na presença mantida de cafeína, o Ca^{2+} captado via ATPase de Ca^{2+} do RS é continuamente liberado, de modo que não há acúmulo do íon no interior do RS (Bers, 2001). Foi demonstrado que a aplicação de Caf-00 por cerca de 30 s é capaz de esgotar totalmente o *pool* de Ca^{2+} sensível à cafeína contido no RS (Bassani *et al.*, 1993a). A amplitude do transiente de Ca^{2+} e/ou da contratatura que o acompanha é um indicador qualitativo muito utilizado para detecção de variações do conteúdo de Ca^{2+} do RS (Bassani & Bers, 1994; 1995a; McCall *et al.*, 1998; Bassani *et al.*, 1993b; 2004; Ginsburg & Bers, 2004; Zima *et al.*, 2004).

Embora a variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (*i.e.* $[\text{Ca}^{2+}]$ livre) em resposta a cafeína seja um índice do conteúdo de Ca^{2+} do RS, a quantificação deste conteúdo requer a estimativa da variação da concentração total de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_T$). Num dado instante, parte do Ca^{2+} presente no citosol está na sua forma livre (cuja concentração medimos com indo-1) e parte ligada a sítios de ligação passiva (*buffers*), como calmodulina, proteínas contráteis, fosfolípidos e outros. Podemos, portanto, dizer que $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é a diferença entre $[\text{Ca}^{2+}]_T$ e a concentração de Ca^{2+} ligada a *buffers* passivos ($[\text{Ca}^{2+}]_B$) (Bers, 2001).

Podemos calcular $[\text{Ca}^{2+}]_T$, por meio da seguinte equação:

$$[\text{Ca}^{2+}]_T = [\text{Ca}^{2+}]_i + \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_i \times B_{\text{max-en}}}{[\text{Ca}^{2+}]_i + K_{d-en}} \right) + \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_i \times B_{\text{max-in}}}{[\text{Ca}^{2+}]_i + K_{d-in}} \right) \quad (3.6)$$

onde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é estimada com indo-1; $B_{\text{max-en}}$ e K_{d-en} correspondem à densidade máxima de sítios endógenos de ligação passiva de Ca^{2+} e à constante de dissociação aparente de Ca^{2+} nestes sítios, respectivamente (300 e 0,54 μM em miócitos ventriculares de ratos adultos, Bassani *et al.*, 1998); $B_{\text{max-in}}$ e K_{d-in} correspondem aos mesmos parâmetros para descrição da ligação de Ca^{2+} com indo-1, assumidos como 50 (Bassani & Bassani, 2002) e 0.844 μM (Bassani *et al.*, 1995b), respectivamente.

Podemos, então, considerar que a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ é dada por (Bassani & Bers, 1995):

$$[Ca^{2+}]_{RS} = [Ca^{2+}]_{T-p} - [Ca^{2+}]_{T-dia} \quad (3.7)$$

onde, $[Ca^{2+}]_{T-p}$ e $[Ca^{2+}]_{T-dia}$ representam os valores de $[Ca^{2+}]_T$ no pico do transiente evocado por cafeína e imediatamente antes do transiente (diástole), respectivamente. Valores estimados por este método são comparáveis aos estimados pelo método eletrofisiológico, que consiste da integração temporal da corrente produzida pela extrusão de Ca^{2+} pela NCX durante a aplicação de cafeína na presença de solução NT (Ginsburg *et al.*, 1998).

3.7.4 Cálculo da liberação fracional de Ca^{2+} do RS

A liberação fracional de Ca^{2+} do RS (LF) representa a quantidade de íons Ca^{2+} que são liberados do RS a cada contração, normalizada pela quantidade total de Ca^{2+} no interior desta organela. O protocolo experimental e o método para estimativa da LF foram propostos pela primeira vez por Bassani *et al.* (1993a). De modo resumido, é realizada inicialmente uma estimativa da $[Ca^{2+}]_{RS}$ após estimulação elétrica em *steady-state*. Em seguida, a captação de Ca^{2+} por meio da ATPase de Ca^{2+} do RS é bloqueada pelo composto thapsigargin em condições nas quais $[Ca^{2+}]_{RS}$ permaneça aproximadamente constante. Após evocar-se uma única contração por estimulação elétrica, a $[Ca^{2+}]_{RS}$ é novamente estimada. A fração do conteúdo de Ca^{2+} do RS liberada durante a contração é considerada como diferença entre as $[Ca^{2+}]_{RS}$ inicial e a final, dividida pela $[Ca^{2+}]_{RS}$ inicial.

Devido à complexidade do protocolo experimental utilizado para estimativa direta da LF e a dificuldade de executá-lo durante os experimentos com as soluções hiperosmóticas, optamos por utilizar neste trabalho uma estimativa indireta deste parâmetro, que também é muito utilizada em outros estudos (Pieske *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2003; Bassani *et al.*, 2004). Nesta abordagem, LF é aproximada pela razão entre a variação de $[Ca^{2+}]_T$ durante uma contração evocada por um estímulo elétrico e aquela em resposta a Caf-00 (i.e., $[Ca^{2+}]_{RS}$).

3.8 *Simulação Computacional*

Neste trabalho utilizamos um modelo matemático de miócito cardíaco com o objetivo de melhorar o entendimento dos efeitos causados pelo aumento da concentração extracelular de Na^+ sobre o transporte de Ca^{2+} via NCX.

3.8.1 O modelo utilizado (*LabHeart*)

O modelo utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Puglisi & Bers (2001). Vários fatores contribuíram para esta escolha, destacando-se entre eles a facilidade de operação do programa computacional e a possibilidade de se obter o curso temporal de transientes de Ca^{2+} e correntes iônicas. Apesar deste modelo ter sido implementado para uma espécie diferente daquela utilizada nesse trabalho (coelho vs. rato), na qual a taxa de transporte de Ca^{2+} pela NCX pode ser diferente (Bassani *et al.*, 1994), acreditamos que esta simulação auxiliou no entendimento dos efeitos causados pela variação da $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Na}^+]_o$ sobre o fluxo de Ca^{2+} por este trocador.

3.8.2 Condições experimentais simuladas

Com base nos resultados obtidos nos presentes experimentos com miócitos, foram selecionadas três condições experimentais para serem simuladas com o modelo:

a) NT: condição controle (perfusão com solução NT), na qual $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1 \text{ mM}$ e $[\text{Na}^+]_o = 140 \text{ mM}$ (vide 3.2.1); $[\text{Na}^+]_i = 12 \text{ mM}$ (determinada em miócitos de rato em repouso por Despa & Bers, 2002)

b) HiperNac-2min: condição correspondente àquela após 2 minutos de perfusão com solução HiperNac, ou seja, no ponto de maior depressão da amplitude dos transientes de Ca^{2+} (Figura 4.3), no qual $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1 \text{ mM}$ e $[\text{Na}^+]_o = 190 \text{ mM}$ (vide composição da solução HiperNac); $[\text{Na}^+]_i = 12 \text{ mM}$ (considerado inalterado);

c) HiperNac-15min: condição na qual consideramos como completa a estabilização dos efeitos causados pela solução HiperNac sobre os transientes de Ca^{2+} , considerando $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1 \text{ mM}$ e $[\text{Na}^+]_o = 190 \text{ mM}$ (concentração destes íons na solução HiperNac); $[\text{Na}^+]_i = 20 \text{ mM}$ (estimativa de $[\text{Na}^+]_i$ na condição de inibição da ATPase Na^+-K^+ , Despa & Bers, 2003 e considerando inibição da ATPase Na^+-K pela hiperosmolaridade, Whalley *et al.*, 1993).

Foram simulados, nas três condições descritas acima, transientes de Ca^{2+} , a corrente de membrana mediada pela NCX e a relação corrente-tensão (curva I-V) deste transportador.

3.9 Análise estatística dos dados

Os dados (em valores absolutos ou como porcentagens do valor de controle) estão apresentados como média acompanhada pelo respectivo erro-padrão da média (EPM).

A análise do curso temporal dos efeitos das soluções-testes sobre as contrações e transientes de Ca^{2+} foi realizada por análise de variância bifatorial (soluto e tempo de exposição como fatores) e as médias foram comparadas *post-hoc* pelo teste de Bonferroni. Valores de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ e LF na presença das diferentes soluções foram comparados por análise de variância monofatorial, seguida pelo teste de Dunnett para comparação com os valores controles. Utilizou-se o teste t de Student para comparar dados obtidos em solução NT antes e após aplicação da solução-teste, para avaliação da reversibilidade dos efeitos da mesma. O nível de significância estatística foi estabelecido como $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism (ver. 4, GraphPad Software, Inc, EUA).

4 Resultados

4 Resultados

4.1 Calibração do indicador indo-1

Com a realização dos protocolos de calibração do indicador indo-1, obtivemos os resultados apresentados na tabela 4.1. Adotamos como R_{\max} o limite superior de seu IC95% (0,7973), e R_{\min} o limite inferior de seu IC95% (0,2344) (Gomes *et al.*, 1998), e o valor de β como a média das determinações. Estes parâmetros possibilitaram a conversão dos sinais de fluorescência em $[Ca^{2+}]_i$ compatíveis com dados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Bassani & Bassani, 2003).

Tabela 4.1 – Parâmetros para calibração do indicador indo-1. Foram realizadas duas repetições dos protocolos para obtenção de R_{\max} , R_{\min} e β . Os parâmetros são adimensionais. $n = 20$.

	Média \pm EPM	IC 95%
R_{\max}	0,75 \pm 0,02	0,71 a 0,79
R_{\min}	0,25 \pm 0,01	0,23 a 0,29
β	1,81 \pm 0,16	1,71 a 1,98

4.2 Efeito do aumento da osmolaridade extracelular sobre a amplitude do encurtamento celular e transiente de Ca^{2+}

Utilizando os *set-ups* experimentais descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2, foram registrados contrações celulares e transientes de Ca^{2+} . Na Figura 4.1 são apresentados os registros de uma contração e um transiente de Ca^{2+} típicos, evocados por estimulação elétrica (*twitch*, Figura 4.1-A) e por perfusão com solução Caf-NaCa (cafeína; Figura 4.1-B).

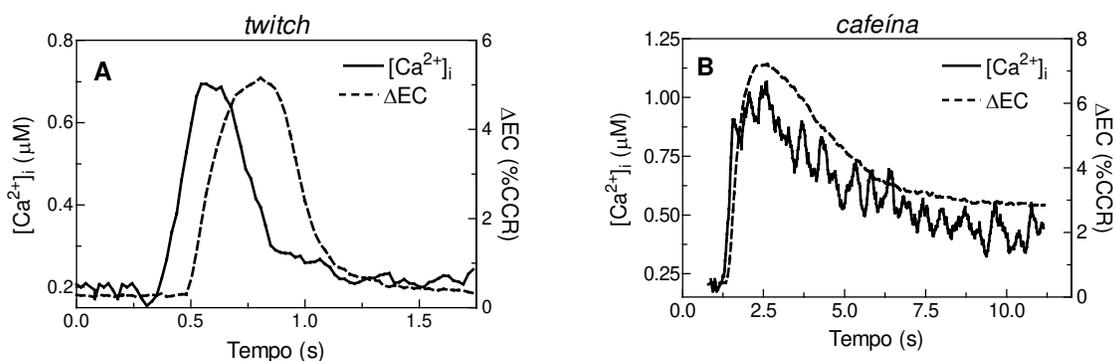


Figura 4.1 – Registros de transiente de Ca^{2+} (linhas contínuas) e contração celular (linhas tracejadas) típicos na condição controle, induzidos por (A) estimulação elétrica a 0,5 Hz (*twitch*) e (B) aplicação de cafeína (Caf-NaCa). CCR = comprimento celular em repouso, ΔEC = amplitude do encurtamento celular.

O valor médio da amplitude do encurtamento celular (ΔEC) em regime permanente, registrado durante a perfusão dos miócitos com solução NT, foi de $4,62 \pm 0,48$ %CCR ($n=26$). A amplitude média do transiente de Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) nesta condição foi de $0,651 \pm 0,052$ μM ($n=28$), e a concentração intracelular diastólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$) igual a $0,209 \pm 0,011$ μM ($n=28$).

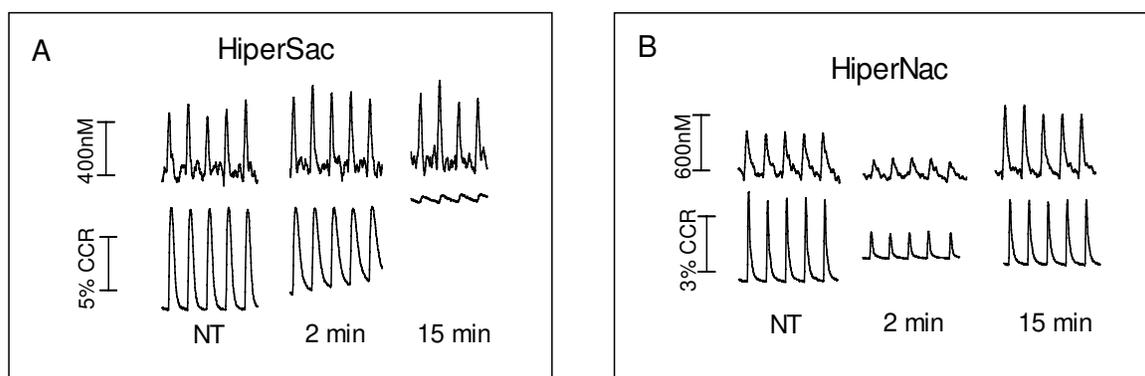


Figura 4.2 – Efeito da perfusão dos miócitos com solução HiperSac (A) e HiperNac(B) sobre transientes de Ca^{2+} (registros superiores) e contrações celulares (registros inferiores) registrados em miócitos cardíacos isolados de rato. CCR = comprimento celular em repouso. Vide texto para detalhes.

Na Figura 4.2 estão apresentados registros de transientes de Ca^{2+} e encurtamento celular em três condições: condição controle (NT), 2 e 15 min após a aplicação de solução

HiperSac (Figura 4.2-A) e HiperNac (Figura 4.2-B). Desta maneira, podemos observar qualitativamente os efeitos gerados por estas soluções sobre as variáveis analisadas. As figuras subseqüentes apresentam o comportamento destas variáveis durante a perfusão dos miócitos com soluções hiperosmóticas.

O curso temporal dos efeitos das soluções HiperNac e HiperSac sobre ΔEC está apresentado na Figura 4.3-A. Após um período de cerca de 2 minutos de perfusão dos miócitos com solução HiperNac, ΔEC foi reduzida para cerca de 10% do valor controle (Tabela 4.2). Um comportamento bastante semelhante foi observado quando o soluto foi a sacarose, porém após os 5 primeiros minutos, os miócitos perfundidos com HiperNac apresentaram recuperação de ΔEC para aproximadamente 70% do valor controle, o que não ocorreu quando a solução foi HiperSac (Tabela 4.3). O efeito da hiperosmolaridade sobre ΔEC foi dependente do tempo e do tipo de soluto (análise de variância bifatorial; Tabela 4.4). A interação soluto x tempo ($p < 0,01$) indica que a diferença entre solutos foi dependente do tempo.

A variação de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ao longo dos 15 minutos de perfusão com solução HiperNac e HiperSac está apresentada na Figura 4.3-B e nas Tabelas 4.2 e 4.3. A perfusão com HiperNac deprimiu $\Delta[Ca^{2+}]_i$ para cerca de 50% do valor controle nos 3 minutos iniciais. Após esse período, $\Delta[Ca^{2+}]_i$ apresentou lenta recuperação, estabilizando-se em 50% acima do valor controle. Note que o curso temporal da variação de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ foi bastante semelhante ao da ΔEC . Quando a perfusão foi realizada com HiperSac, $\Delta[Ca^{2+}]_i$ não apresentou variação ao longo do tempo. Assim, esta variável apresentou comportamento diferente para diferentes solutos e esta diferença foi dependente do tempo ($p < 0,01$ para a interação soluto x tempo, Tabela 4.5).

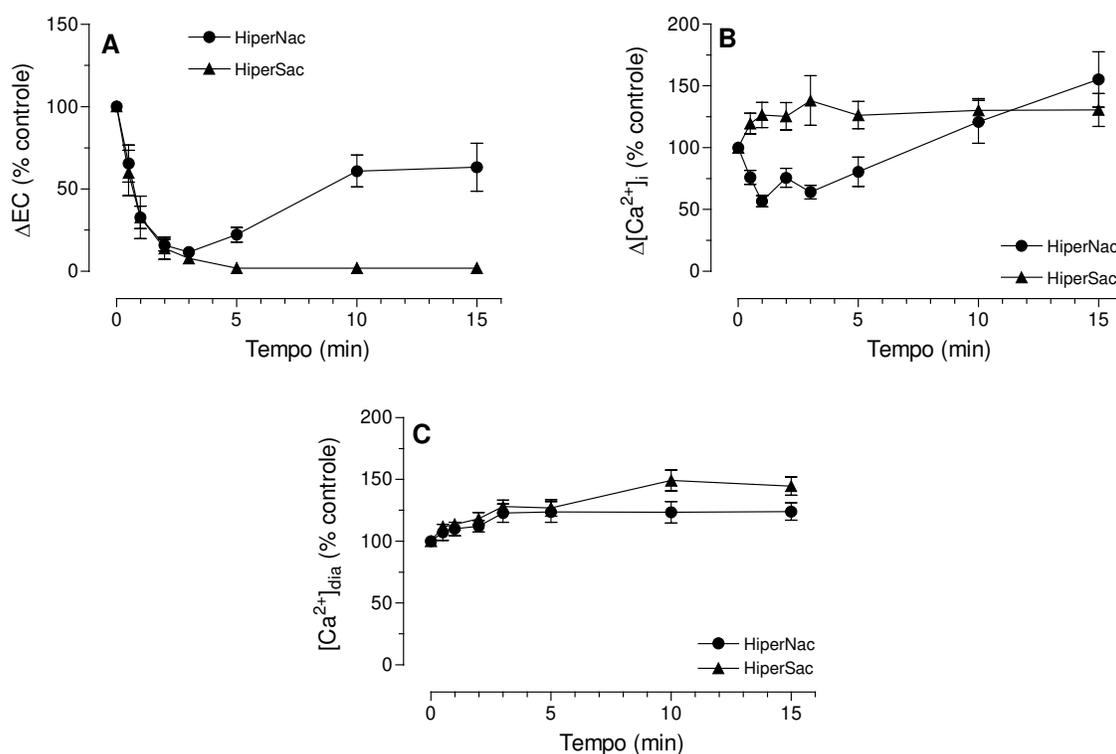


Figura 4.3 – Curso temporal dos efeitos das soluções HiperNac e HiperSac sobre: A) amplitude do encurtamento celular (ΔEC); B) amplitude do transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) e C) concentração intracelular diastólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{dia}$). O primeiro ponto representa a situação controle (perfusão com solução NT). Os pontos representam as médias e as barras, o EPM

O curso temporal dos efeitos das soluções HiperNac e HiperSac sobre $[Ca^{2+}]_{dia}$ está apresentado na Figura 4.3-C. Podemos observar, com o tempo de exposição a ambos os solutos, um aumento desta variável, que se manteve até o final do protocolo, estabilizando-se em 25% (HiperNac) e 45% (HiperSac) acima do valor controle (Tabelas 4.2, 4.3). O efeito da hiperosmolaridade sobre $[Ca^{2+}]_{dia}$ foi diferente para diferentes solutos e foi dependente do tempo de perfusão com solução-teste; no entanto, o efeitos dos solutos foram qualitativamente semelhantes ($p > 0,05$ para interação soluto x tempo, Tabela 4.6).

Tabela 4.2 – Curso temporal dos efeitos da solução HiperNac sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$. A primeira coluna (0 min) representa a situação controle (perfusão com solução NT). Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n).

	Tempo de exposição à solução HiperNac (min)							
	0	0,5	1	2	3	5	10	15
ΔEC	100 (16)	65,46 \pm 11,18 (7)	32,69 \pm 6,82 (8)	15,94 \pm 3,56 (11)	11,57 \pm 2,14 (9)	22,24 \pm 4,35 (9)	60,8 \pm 9,64 (9)	63,15 \pm 14,61 (8)
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	100 (18)	75,95 \pm 5,71 (7)	56,85 \pm 4,45 (8)	75,63 \pm 7,56 (17)	64,13 \pm 5,65 (9)	80,55 \pm 11,9 (9)	121,00 \pm 17,46 (9)	155,20 \pm 22,28 (13)
$[Ca^{2+}]_{dia}$	100 (18)	107,30 \pm 6,57 (7)	110,00 \pm 5,45 (8)	112,10 \pm 4,66 (17)	122,80 \pm 7,48 (9)	123,80 \pm 8,32 (9)	123,50 \pm 8,70 (9)	124,00 \pm 7,14 (13)

Tabela 4.3 – Curso temporal dos efeitos da solução HiperSac sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$. A primeira coluna (0 min) representa a situação controle (perfusão com solução NT). Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n).

	Tempo de exposição à solução HiperSac (min)							
	0	0,5	1	2	3	5	10	15
ΔEC	100 (10)	59,84 \pm 13,74 (10)	32,73 \pm 12,93 (10)	13,98 \pm 6,75 (7)	7,80 \pm 2,11 (4)	0 ^a (10)	0 ^a (10)	0 ^a (10)
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	100 (10)	119,60 \pm 8,31 (10)	126,50 \pm 10,32 (10)	125,40 \pm 11,00 (10)	138,10 \pm 20,12 (5)	126,30 \pm 10,95 (8)	130,20 \pm 9,59 (9)	130,60 \pm 13,32 (8)
$[Ca^{2+}]_{dia}$	100 (10)	111,70 \pm 3,73 (10)	113,60 \pm 3,77 (10)	118,20 \pm 5,02 (10)	128,00 \pm 5,23 (5)	126,90 \pm 6,65 (8)	149,10 \pm 8,39 (9)	144,60 \pm 7,48 (8)

^a ΔEC abaixo do limite de detecção do DBV.

Tabela 4.4 - Análise de variância bifatorial do efeito do soluto (NaCl e sacarose) e do tempo sobre ΔEC durante um *twitch*. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.2 e 4.3.-

Varição	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Soluto	1	17600	35,87	< 0,01
Tempo	7	12770	26,02	< 0,01
Interação Soluto x Tempo	7	3214	6,551	< 0,01
Resíduo	123	490,6		

Tabela 4.5 - Análise de variância bifatorial do efeito do soluto (NaCl e sacarose) e do tempo sobre $\Delta[Ca^{2+}]_i$ durante um *twitch*. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.2 e 4.3.

Varição	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Soluto	1	5691	4,318	< 0,01
Tempo	7	39470	29,95	< 0,01
Interação Soluto x Tempo	7	39150	4,344	< 0,01
Resíduo	139	1318		

Tabela 4.6 - Análise de variância bifatorial do efeito do soluto (NaCl e sacarose) e do tempo sobre $[Ca^{2+}]_{dia}$ durante um *twitch*. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.2 e 4.3.

Varição	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Soluto	1	3182	9,662	< 0,01
Tempo	7	2605	7,910	< 0,01
Interação Soluto x Tempo	7	397,5	1,207	0,3029
Resíduo	139	329,4		

4.3 Aumento iso e hiperosmótico da $[Na^+]_o$

Na Figura 4.4, estão apresentados os cursos temporais dos efeitos sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$ causados pelo aumento da $[Na^+]_o$ sem aumento de osmolaridade, partindo do nível isosmótico com relação a NT (*i.e.*, Hipo-Tyr como solução controle) e da condição hiperosmótica (*i.e.*, HiperSac como solução controle) (vide item 3.7.2). O efeito do aumento de ambos $[Na^+]_o$ e osmolaridade pela solução HiperNac foi novamente apresentado nesta figura para comparação. Para a condição de aumento isosmótico de $[Na^+]_o$, os valores controles em solução Hipo-Tyr foram: $\Delta EC = 1,73 \pm 0,28$ %CCR (n=12), $\Delta[Ca^{2+}]_i = 0,399 \pm 0,042$ μM (n=13) e $[Ca^{2+}]_{dia} = 0,203 \pm 0,016$ μM (n=14). Para a condição de aumento hiperosmótico de $[Na^+]_o$, os valores controles em solução HiperSac foram: $\Delta EC = 0,73 \pm 0,04$ %CCR (n=6), $\Delta[Ca^{2+}]_i = 0,659 \pm 0,155$ μM (n=6) e $[Ca^{2+}]_{dia} = 0,237 \pm 0,022$ μM (n=6).

Quando os miócitos foram perfundidos com solução Hipo-Cal ($\uparrow[Na^+]_o$ iso), ΔEC sofreu pequena redução inicial, seguida de recuperação e estabilização em cerca de 38% acima do valor controle (Figura 4.4-A e Tabela 4.7). Note que, qualitativamente, este comportamento se aproximou do observado quando a perfusão foi realizada com HiperNac. Porém, quando $[Na^+]_o$ foi aumentada na condição de hiperosmolaridade ($\uparrow[Na^+]_o$ hiper; Figura 4.4-A e Tabela 4.8), ΔEC sofreu grande depressão, atingindo cerca de 5% do valor controle, e se manteve nestes níveis durante os 15 min de perfusão com a solução-teste. A variação de ΔEC foi diferente para diferentes níveis de osmolaridade e esta diferença foi dependente do tempo ($p < 0,01$ para interação osmolalidade x tempo, Tabela 4.9). O comportamento apresentado por ΔEC sugere que o aumento de $[Na^+]_o$ não é o principal fator que causa a redução inicial desta variável, havendo a necessidade de aumento concomitante de osmolaridade.

$\Delta[Ca^{2+}]_i$, na condição " $\uparrow[Na^+]_o$ iso", apresentou um aumento monofásico de aproximadamente 30% após 10 min de perfusão com a solução-teste (Figura 4.4-B e Tabela 4.7). Porém, na condição " $\uparrow[Na^+]_o$ hiper", $\Delta[Ca^{2+}]_i$ apresentou uma redução transitória para cerca de 60% do valor controle nos primeiros 3 min de perfusão com a solução-teste, seguida de recuperação e estabilização em aproximadamente 90% do valor controle (Figura 4.4-B e Tabela 4.8). A redução inicial desta variável foi semelhante ao observado quando a solução foi HiperNac, sugerindo novamente que o aumento da osmolaridade concomitante com o aumento de $[Na^+]_o$ é necessário para a variação inicial

da $\Delta[Ca^{2+}]_i$. No entanto, o aumento tardio de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ parece estar associado apenas ao aumento de $[Na^+]_o$. A análise de variância indicou que estes efeitos são diferentes para diferentes níveis de osmolaridade e a interação significativa osmolaridade x tempo ($p < 0,05$) indica que esta diferença foi dependente do tempo de perfusão dos miócitos com a solução-tese (Tabela 4.10).

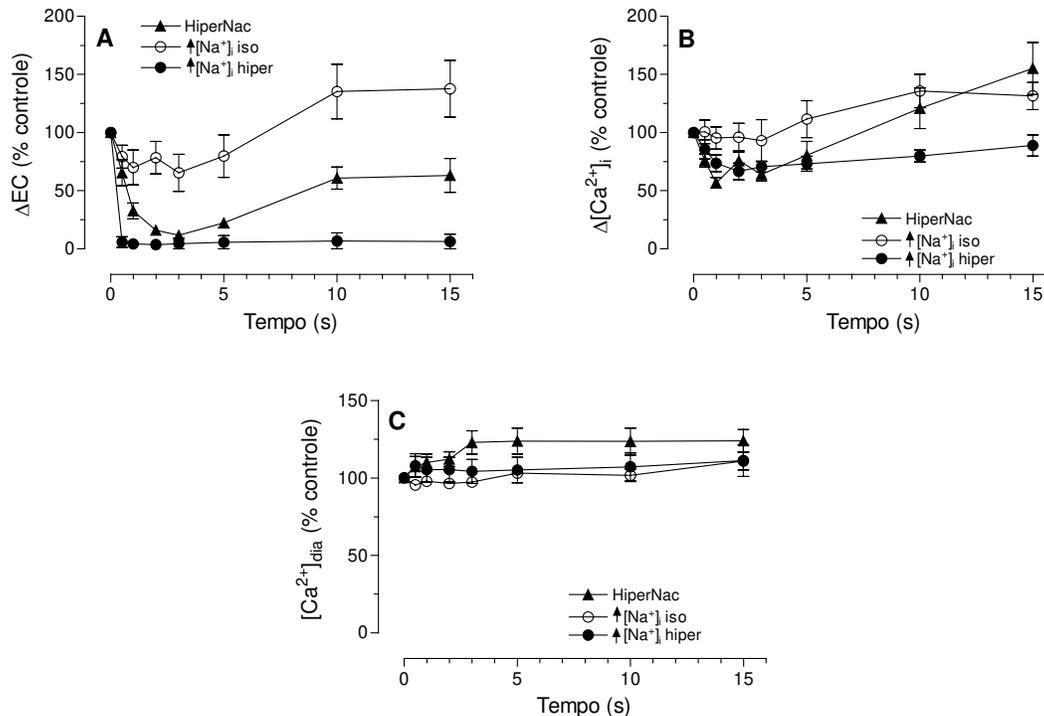


Figura 4.4 – Curso temporal do efeito causado pelo aumento da $[Na^+]_o$ nas condições iso e hiperosmótica sobre: A) amplitude do encurtamento celular (ΔEC); B) amplitude do transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) e C) concentração intracelular diastólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{dia}$). O aumento da $[Na^+]_o$ sem aumento de osmolalidade foi testado para um valor de osmolalidade (~ 280 mOsm/l) referente à solução NT ($\uparrow[Na^+]_o$ iso) e partindo-se de uma osmolalidade já previamente incrementada em 80 mOsm/l ($\uparrow[Na^+]_o$ hiper) pela pré-perfusão com HiperSac. Para comparação, foi incluída a resposta ao aumento concomitante da $[Na^+]_o$ e osmolalidade (HiperNac). O primeiro ponto representa a situação controle (perfusão com solução HipoTyr, HiperSac ou NT para $\uparrow[Na^+]_o$ iso, $\uparrow[Na^+]_o$ hiper e HiperNac, respectivamente). Os pontos representam as médias e as barras, o EPM.

A variação de $[Ca^{2+}]_{dia}$ ao longo do tempo pode ser observada na Figura 4.4-C e Tabelas 4.7 e 4.8. Seu curso temporal apresentou diferença significativa em função do

nível de osmolalidade utilizado ($\uparrow[\text{Na}^+]_o$ iso ou $\uparrow[\text{Na}^+]_o$ hiper) e do tempo, porém os efeitos dos tratamentos não foram divergentes ($p > 0,05$ para interação osmolalidade x tempo, Tabela 4.11). Quando os miócitos foram perfundidos com solução Hipo-Cal ($\uparrow[\text{Na}^+]_o$ iso), não houve modificação significativa de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$ durante todo o tempo de perfusão com a solução teste. O mesmo ocorreu quando a $[\text{Na}^+]_o$ foi aumentada na condição de hiperosmolaridade, diversamente do que ocorreu durante perfusão com HiperNac. Estes resultados sugerem que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$ está associado unicamente ao aumento da osmolaridade do meio.

Tabela 4.7 – Curso temporal do efeito do aumento isosmótico de $[\text{Na}^+]_o$ sobre ΔEC , $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$. A primeira coluna (0 min) representa a situação controle (perfusão com solução Hipo-Tyr). Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n).

	Tempo de perfusão na condição $\uparrow[\text{Na}^+]_o$ iso (min)							
	0	0,5	1	2	3	5	10	15
ΔEC	100 (12)	79,35 $\pm 9,90$ (9)	69,97 $\pm 14,87$ (9)	78,40 $\pm 13,93$ (10)	65,42 $\pm 15,81$ (8)	79,84 $\pm 18,29$ (9)	135,30 $\pm 23,41$ (8)	137,70 $\pm 24,49$ (12)
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$	100 (14)	100,60 $\pm 10,13$ (10)	95,41 $\pm 9,57$ (9)	96,03 $\pm 11,83$ (9)	93,11 $\pm 18,04$ (9)	111,50 $\pm 15,93$ (10)	135,90 $\pm 14,42$ (8)	131,50 $\pm 11,76$ (13)
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$	100 (14)	95,44 $\pm 2,94$ (10)	97,87 $\pm 2,47$ (9)	96,39 $\pm 2,60$ (9)	97,35 $\pm 2,72$ (8)	103,10 $\pm 2,18$ (11)	101,80 $\pm 4,02$ (8)	110,90 $\pm 5,66$ (13)

Tabela 4.8 – Curso temporal do efeito do aumento hiperosmótico de $[Na^+]_o$ sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$. A primeira coluna (0 min) representa a situação controle (perfusão com solução HiperSac). Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n).

	Tempo de perfusão na condição $\uparrow[Na^+]_o$ hiper (min)							
	0	0,5	1	2	3	5	10	15
ΔEC	100 (6)	5,84 $\pm 4,59$ (6)	4,22 $\pm 3,46$ (6)	3,69 $\pm 2,25$ (6)	4,48 $\pm 2,19$ (6)	5,71 $\pm 2,73$ (6)	6,76 $\pm 3,16$ (6)	6,20 $\pm 2,13$ (6)
$\Delta[Ca^{2+}]_i$	100 (6)	85,57 $\pm 8,27$ (6)	73,63 $\pm 7,15$ (6)	66,63 $\pm 7,25$ (6)	70,67 $\pm 4,81$ (6)	73,26 $\pm 6,23$ (6)	79,85 $\pm 5,04$ (6)	88,99 $\pm 9,15$ (6)
$[Ca^{2+}]_{dia}$	100 (6)	108,00 $\pm 7,57$ (6)	105,30 $\pm 7,94$ (6)	104,90 $\pm 7,83$ (6)	104,20 $\pm 7,79$ (6)	105,10 $\pm 8,25$ (6)	107,10 $\pm 9,08$ (6)	111,20 $\pm 10,36$ (6)

Tabela 4.9 - Análise de variância bifatorial do efeito do nível de osmolaridade e do tempo sobre ΔEC durante um *twitch*. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.7 e 4.8.

Varição	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Nível de osmolaridade	2	91500	70,50	< 0,01
Tempo	7	15420	11,88	< 0,01
Interação Nível de osmolaridade x Tempo	14	4159	3,204	< 0,01
Resíduo	172	1298		

Tabela 4.10 - Análise de variância bifatorial do efeito do nível de osmolaridade e do tempo sobre $\Delta[Ca^{2+}]_i$ durante um *twitch*. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.7 e 4.8

Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Soluto	2	13970	11,45	< 0,01
Tempo	7	8140	6,67	< 0,01
Interação Nível de osmolaridade x Tempo	14	2408	1,973	0,0218
Resíduo	189	1220		

Tabela 4.11 - Análise de variância bifatorial do efeito do nível de osmolaridade e do tempo sobre $[Ca^{2+}]_{dia}$. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.7 e 4.8.

Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Soluto	2	4600	16,40	< 0,01
Tempo	7	658,5	2,347	0,0254
Interação Nível de osmolaridade x Tempo	14	240,8	0,8585	0,6048
Resíduo	192	280,5		

4.4 Diagrama Ca^{2+} - encurtamento

O diagrama Ca^{2+} - encurtamento é uma ferramenta utilizada no estudo da relação entre $[Ca^{2+}]_i$ e a ativação dos miofilamentos (Spurgeon *et al.*, 1992). Neste diagrama, a amplitude da contração num dado instante (no caso ΔEC) é cotejada em função do valor de $[Ca^{2+}]_i$. Portanto, quando traçamos o diagrama correspondente a uma contração e o respectivo transiente de Ca^{2+} , obtemos um laço, como os apresentados na Figura 4.5. Neste trabalho, o diagrama foi utilizado para a análise da dissociação da resposta de ΔEC e $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ao aumento da osmolaridade do meio extracelular.

Optamos por traçar o diagrama Ca^{2+} -encurtamento em três situações: condição controle (NT ou Hipo-Tyr), 2 minutos após a aplicação de solução hiperosmótica (ponto de máxima depressão contrátil) e 15 minutos após a aplicação de solução hiperosmótica (após estabilização da atividade contrátil e transientes de Ca^{2+}). Na Figura 4.5-A, temos o diagrama Ca^{2+} -encurtamento referente à perfusão dos miócitos com solução HiperNac. Podemos observar que após dois minutos de perfusão com esta solução, ΔEC e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ apresentaram acentuada redução, porém a forma do laço nesta condição se manteve bastante próxima à da situação controle, o que pode indicar que a dinâmica entre o transiente de Ca^{2+} e contração celular não foi alterada. Após a estabilização da ΔEC e da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 4.5-A, 15 min), observamos uma recuperação parcial do laço, na qual o miócito apresentou um estado de contratura diastólica persistente, na ausência de elevação de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$.

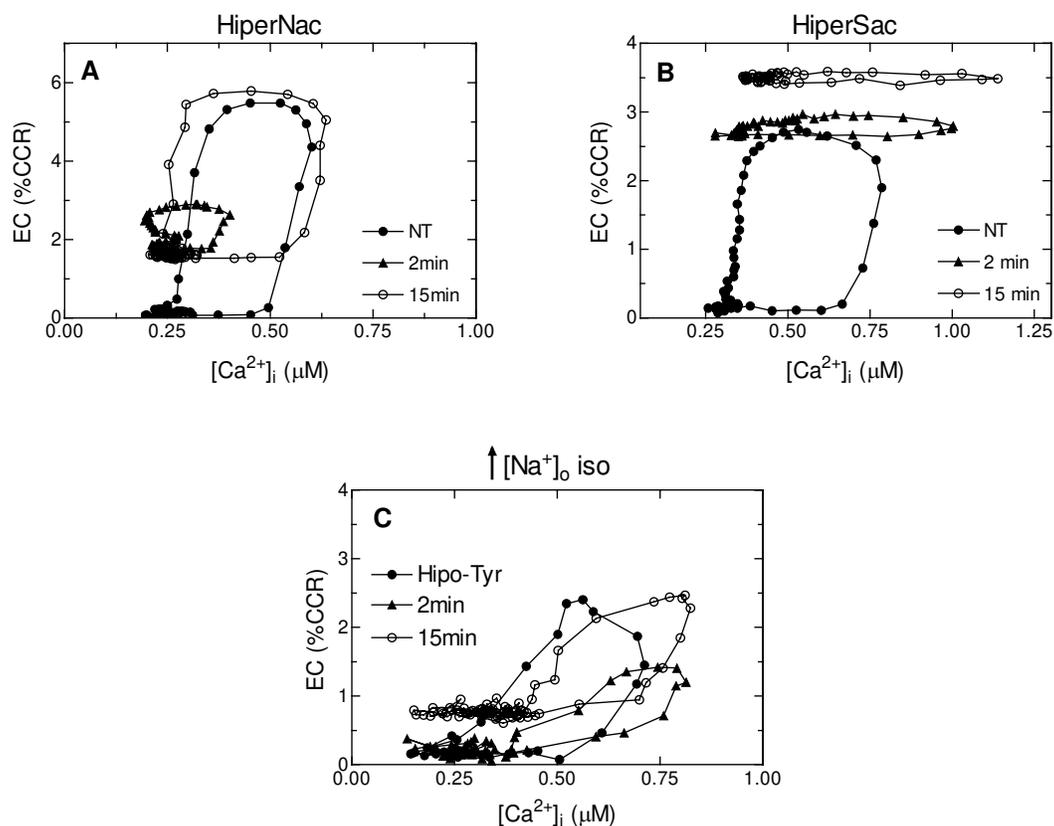


Figura 4.5 - Diagrama Ca^{2+} - encurtamento típico em três condições experimentais: antes (controle; NT ou Hipo-Tyr), e 2 e 15 min após a aplicação de solução hiperosmótica, HiperNac (A), HiperSac (B), ou aumento isosmótico de $[\text{Na}^+]_o$ (Hipo-Cal, C). %CCR = porcentagem do comprimento celular em repouso.

Na Figura 4.5-B, temos o diagrama Ca^{2+} -encurtamento referente à perfusão dos miócitos com solução HiperSac. Neste caso, podemos observar, que após 2 minutos de exposição a HiperSac, ΔEC sofreu uma redução bastante acentuada, apesar de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ter apresentado um pequeno aumento, o que poderia indicar uma mudança da relação entre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ativação da contração. É importante observar que a depressão contrátil causada pela hiperosmolaridade não é resultado de uma diminuição do pico da contração, mas sim devida a um estado de contratura diastólica que se acentuou ao longo da perfusão com solução HiperSac. Após o período de estabilização, podemos observar um aumento ainda maior de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ sem recuperação da ΔEC . Neste caso, pode-se destacar ainda que a célula se encontra em um estado de contratura diastólica mais intenso que aquele atingido no pico de encurtamento celular na condição controle. Para analisar este estado de contratura diastólica apresentado pelo miócito quando perfundido com HiperNac e HiperSac, traçamos o diagrama Ca^{2+} -encurtamento de um *twitch* na condição de aumento isosmótico de $[\text{Na}^+]_o$ (Figura 4.5-C). Pode-se observar que o miócito apresentou uma contratura diastólica bem reduzida, sugerindo que esta possa ser associada ao grau de tonicidade efetiva do meio (*i.e.*, tonicidade HiperSac > tonicidade HiperNac > tonicidade HipoCal).

4.5 Carga de Ca^{2+} do RS

A $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ estimada na condição controle (NT) foi de $143,0 \pm 8,6$ $\mu\text{moles/l}$ de citosol ($n=15$) e $160,4 \pm 10,2$ $\mu\text{moles/l}$ de citosol ($n=8$) em células posteriormente perfundidas com as soluções HiperNac e HiperSac, respectivamente. Esta estimativa foi realizada também após 2 e 15 minutos do início da perfusão dos miócitos com solução hiperosmótica. Estes resultados estão apresentados na Figura 4.6 e na Tabela 4.12. Podemos observar que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ não sofreu variação significativa (Tabelas 4.13 e 4.14) durante aumento da osmolaridade por adição de NaCl ou sacarose.

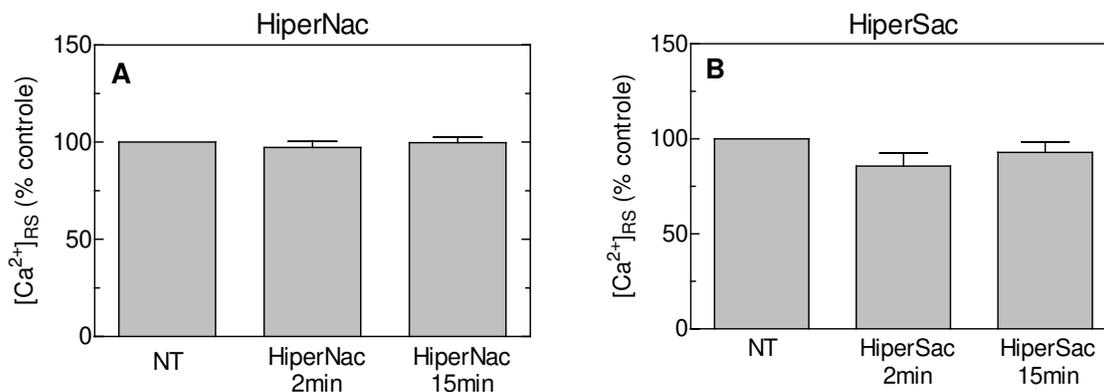


Figura 4.6 – Variação da carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) nas condições controle (NT), e 2 e 15 minutos após a aplicação da solução hiperosmótica, HiperNac (A) e HiperSac (B). Médias \pm EPM.

Tabela 4.12 – Efeito da exposição às soluções HiperNac e HiperSac sobre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. As medições foram realizadas antes (NT), 2 e 15 minutos após o início da perfusão com solução hiperosmótica. Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n).

	NT	2 min	15 min
HiperNac	100 (15)	97,35 \pm 3,04 (9)	99,78 \pm 2,87 (13)
HiperSac	100 (8)	85,74 \pm 6,78 (5)	92,92 \pm 5,46 (7)

Tabela 4.13 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. Foram analisados os dados referentes à Tabela 4.12.

Varição	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tempo	2	22,32	0,3884	0,6811
Resíduo	34	57,46		
Total	36			

Tabela 4.14 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre $[Ca^{2+}]_{RS}$. Foram analisados os dados referentes à Tabela 4.12.

Varição	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Soluto	2	318,7	2,491	0,1125
Resíduo	17	128		
Total	19			

4.6 Liberação Fracional de Ca^{2+} do RS durante um twitch (LF)

A LF (percentual) estimada na condição controle (NT) foi de $48,6 \pm 4,5$ % (n=14) e $51,9 \pm 5,5$ % (n=8) em células posteriormente perfundidas com as soluções HiperNac e HiperSac, respectivamente, ou seja, em cada contração, foram liberados aproximadamente 50% da quantidade total de Ca^{2+} no interior do RS (cerca de $75 \mu M/l$ de citosol). Na Figura 4.7 e na Tabela 4.15, apresentamos as estimativas de LF após aumento da osmolaridade extracelular. Quando os miócitos foram perfundidos com solução HiperNac, LF apresentou variação dependente do tempo ($p < 0,05$, Tabela 4.16), com aumento significativo após 15 min de perfusão ($p < 0,05$, teste de Dunnett). No caso da solução HiperSac, não houve variação significativa de LF (Tabela 4.17).

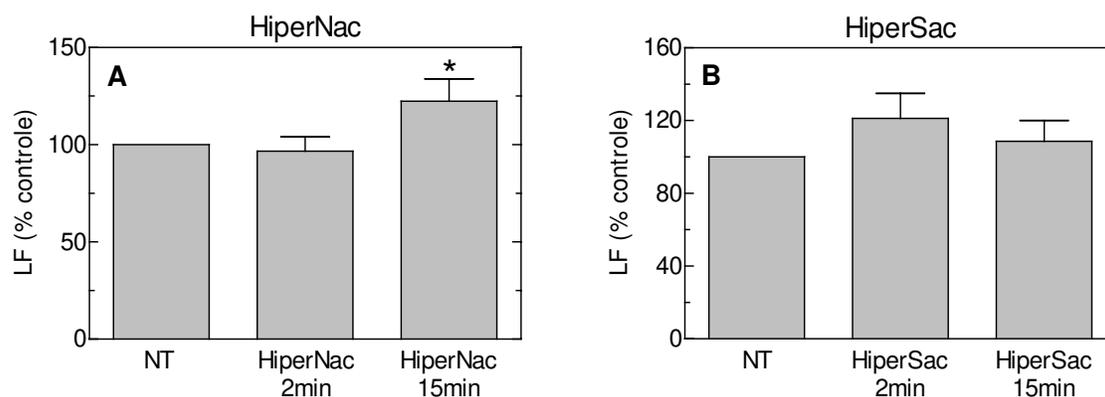


Figura 4.7 – Liberação fracional de Ca^{2+} do RS (LF) nas condições controle (NT), 2 e 15 minutos após a aplicação da solução hiperosmótica, HiperNac (A) e HiperSac (B). * $p < 0,05$ em comparação com NT, teste de Dunnett.

Tabela 4.15 – Efeito da exposição às soluções HiperNac e HiperSac sobre LF. As medições foram realizadas antes (NT), 2 e 15 minutos após o início da perfusão com solução hiperosmótica. Valores expressos em porcentagem do valor controle. Média \pm EPM (n). * $p < 0,05$ em comparação com NT, teste de Dunnett.

	NT	2 min	15 min
HiperNac	100 (14)	96,65 \pm 7,38 (8)	122,4 \pm 11,54 * (13)
HiperSac	100 (8)	121,3 \pm 13,68 (4)	108,6 \pm 11,44 (7)

Tabela 4.16 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre LF. Foram analisados os dados referentes à Tabela 4.15.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	2	2451	3,95	0,0308
Resíduo	28	620,5		
Total	30			

Tabela 4.17 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre LF. Foram analisados os dados referentes à Tabela 4.15.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	2	609,5	1,26	0,3104
Resíduo	16	483,8		
Total	18			

4.7 Reversibilidade do efeito osmótico

Com o objetivo de investigar a reversibilidade dos efeitos causados pelas soluções utilizadas neste trabalho, realizamos a comparação dos níveis de todas as variáveis medidas antes da aplicação das soluções hiperosmóticas (NT) e após sua remoção (lavagem). A Figura 4.8 e Tabela 4.18 apresentam a comparação entre os valores de ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$, $\Delta[Ca^{2+}]_{dia}$, $[Ca^{2+}]_{RS}$ e LF nestas condições, para a solução HiperNac. Podemos observar completa recuperação das variáveis, com exceção de $[Ca^{2+}]_{RS}$ que, apesar que não ter apresentado variação em resposta à solução HiperNac, aumentou significativamente após a lavagem (teste t de Student para amostras pareadas).

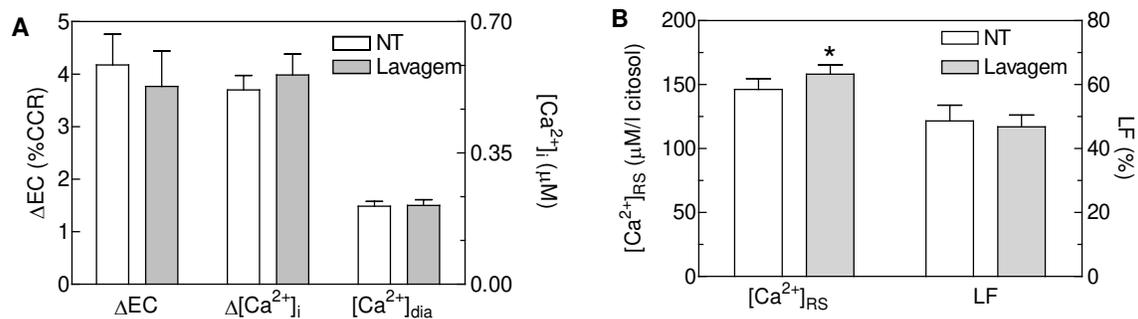


Figura 4.8 – Reversibilidade dos efeitos da solução HiperNac sobre: A) ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$; B) $\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ e LF. * $p < 0,05$ para NT *versus* Lavagem; teste t de Student para amostras pareadas.

A reversibilidade dos efeitos da solução HiperSac também foi analisada, e os resultados estão apresentados na Figura 4.9 e Tabela 4. Neste caso, ΔEC permaneceu reduzida após a lavagem, apesar de Ter havido aumento significativo de $\Delta[Ca^{2+}]_i$. As demais variáveis mostraram recuperação para seus respectivos valores iniciais.

Tabela 4.18 – Reversibilidade dos efeitos da solução HiperNac sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]_{dia}$, $\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ e LF. As medições foram realizadas na condição controle e 15 min após substituição de HiperNac por NT (lavagem). Média \pm EPM (n). * $p < 0,05$ para NT *versus* lavagem; teste t de Student para amostras pareadas.

	NT	Lavagem
ΔEC (%CCR)	$4,17 \pm 0,58$ (14)	$3,77 \pm 0,68$ (14)
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (μM)	$0,511 \pm 0,052$ (15)	$0,558 \pm 0,055$ (15)
$[Ca^{2+}]_{dia}$ (μM)	$0,208 \pm 0,013$ (15)	$0,210 \pm 0,015$ (15)
$\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ ($\mu M/l$ citosol)	$146,20 \pm 8,63$ (14)	$158,2 \pm 7,23$ * (14)
LF (%)	$48,6 \pm 4,9$ (13)	$46,8 \pm 3,6$ (13)

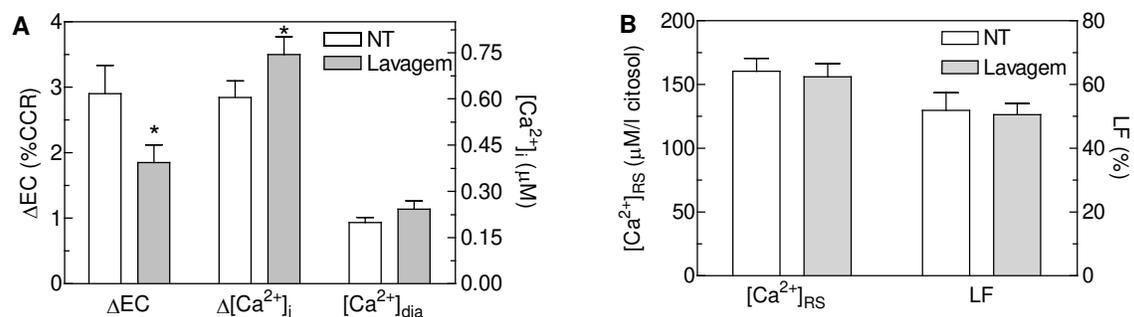


Figura 4.9 – Reversibilidade dos efeitos da solução HiperSac sobre: A) ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$; B) $\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ e LF. * $p < 0,05$ para NT *versus* lavagem; teste t de Student para amostras pareadas.

Tabela 4.19 – Reversibilidade dos efeitos da solução HiperSac sobre ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]_{dia}$, $\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ e LF. As medições foram realizadas na condição controle e 15 min após substituição de HiperSac por NT (lavagem). Média \pm EPM (n). * $p < 0,05$ para NT *versus* lavagem; teste t de Student para amostras pareadas.

	NT	Lavagem
ΔEC (%CCR)	2,85 \pm 0,48 (9)	1,85 \pm 0,26 * (9)
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (μM)	0,605 \pm 0,054 (9)	0,744 \pm 0,057 * (9)
$[Ca^{2+}]_{dia}$ (μM)	0,198 \pm 0,017 (9)	0,242 \pm 0,027 (9)
$\Delta[Ca^{2+}]_{RS}$ ($\mu M/l$ citosol)	160,4 \pm 10,2 (8)	156,0 \pm 10,4 (8)
LF (%)	51,9 \pm 5,5 (8)	50,6 \pm 3,4 (8)

4.8 $t_{1/2}$ de relaxamento ($t_{1/2-rel}$) e $t_{1/2}$ declínio de Ca^{2+} ($t_{1/2-Ca}$)

O curso temporal do relaxamento de contrações e decaimento dos transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica foi analisado por meio dos valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ (vide item 3.7.1), respectivamente. Para investigar a taxa de extrusão de Ca^{2+} via NCX, foram utilizados $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ de contratura evocada pela aplicação de cafeína durante pausa estimulatória (durante a aplicação de cafeína, o acúmulo de Ca^{2+} no interior do RS é inibido e o principal mecanismo responsável por reduzir $[Ca^{2+}]_i$ é a NCX).

Na Figura 4.10-A e na Tabela 4.20, estão apresentados os valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ de contrações e transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica na condição

controle (NT) e após perfusão com solução HiperNac. Pode-se observar que $t_{1/2-Ca}$ não sofreu variação significativa após adição de NaCl (Tabela 4.21), enquanto que $t_{1/2-rel}$ aumentou significativamente após 15 min de exposição (Tabela 4.22), ou seja, a fase de relaxamento da contração tornou-se mais lenta, embora a cinética da queda de $[Ca^{2+}]_i$ não tenha se alterado.

Os valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ de contraturas e transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína são apresentados na Figura 4.10-B e Tabela 4.20, nas mesmas condições descritas acima. HiperSac causou prolongamento de ambos os valores de $t_{1/2}$, (Tabelas 4.23 e 4.24) após 15 min de perfusão.

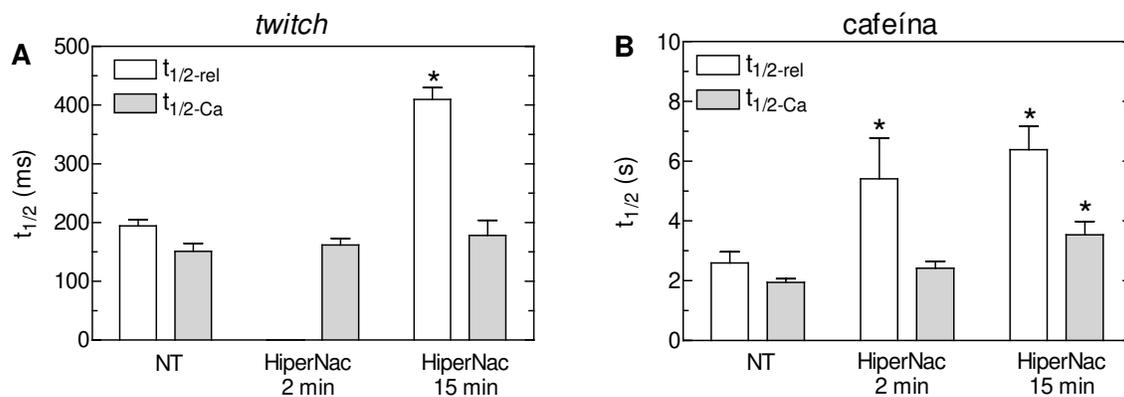


Figura 4.10 – Efeito da hiperosmolaridade induzida pela perfusão com solução HiperNac sobre os valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$. A) Contrações/transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica. A acentuada depressão contrátil impossibilitou a determinação de $t_{1/2-rel}$ de contrações após 2 min de perfusão com a solução-teste. B) Contraturas/transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína. * $p < 0,05$ em comparação com NT (análise de variância seguida de teste de Bonferroni).

Tabela 4.20 – Efeitos da solução HiperNac sobre $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$. As medições foram realizadas antes (NT) e 2 e 15 minutos após o início da perfusão com solução hiperosmótica. *twitch* = contração/transiente de Ca^{2+} evocado por estimulação elétrica. Média \pm EPM (n). * e **, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em comparação com NT (teste de Bonferroni).

	<i>twitch</i> (ms)		cafeína (s)	
	$t_{1/2-rel}$	$t_{1/2-Ca}$	$t_{1/2-rel}$	$t_{1/2-Ca}$
NT	194,3 \pm 10,8 (16)	150,9 \pm 13,9 (11)	2,6 \pm 0,3 (12)	1,9 \pm 0,1 (14)
2 min	§	161,7 \pm 11,4 (6)	5,4 \pm 1,4 * (7)	2,4 \pm 0,2 (9)
15 min	409,6 \pm 20,6 ** (5)	178,0 \pm 26,1 (5)	6,4 \pm 0,8 * (5)	3,5 \pm 0,4 ** (5)

§ a acentuada depressão contrátil impossibilitou a determinação desta variável.

Tabela 4.21 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre $t_{1/2-Ca}$ de transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.20.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	2	1273	0,6193	0,5489
Resíduo	19	2055		
Total	21			

Tabela 4.22 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre $t_{1/2-rel}$ de contrações evocadas por estimulação elétrica. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.20.

Varição	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	1	648575	32	< 0,01
Resíduo	31	19736		
Total	32			

Tabela 4.23 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre $t_{1/2-rel}$ de contraturas evocadas por aplicação de cafeína. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.20.

Varição	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	2	32,58	6,202	< 0,01
Resíduo	21	5,253		
Total	23			

Tabela 4.24 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperNac sobre $t_{1/2-Ca}$ de transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.20.

Varição	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	2	4,679	11,20	< 0,01
Resíduo	25	0,4178		
Total	27			

Os valores de $t_{1/2\text{-rel}}$ e $t_{1/2\text{-Ca}}$ de contrações e transientes de Ca^{2+} foram avaliados também após o aumento da osmolaridade extracelular por adição de sacarose (solução HiperSac), porém somente após 15 min de perfusão com esta solução-teste. Os resultados estão apresentados na Figura 4.11 e na Tabela 4.25. Na Figura 4.11-A, podemos observar que a solução HiperSac tornou o relaxamento das contrações mais lento (aumento de $t_{1/2\text{-rel}}$; $p < 0,01$; Tabela 4.26), mas sem alterar o $t_{1/2\text{-Ca}}$ (Tabela 4.27). Por outro lado, a mesma solução provocou aumento dos valores de $t_{1/2\text{-Ca}}$ e $t_{1/2\text{-rel}}$ de contraturas e transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína (Tabelas 4.28 e 4.29).

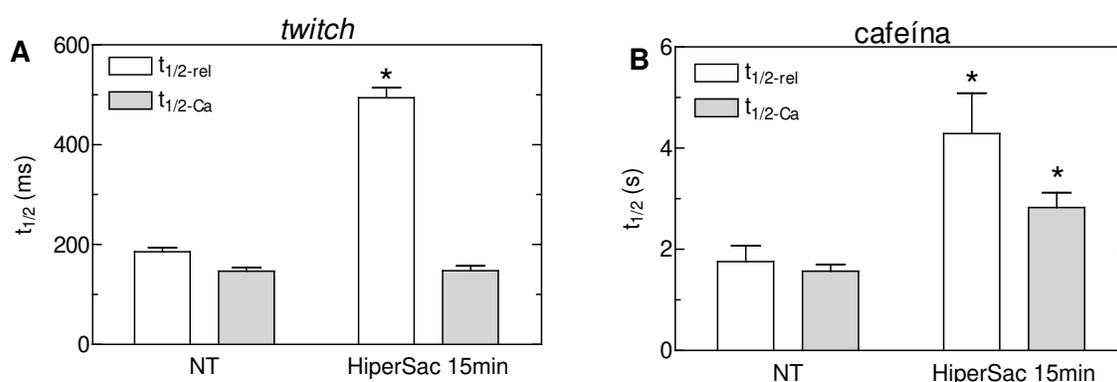


Figura 4.11 – Efeito da hiperosmolaridade induzida pela perfusão com solução HiperSac sobre os valores de $t_{1/2\text{-rel}}$ e $t_{1/2\text{-Ca}}$. A) Contrações/transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica. B) Contraturas/transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína. * $p < 0,05$ em comparação com NT (análise de variância monofatorial).

Tabela 4.25 – Efeitos da solução HiperSac sobre $t_{1/2\text{-rel}}$ e $t_{1/2\text{-Ca}}$. As medições foram realizadas antes (NT) e 2 e 15 minutos após o início da perfusão com solução hiperosmótica. *twitch* = contração/transiente de Ca^{2+} evocado por estimulação elétrica. Média \pm EPM (n). **, $p < 0,01$ em comparação com NT (análise de variância monofatorial).

	<i>twitch</i> (ms)		cafeína (s)	
	$t_{1/2\text{-rel}}$	$t_{1/2\text{-Ca}}$	$t_{1/2\text{-rel}}$	$t_{1/2\text{-Ca}}$
NT	185,9 \pm 7,8 (8)	146,7 \pm 6,9 (9)	1,7 \pm 0,3 (8)	1,5 \pm 0,1 (9)
15 min	494,0 \pm 20,9 ** (8)	147,8 \pm 9,2 (9)	4,3 \pm 0,8 ** (8)	2,83 \pm 0,3 ** (9)

Tabela 4.26 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre $t_{1/2-rel}$ de contrações evocadas por estimulação elétrica. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.25.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	1	380752	212	< 0,01
Resíduo	15	20551793		
Total	16			

Tabela 4.27 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre $t_{1/2-Ca}$ de transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.25.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	1	5,55	0,009	> 0,10
Resíduo	17	562,10		
Total	18			

Tabela 4.28 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre $t_{1/2-rel}$ de contraturas evocadas por aplicação de cafeína. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.25.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	1	25,66	9,38	< 0,01
Resíduo	15	2,73		
Total	16			

Tabela 4.29 - Análise de variância monofatorial do efeito do tempo de exposição à solução HiperSac sobre $t_{1/2-Ca}$ de transientes de Ca^{2+} evocados por aplicação de cafeína. Foram analisados os dados referentes às Tabelas 4.25.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Tempo	1	7,40	16,64	< 0,01
Resíduo	17	0,44		
Total	18			

Na Figura 4.12, estão apresentadas as variações dos valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ de *twitches* e contraturas induzidas por cafeína, expressos em porcentagem do valor controle. Como já descrito acima, observa-se que o aumento da osmolaridade induzido por aplicação de NaCl ou sacarose tornou a fase de relaxamento das contrações mais lenta, porém não alterou o curso tempo da fase de declínio de $[Ca^{2+}]_i$. Já na contratura de cafeína, ambos os solutos prolongaram o relaxamento e o declínio de $[Ca^{2+}]_i$. Estes resultados sugerem uma redução da extrusão de Ca^{2+} via NCX na condição de hiperosmolaridade.

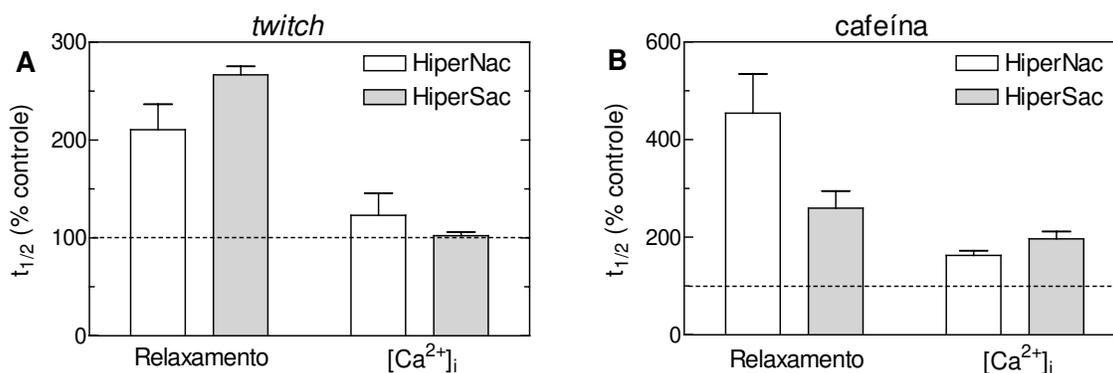


Figura 4.12 – Variação dos valores de $t_{1/2-rel}$ e $t_{1/2-Ca}$ durante *twitches* (A) e contraturas evocadas por cafeína (B), expressos em porcentagem dos valores controles, após 15 min de perfusão com HiperNac e HiperSac. A linha tracejada indica o valor controle (100%).

4.9 Simulação computacional

Paralelamente aos experimentos, realizamos um estudo do papel da NCX na atividade contrátil celular por meio de uma simulação computacional, utilizando o *software* LabHeart (versão 4.9.5, Puglisi & Bers, 2001). Na Figura 4.13, apresentamos os resultados desta simulação nas três condições descritas anteriormente (vide item 3.8.2). Podemos observar que o aumento apenas de $[Na^+]_o$, mas sem alteração de $[Na^+]_i$ (Figura 4.13-A, HiperNac 2min), causou uma diminuição do influxo de Ca^{2+} mediado pelo trocador (diminuição da componente positiva da corrente da NCX, I_{NCX}) e aumento do efluxo deste íon (aumento da componente negativa da I_{NCX}) durante um *twitch*, o que causa uma diminuição de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4.13-B, HiperNac 2min). Por outro lado, na condição HiperNac 15min, na qual assumimos ter ocorrido um aumento da $[Na^+]_i$ (vide item 3.8.2), observamos um aumento do influxo e diminuição do efluxo de Ca^{2+} via NCX durante um *twitch* (Figura 4.13-A; HiperNac 15min), gerando um aumento da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (Figura 4.13-B; HiperNac 15min) semelhante ao observado nos resultados experimentais (item 4.2).

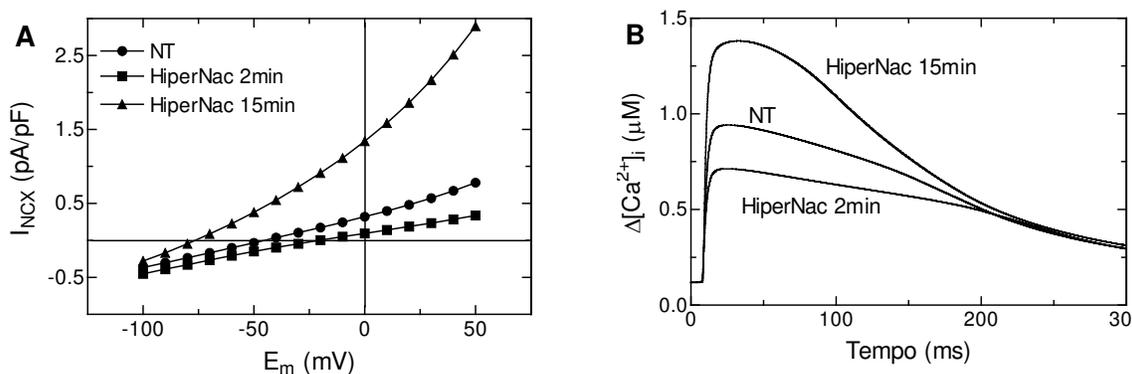


Figura 4.13 – Simulação computacional realizado nas três condições experimentais (ver texto). A) Relação entre valor de pico da corrente da NCX (I_{NCX}) e potencial de membrana (E_m). B) Transiente de Ca^{2+} . Assumimos $[Ca^{2+}]_{RS} = 180 \mu moles/l$ nas três condições experimentais.

5 Discussão

5 Discussão

5.1 Instrumentação

O sistema de microscopia desenvolvido neste trabalho (Figura 3.3) cumpriu todos os objetivos do projeto, incluindo baixo custo (aproximadamente US\$ 400,00) e dimensões reduzidas (aproximadamente 200 x 200 x 300 mm). Além disso, encontra-se em estudo atualmente em nosso laboratório a possibilidade de expansão do sistema para permitir a medição de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos isolados utilizando o indicador fluorescente fluo-3.

O sistema possui ampliação óptica suficiente para que a imagem de todo o miócito seja mostrada no monitor de vídeo. Desta maneira, foi possível realizar a medição do comprimento e largura do miócito na tela. Com o auxílio do DBV, foi possível também registrar variações do comprimento celular durante uma contração evocada por estimulação elétrica ou contratura induzida por cafeína. Os principais parâmetros destas contrações/contraturas (*e.g.*, ΔEC e $t_{1/2-rel}$) registradas por este sistema são similares aos descritos na literatura (Bassani & Bassani, 2002; Stones *et al.*, 2005).

Os testes realizados no sistema indicaram ausência de distorções ópticas ou paralaxe que interferissem na exatidão das medições, e que a relação $E_{DBV} : \Delta x$ (tensão de saída do DBV : deslocamento conhecido no monitor de vídeo) foi linear.

Como sugestão para o aperfeiçoamento futuro do sistema de microscopia, podemos citar a necessidade de um ajuste da ampliação óptica do sistema que permita aumentar o campo de visão e, assim, facilitar a escolha dos miócitos que serão utilizados.

5.2 Calibração do indicador indo-1

Conhecendo-se os parâmetros de calibração (R_{max} , R_{min} , β e K_d) e a razão entre a emissão do indicador nos 2 comprimentos de onda apropriados, pode-se estimar $[Ca^{2+}]_i$. Os parâmetros R_{max} e R_{min} foram estimados na condição de $[Ca^{2+}]_i$ que satura todos os sítios de ligação do indicador ao Ca^{2+} e na condição de $[Ca^{2+}]_i$ mínima, respectivamente. Estes parâmetros, que determinam a faixa de variação dinâmica da razão de fluorescência, são altamente dependentes do espectro de emissão do indo-1 ligado e

não-ligado ao Ca^{2+} e também, assim como β , das características do sistema de detecção utilizado. Como consequência destas características, qualquer modificação do sistema de detecção (*e.g.*, tensão de alimentação das PMTs, alinhamento óptico) requer novo procedimento de calibração (Gomes *et al.*, 1998). O parâmetro β é geralmente definido na literatura como sendo a razão das intensidades de fluorescência medidas em $\lambda = 485 \text{ nm}$ na presença de $[\text{Ca}^{2+}]$ mínima e saturante. Porém, isto requer que a concentração do indicador seja mantida constante no interior das células, o que nem sempre é possível. Para contornar esse problema, utilizamos o procedimento proposto por Gomes *et al.* (1998) para se determinar β com maior exatidão, no qual a razão de fluorescência é usada no cálculo de β .

A constante de dissociação aparente do complexo indicador- Ca^{2+} (K_d) é um fator multiplicativo (ver Eq 3.1). Desta maneira, variações de K_d afetam linearmente a estimativa de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gomes *et al.*, 1998). Este parâmetro é fortemente dependente do meio onde se encontra o indicador (Bassani *et al.*, 1995b; Bassani *et al.*, 1998). Mudanças de temperatura, pH, viscosidade e principalmente a presença de proteínas causam grandes variações de K_d . Portanto, torna-se necessário determinar K_d para cada tipo de preparação em uso. O ideal seria determinar K_d em cada experimento realizado, porém, em função da complexidade do protocolo utilizado para sua estimativa, é freqüente na literatura o uso de valores de K_d determinados *in vitro*, o que pode levar a subestimativa de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Neste trabalho, utilizamos o valor de K_d determinado *in vivo* por Bassani *et al.* (1995b), que vem sendo amplamente utilizado no nosso e em outros laboratórios (Bassani & Bassani, 2002 e 2003; Ginsburg & Bers, 2004; Hu *et al.*, 2005). Apesar deste parâmetro ter sido determinado em miócitos de coelho, valores semelhantes foram obtidos em homogenado ventricular de rato (Bassani *et al.*, 1998), o que justifica sua utilização neste trabalho.

5.3 Efeitos da perfusão dos miócitos com soluções hiperosmóticas

As soluções hiperosmóticas de NaCl são uma importante alternativa à transfusão sanguínea no tratamento do choque hemorrágico e vêm sendo utilizadas para este fim há vários anos (Velasco *et al.*, 1980). Contudo, os efeitos causados por estas soluções no sistema cardiovascular ainda não estão completamente esclarecidos e são objeto de estudo em vários trabalhos (Scalabrini *et al.*, 2003; Velasco & Baena, 2004; Rocha-e-Silva

& Poli de Figueiredo, 2005). Em especial no coração, estudos realizados tanto com o órgão (Ogino *et al.*, 1998) quanto com tecido atrial isolado (Bassani *et al.*, 1987; Bassani *et al.*, 1990) revelaram que estas soluções podem causar redução transitória da força desenvolvida. Assim, alterações do bombeamento de sangue após tratamento com estas soluções poderiam ser, pelo menos em parte, devidas a um possível efeito direto das soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a mobilização de Ca^{2+} e atividade contrátil celular; tema que ainda foi pouco explorado.

No presente trabalho, foram estudados os efeitos de soluções hiperosmóticas de NaCl e sacarose sobre a atividade contrátil e mobilização de Ca^{2+} em células cardíacas isoladas. A análise dos efeitos de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a atividade contrátil é complexa, pois, além do efeito do aumento da osmolaridade do meio extracelular, ocorre ainda o aumento da concentração externa de NaCl. A dissociação deste sal em meio aquoso pode alterar a distribuição iônica nos compartimentos intra e extracelular, o que pode afetar o transporte de diversos íons. Desta maneira, optamos por utilizar em parte dos nossos experimentos soluções hiperosmóticas de sacarose como ferramenta para aumentar a osmolaridade do meio extracelular sem variar a $[\text{Na}^+]_o$. Supostamente, este composto não é capaz de transpor a membrana celular, gerando então um efeito chamado “puramente osmótico”.

A perfusão dos miócitos com soluções hiperosmóticas de NaCl e sacarose produziu efeitos distintos, tanto sobre a atividade contrátil quanto sobre os transientes de Ca^{2+} . De maneira geral, a sacarose gerou aumento de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$, porém reduziu drasticamente e monotonicamente a ΔEC . Em relação à mobilização de Ca^{2+} , nossos resultados são compatíveis com os relatados por Allen & Smith (1987) em músculos papilares de furão expostos a hiperosmolaridade por adição de 100 mM manitol à solução de perfusão. Por outro lado, relata-se que o aumento da osmolaridade extracelular possa causar aumento da força de contração miocárdica (Allen & Smith, 1987; Bassani *et al.*, 1990; Ogino *et al.*, 1998), que é o oposto do observado neste trabalho. Neste caso, é importante salientar que nestes estudos o inotropismo foi avaliado pela força isométrica desenvolvida por preparações multicelulares de músculo cardíaco isolado, enquanto que em nosso trabalho, medimos encurtamento celular sem carga. O tipo de regime de contração (“isométrica” vs. “isotônica”) e as propriedades mecânicas da preparação (existência ou não de um componente passivo que afeta a complacência) podem ter influência importante sobre a resposta da preparação. No caso da contração isométrica, a carga mecânica imposta ao músculo facilita a ligação do Ca^{2+} a troponina C, por aumento do

comprimento do sarcômero. Além disso, no tecido muscular isolado, no qual podem estar presentes terminações nervosas, a hiperosmolaridade pode afetar não apenas a liberação de neurotransmissores (Hubbard *et al.*, 1968), mas também alterar a sensibilidade do tecido a estes agentes (Bassani & Bassani, 1991), o que pode afetar de modo importante a resposta inotrópica da preparação.

De acordo com nossos resultados e outros estudos, o aumento da osmolaridade *per se* pode gerar dois efeitos importantes que podem alterar a amplitude das contrações, que são: efeito sobre a mobilização de Ca^{2+} e sobre os miofilamentos e/ou propriedades mecânicas da preparação.

Em relação às propriedades mecânicas, o aumento da osmolaridade extracelular pode gerar redução de volume do miócito devida a saída de água do meio intracelular (Ross, 1986). A compressão osmótica do miócito, que atinge o pico após cerca de 5 min de perfusão, aparentemente reduz o espaçamento entre as proteínas contráteis, o que pode facilitar a interação entre actina e miosina (McDonald & Moss, 1995; Fuchs & Wang, 1996) e contribuir para um efeito inotrópico positivo. Por outro lado, a desidratação celular pode também aumentar a viscosidade citoplasmática e afetar de maneira importante a dinâmica de contração (Allen & Smith, 1987). Acreditamos que este segundo fator possa ser predominante e ter sido o mecanismo responsável não só pela redução da ΔEC , como também pelo prolongamento do relaxamento da contração (ver Figura 4.12), que estão de acordo com Howarth *et al.* (2002). Alternativamente, as alterações de amplitude e curso temporal das contrações poderiam decorrer de efeitos da hiperosmolaridade sobre o transporte de Ca^{2+} e conseqüente alteração dos transientes. No entanto, os resultados indicam que o inotropismo negativo da hiperosmolaridade parece estar relacionado primariamente a efeitos sobre o aparelho contrátil e/ou propriedades mecânicas da célula, e não sobre a mobilização de Ca^{2+} , como explicado a seguir.

Nos diagramas Ca^{2+} -encurtamento (Figura 4.5), que são comumente utilizados para a análise da dinâmica entre $[\text{Ca}^{2+}]$ e encurtamento celular durante uma contração (Spurgeon *et al.*, 1992), podemos observar que quando os miócitos foram perfundidos com HiperSac, ΔEC sofreu uma redução muito acentuada, apesar do aumento do valor de pico do transiente de Ca^{2+} , o que indica um desacoplamento entre o transiente de Ca^{2+} e o desenvolvimento da contração. É importante observar que a depressão contrátil não foi causada por menor encurtamento sistólico de pico, mas sim por uma redução progressiva do comprimento celular diastólico. Esta contratura pode ser resultado do marcante prolongamento do relaxamento das contrações, e provavelmente contribui para limitar a

variação de comprimento celular na sístole, já que após 15 min de perfusão com solução HiperSac, o encurtamento diastólico era maior que o encurtamento sistólico de pico na condição controle. Contratura diastólica também foi observada durante a perfusão com HiperNac (Figura 4.5-A), porém em menor grau. Isto poderia ser explicado pelo menor aumento da tonicidade do meio causado por HiperNac vs. HiperSac, devido à mobilidade transmembrana dos íons Na^+ e Cl^- , mas não da sacarose. Além disso, o maior aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dia}}$ em resposta a HiperSac do que a HiperNac pode também ter contribuído para esta diferença.

Em relação à mobilização de Ca^{2+} , Allen & Smith (1987) atribuíram o aumento de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ em resposta à hiperosmolaridade a um possível aumento da liberação de Ca^{2+} do RS ou aumento do influxo do íon durante o PA. Segundo nossos resultados, a primeira hipótese parece pouco provável, pois observamos um pequeno aumento, não significativo, de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ausência de diferença estatística em LF. Em estudo anterior, Howarth *et al.* (2002) encontraram aumento de LF após 5 minutos de perfusão com solução hiperosmótica de sacarose, porém é importante destacar que: a) o incremento de osmolaridade foi cerca de duas vezes maior do utilizado neste trabalho; b) o tempo de observação foi diferente; c) o método utilizado para estimativa de LF não se caracterizou pelo rigor quantitativo, pois os autores não tiveram o cuidado de converter o sinal de fluorescência em $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} durante um PA pode ser aumentado caso ocorra aumento do tempo de duração do PA ou do pico de $I_{\text{Ca,L}}$. Kasamaki *et al.* (1998) demonstraram que o aumento da osmolaridade por adição de 150 mM de sacarose reduz o valor do pico de $I_{\text{Ca,L}}$ em cobaia, porém aumenta o tempo de duração do PA, por inibição de I_K . Segundo estes autores, apesar da redução de $I_{\text{Ca,L}}$ contribuir para redução do influxo total de Ca^{2+} , o prolongamento do tempo de duração do PA é capaz de compensar esta queda, gerando aumento do influxo de Ca^{2+} durante o PA. No mesmo sentido, Ogura *et al.* (1997) demonstraram que a adição de 150 mM de sacarose à solução de perfusão, além de reduzir o valor do pico de $I_{\text{Ca,L}}$, reduz também sua taxa de inativação, contribuindo para o aumento do influxo de Ca^{2+} durante o PA em cobaia.

Aparentemente, o efeito independente de Ca^{2+} causado pela hiperosmolaridade sobre a atividade contrátil é dominante em miócitos isolados, gerando depressão da amplitude das contrações. Este efeito inotrópico negativo, observado mesmo com aumento de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ também foi relatado por Howarth *et al.* (2002). Mesmo em preparações de músculo cardíaco isolado, outros autores demonstraram que o efeito

inotrópico de soluções hiperosmóticas de sacarose ou manitol pode ser negativo, dependendo das condições de carga de Ca^{2+} do tecido. Wildenthal *et al.* (1975) relataram que, na condição de alta carga de Ca^{2+} , o tecido ventricular isolado de gato apresenta efeito inotrópico negativo, ao contrário do efeito inotrópico positivo observado com carga de Ca^{2+} basal. No tecido cardíaco isolado de rato, Willerson *et al.* (1978) observaram efeito inotrópico negativo causado pelo incremento da osmolaridade de 25 a 100 mOsm/l. Porém, quando a concentração extracelular de Ca^{2+} foi reduzida de 2,5 mM para 0,3 mM, foi observado efeito inotrópico positivo. Estes resultados estão de acordo com nossa hipótese de que a hiperosmolaridade pode gerar efeito inotrópico tanto de origem mecânica quanto de origem de mobilização de Ca^{2+} , e que estes efeitos competem entre si.

Diferentemente do ocorrido com a sacarose, durante a exposição das células à solução hiperosmótica de NaCl, foi possível observar que ΔEC sofreu redução transitória, seguida de recuperação e estabilização em aproximadamente 60% do valor controle, após 15 min de perfusão com solução hiperosmótica. Observamos em algumas células que a amplitude de contrações atingida ao final de 15 minutos de perfusão com HiperNac era semelhante àquela medida após 30 minutos, confirmando a estabilização do efeito. Como mencionado anteriormente, o efeito da solução HiperNac tem dois componentes (*i.e.*, efeitos osmótico e do aumento da $[\text{Na}^+]_o$) que precisavam ser analisados separadamente. Para isto, os miócitos foram submetidos a três tratamentos adicionais: aumento da osmolaridade sem aumento de $[\text{Na}^+]_o$ (HiperSac) e aumento de $[\text{Na}^+]_o$ sem aumento da osmolaridade tanto na condição isosmótica ($\uparrow[\text{Na}^+]_o$ iso) quanto na hiperosmótica ($\uparrow[\text{Na}^+]_o$ hiper). Os resultados destes experimentos sugerem que o efeito inotrópico negativo inicial parece ser devido ao aumento da osmolaridade, uma vez que a queda de ΔEC não foi observada na condição de aumento isosmótico de $[\text{Na}^+]_o$ (confirmando nossa hipótese anterior de efeito depressor da hiperosmolaridade). Por outro lado, nossos resultados indicam que a fase posterior de recuperação da ΔEC provavelmente depende do aumento da $[\text{Na}^+]_o$, pois esta fase não ocorreu durante perfusão com HiperSac ou $\uparrow[\text{Na}^+]_o$ hiper.

No caso da perfusão com solução HiperNac, novamente acreditamos que o aumento da osmolaridade possa afetar a atividade contrátil de duas maneiras: influenciando nas propriedades mecânicas do miócito e na amplitude dos transientes de Ca^{2+} . Na fase inicial observamos redução de ΔEC , que pode ser atribuída a uma provável alteração da dinâmica de contração (causada por aumento da viscosidade) e concomitante queda de

$\Delta[Ca^{2+}]_i$. Da mesma maneira, a fase de recuperação de ΔEC pode depender da combinação destes dois efeitos. Porém, neste caso, observamos aumento de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, que pode contribuir para o aumento ΔEC , e acreditamos que o efeito depressor da HiperNac sobre a atividade contrátil seja menor que o da HiperSac (*i.e.*, possibilidade de redistribuição de íons Na^+ e Cl^- através da membrana e redução do efeito osmótico *per se*).

HiperSac e HiperNac afetaram também de modo diferente a amplitude dos transientes de Ca^{2+} evocados por estimulação elétrica. Enquanto a primeira solução causou aumento monotônico de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, o efeito da segunda foi qualitativamente semelhante àquele sobre ΔEC : ocorreu redução transitória da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (para cerca de 50% do valor controle após 2 min do início da perfusão) seguida de recuperação e estabilização em cerca de 50% acima o valor controle (Figura 4.3-B). Os resultados dos experimentos com perfusão com HiperSac, $\uparrow[Na^+]_o$ iso e $\uparrow[Na^+]_o$ hiper sugerem que a queda inicial desta variável depende do aumento conjunto de $[Na^+]_o$ e da osmolaridade extracelular, pois não foi observada nas situações de aumento isolado da osmolaridade ou aumento isosmótico de $[Na^+]_o$ (Figura 4.4-B). No entanto, o aumento tardio de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (somente após 10 min de perfusão) parece estar associado apenas ao aumento de $[Na^+]_o$.

Uma ressalva importante deve ser feita a respeito do curso temporal do efeito do aumento isosmótico de $[Na^+]_o$. Para tornar possível o aumento de $[Na^+]_o$ sem aumento concomitante de osmolaridade, nosso protocolo incluía substituição prévia de certa quantidade de Na^+ por lítio na solução de perfusão e ajuste da $[Ca^{2+}]_o$, considerando a estequiometria da NCX como sendo 2:1 (ver item 3.7.2). Porém este procedimento causou redução inicial da amplitude de $\Delta[Ca^{2+}]_i$, o que sugere desvio do potencial de reversão da troca para um valor menos negativo, o que deveria facilitar a extrusão de Ca^{2+} via NCX. Desta maneira, se esta direção de transporte já estiver estimulada na condição controle, é possível que o desvio adicional do potencial de reversão da NCX causado pelo aumento de $[Na^+]_o$ não resulte em maior facilitação, pois a extrusão de Ca^{2+} via NCX, que é limitada pela densidade de moléculas do trocador no sarcolema, poderia estar próxima da saturação. Para contornar este problema, o protocolo experimental deveria incluir ajuste da amplitude do transiente de Ca^{2+} por adição de Ca^{2+} ao meio extracelular após a redução de $[Na^+]_o$, até que a amplitude do transiente seja semelhante àquela em NT. Deste modo, seria possível assumir que o potencial de reversão da NCX estaria próximo ao valor em NT. Estes experimentos serão realizados no futuro. No entanto, até que estes testes tenham sido feitos, não será possível concluir se a queda

inicial de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, depende ou não do aumento de $[\text{Na}^+]_o$. Experimentos semelhantes a estes foram realizados por Bassani & Bassani (1989) e demonstraram que, em condições isosmóticas, a queda inicial da força desenvolvida pelo músculo atrial isolado é tanto maior quanto maior for o aumento de $[\text{Na}^+]_o$, indicando que, nestas condições, a concentração deste íon é o principal fator regulatório do inotropismo atrial.

Neste sentido, uma possível hipótese para a queda inicial de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ é o favorecimento da extrusão de Ca^{2+} pela NCX, causado pelo aumento da concentração extracelular de Na^+ . Esse aumento afeta o gradiente do íon através da membrana, muda o potencial de reversão do trocador (Bers, 2001) e, neste caso, favorece a extrusão de Ca^{2+} na fase inicial. Além disso, existe evidência na literatura que a hiperosmolaridade provoca aumento transitório (cerca de 3 min após o incremento de osmolaridade) da I_{NCX} (Wright *et al.*, 1995), que poderia contribuir para o aumento da extrusão de Ca^{2+} do miócito. Após a queda inicial, inicia-se uma fase de recuperação do transiente. Novamente acreditamos em um possível envolvimento da NCX nessa fase. Como mencionado anteriormente, o aumento do gradiente de Na^+ através da membrana celular, aliado a uma alta taxa de influxo deste íon em miócitos cardíacos de rato (Despa *et al.*, 2002), favoreceriam aumento de $[\text{Na}^+]_i$. Portanto, nesta fase, teríamos uma redução do transporte Ca^{2+} para fora da célula, o que poderia explicar a recuperação da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Para testar experimentalmente esta hipótese, investigamos a participação da NCX no efeito das soluções-teste sobre os transientes de Ca^{2+} realizando medições dos valores de $t_{1/2}$ de queda de contrações ($t_{1/2\text{-rel}}$) e de Ca^{2+} ($t_{1/2\text{-Ca}}$) evocados por estimulação elétrica e por aplicação de cafeína (Figuras 4.10 a 4.12). A adição hiperosmótica de ambos os solutos (*i.e.*, sacarose e NaCl) prolongou o relaxamento de contrações, porém não alterou o curso temporal dos transientes evocados eletricamente. No entanto, o valor de $t_{1/2\text{-Ca}}$ de transientes evocados por cafeína foi aumentado significativamente ($p < 0,05$). Nossos resultados sugerem que a hiperosmolaridade *per se* prolonga o relaxamento, sem afetar $[\text{Ca}^{2+}]_i$, possivelmente por aumento da viscosidade intracelular (Allen & Smith, 1987). Por outro lado, o declínio mais lento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante o transiente induzido por cafeína é compatível com redução da extrusão de Ca^{2+} via NCX na condição de hiperosmolaridade, possivelmente por acúmulo de Na^+ no citosol devido à perda de água intracelular.

Paralelamente aos experimentos, realizamos um estudo da influência da NCX sobre o transiente de Ca^{2+} por meio de uma simulação computacional, utilizando o programa LabHeart (versão 4.9.5; Puglisi & Bers, 2001). O modelo implementado neste

programa, que inclui o modelo de Luo e Rudy (1994), é capaz de simular PA, correntes iônicas e transientes de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de coelho. Apesar deste modelo ter sido implementado para uma espécie diferente daquela utilizada nesse trabalho, na qual a participação relativa da NCX no transporte de Ca^{2+} é maior (Bassani *et al.*, 1994), acreditamos que esta simulação auxiliou qualitativamente no entendimento dos efeitos causados pela variação da $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Na}^+]_o$ no transporte de Ca^{2+} via NCX. A taxa e direção com que a NCX transporta Ca^{2+} através da membrana dependem, além do gradiente eletroquímico dos íons envolvidos na troca, da diferença entre o potencial de reversão da NCX (E_{NCX}) e o potencial de membrana da célula (E_m), a qual representa a força eletromotriz do transporte. Se E_{NCX} for mais positivo que E_m , a extrusão de Ca^{2+} é tanto maior quanto maior a diferença entre E_{NCX} e E_m (Bers, 2001). Vale lembrar que a corrente de membrana via NCX (I_{NCX} , resultante do balanço do contra-transporte de Na^+ e Ca^{2+}) representa o transporte resultante de um íon Na^+ , já que são trocados 3 íons Na^+ por 1 íon Ca^{2+} (Blaunstein & Lederer, 1999).

A simulação foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.8.2. Na Figura 4.13 apresentamos os resultados desta simulação. Podemos observar que o aumento da $[\text{Na}^+]_o$ causou inicialmente uma diminuição do influxo de Ca^{2+} (diminuição da componente positiva da I_{NCX}) e aumento do efluxo deste íon (aumento da componente negativa da I_{NCX}), o que poderia contribuir para a redução da $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nesta condição (Figura 4.13-B, “HiperNac 2min”). Por outro lado, quando se simulou um aumento tardio de $[\text{Na}^+]_i$ causado supostamente pela maior transferência de Na^+ do meio externo para o interno, associado a uma concentração osmótica dos solutos intracelulares, observamos um efeito inverso, ou seja, aumento do influxo e diminuição do efluxo de Ca^{2+} via NCX, o que tende a causar aumento de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 4.13-B, “HiperNac 15min”). Os resultados obtidos pela simulação de transientes de Ca^{2+} nesta última condição estão de acordo com os obtidos em nossos experimentos e são compatíveis com a hipótese de acúmulo lento de $[\text{Na}^+]_i$.

Quando a osmolaridade da solução de perfusão foi aumentada por adição de NaCl, o próprio aumento de $[\text{Na}^+]_o$ pode contribuir para o aumento de $[\text{Na}^+]_i$, principalmente em miócito ventricular de rato, preparação na qual o influxo de Na^+ é intenso, podendo ocorrer: durante o PA por canais de Na^+ , na fase de repolarização e diástole devido à extrusão de Ca^{2+} pela NCX e na regulação do pH intracelular pela troca $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHX), que promove entrada de Na^+ e saída de H^+ (Despa *et al.*, 2002). Vários estudos acerca dos efeitos da hiperosmolaridade sobre a $[\text{Na}^+]_i$ também apontam para o

aumento de $[Na^+]_i$ em miócitos isolados. Whalley *et al.* (1993) demonstraram que o aumento da osmolaridade por adição de sacarose tem efeito direto sobre a ATPase- Na^+ - K^+ , reduzindo sua atividade em aproximadamente 50%, o que pode causar aumento da $[Na^+]_i$. Além disso, a extrusão de H^+ via NHX é, aparentemente, potencializada pela hiperosmolaridade (Whalley *et al.*, 1991). Desta maneira, o aumento do influxo de íons Na^+ via NHX poderia também contribuir para o aumento da $[Na^+]_i$. A respeito desta informação, é importante lembrar que, na preparação biológica estudada neste trabalho, espera-se que o controle do pH intracelular seja realizado unicamente pela NHX, uma vez que o co-transportador $Na-HCO_3$ estava inibido pela ausência de $H_2CO_3^-$ nas soluções utilizadas. Com isso, a inibição da NHX pela hiperosmolaridade pode acarretar mudanças significativas do pH intracelular. O controle do pH intracelular é de extrema importância, pois este pode modificar praticamente todos os sistemas envolvidos na regulação do transporte de Ca^{2+} e desenvolvimento de força (Bers, 2001). Como exemplo, podemos citar a modulação da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , da atividade da ATPase de Ca^{2+} do RS, da NCX e dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS (Bers, 2001).

Para tentar explicar a recuperação da $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ao longo da perfusão dos miócitos com HiperNac, procuramos investigar uma possível participação do RS neste efeito. O RS é o principal estoque de Ca^{2+} intracelular e é responsável por fornecer aproximadamente 90% do Ca^{2+} envolvido no processo de contração em miócitos ventriculares de rato (Bassani *et al.*, 1994; Bers, 2001). Neste trabalho, a $[Ca^{2+}]_{RS}$ foi estimada segundo Bassani & Bers (1995) como a diferença entre o valor de $[Ca^{2+}]_T$ no pico do transiente evocado por cafeína e aquele imediatamente antes do transiente (diástole). Valores estimados por este método são comparáveis aos estimados pelo método eletrofisiológico, que consiste da integração temporal da corrente produzida pela extrusão de Ca^{2+} pela NCX durante a aplicação de cafeína na presença de solução NT (Ginsburg *et al.*, 1998). A LF, outra importante variável utilizada na caracterização da função do RS, também foi investigada neste trabalho. É importante salientar que, por causa da complexidade do protocolo experimental utilizado para estimativa direta da LF (Bassani *et al.*, 1993b; 1995a) e a dificuldade de executá-lo durante os experimentos com as soluções hiperosmóticas, optamos por utilizar uma aproximação, na qual LF é considerada como a razão entre a variação de $[Ca^{2+}]_T$ durante uma contração evocada por um estímulo elétrico e aquela em resposta a Caf-00. As principais vantagens desta abordagem são a simplicidade do protocolo experimental e a possibilidade de avaliação da LF durante a estimulação em *steady-state*. Por outro lado, há alguns problemas, como por exemplo, a

interferência da captação de Ca^{2+} pelo RS (abreviando o transiente de Ca^{2+}) e o fato do influxo de Ca^{2+} não ser levado em conta.

Nossa estimativa de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ na condição controle, de aproximadamente 150 $\mu\text{moles/l}$ de citosol, é compatível com dados da literatura (Ginsburg & Bers, 2004; Diaz *et al.*, 2004). Observamos que a perfusão dos miócitos com solução HiperSac ou HiperNac não induziu variações significativas da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ (Figura 4.6), o que indica que o aumento de osmolaridade extracelular de 85 mOsm/l, *per se* ou acompanhada de aumento da $[\text{Na}^+]_o$, não foi capaz de alterar a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. Estimamos que a LF, durante a perfusão com solução controle, foi de aproximadamente 50%, resultado que se aproxima do observado em outros estudos (Bassani *et al.*, 1993; Howarth *et al.*, 2002; Bassani *et al.*, 2004). Considerando a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ estimada, o RS libera no meio intracelular cerca de 75 $\mu\text{moles/l}$ de citosol a cada contração. Com o incremento da osmolaridade extracelular por adição de sacarose, não observamos variação significativa desta variável (Figura 4.7). Como a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ também não foi afetada pela solução HiperSac, tem-se um indicativo de que a osmolaridade, *per se*, não induz modificações significativas no papel do RS na geração do transiente de Ca^{2+} . Quando a perfusão foi realizada com solução HiperNac, observou-se aumento significativo da LF após 15 min de perfusão, que provavelmente causou o aumento de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado neste ponto. A LF é regulada principalmente por dois fatores: a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ e o influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo L (Bassani *et al.*, 1995a; Shannon *et al.*, 2000). Mas, de maneira geral, pode ser regulada também por qualquer agente que altere a atividade dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS e/ou sua sensibilidade a Ca^{2+} (Bers, 2001). Neste trabalho, não detectamos efeito significativo da hiperosmolaridade sobre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, porém Page & Upshaw-Early (1977) demonstraram em tecido ventricular de rato que o incremento de 135 mM de NaCl à solução de perfusão provoca redução do volume total do RS, o que poderia causar aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$. Desta maneira, acreditamos que um provável aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ possa ser responsável pela maior LF. No entanto, este aumento não poderia ser detectado pelo método utilizado neste trabalho ou pelo método eletrofisiológico, pois em ambos a medição de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ é realizada após sua liberação do RS.

Aparentemente, o aumento de LF não se deve a um maior influxo de Ca^{2+} durante o PA. Embora neste trabalho não tenhamos realizado medições da corrente de Ca^{2+} mediada por canais tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$), relatos na literatura indicam que esta corrente é inibida pela hiperosmolaridade (incremento de 150 mM de sacarose; Ogura *et al.*, 1997; Kasamaki *et al.*, 1998). Apesar disso, observamos aumento de LF, o que indica que a

possível redução de $I_{Ca,L}$ poderia ser mais que compensada por um provável aumento da $[Ca^{2+}]_{RS}$.

É importante salientar ainda que os efeitos causados pela solução HiperNac sobre a ΔEC , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{dia}$ foram reversíveis (Figura 4.8). Aparentemente a remoção das soluções hiperosmóticas estudadas neste trabalho não provocou ruptura do sistema de túbulos-T, o que pode ocorrer em condições de choque osmótico muito intenso (Fowler *et al.*, 2004). A detubulação do miócito, além de reduzir a capacitância de membrana (por reduzir consideravelmente sua área total), isola do meio extracelular uma importante região da membrana celular onde se concentram muitas vias de transporte de íons (*e.g.*, NCX, canais de Ca^{2+} tipo L, ATPase Na^+-K^+ ; Yang *et al.*, 2002; Brette *et al.*, 2004; Despa *et al.*, 2003). Se houvesse ocorrido detubulação esperaríamos diminuição de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ e LF após a lavagem, o que não ocorreu.

5.4 Conclusões finais

Aparentemente, a perfusão com solução hiperosmótica de NaCl gera dois efeitos distintos sobre os miócitos. O primeiro deles, causando variação bifásica de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (*i.e.*, redução inicial seguida de recuperação) mediada possivelmente por acumulação de Na^+ intracelular. O segundo, sobre a atividade contrátil e também bifásico, pode estar relacionado com alteração das propriedades mecânicas do miócito (*e.g.*, aumento de viscosidade) e/ou efeito direto sobre os miofilamentos.

Os mecanismos envolvidos na queda inicial dos transientes de Ca^{2+} ainda permanecem obscuros (apesar dos resultados da simulação apontarem participação da troca Na^+-Ca^{2+}), porém a fase de recuperação dos transientes parece estar relacionada ao aumento da liberação fracional de Ca^{2+} do RS e possível aumento da carga de Ca^{2+} do RS, como resultado provável de redução do efluxo de Ca^{2+} via NCX causado por acumulação intracelular de Na^+ .

6 Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

Allen, D. A.; Schertel, E. R.; Schmall, L. M.; Muir, W. W. Lung innervation and the hemodynamic response to 7% sodium chloride in hypovolemic dogs. *Circ Shock*. 38: 189-194, 1992.

Allen, D. G. & Smith, G. L. The effects of hypertonicity on tension and intracellular calcium concentration in ferret ventricular muscle. *J Physiol*. 383: 425-439, 1987.

Auler Junior, J. O. C. & Fantoni, D. T. Reposição volêmica nos estados de choque hemorrágico e séptico. *Rev Bras Anesthesiol*. 49: 126-138, 1999.

Barbosa, S. P.; Camargo, L. A.; Saad, W. A.; Renzi, A.; De Luca Junior, L. A.; Menani, J. V. Lesion of the anteroventral third ventricle region impairs the recovery of arterial pressure induced by hypertonic saline in rats submitted to hemorrhagic shock. *Brain Res*. 587: 109-114, 1992.

Bassani, J. W. M. Caracterização qualitativa e quantitativa do efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a força contrátil do tecido cardíaco isolado de rato. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, UNICAMP. Campinas - SP, 1987

Bassani, J. W. M. & Bassani, R. A. Calcium-osmolality interaction in the inotropic response of isolated rat atria to increased sodium concentration. *Braz J Med Biol Res*. 22: 807-810, 1989.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Ca²⁺ cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*. 460: 603-621, 1993b.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 265: 533-540, 1993a.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* 476: 279-293, 1994.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Calibration of indo-1 and resting intracellular $[Ca]_i$ in intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys J.* 68: 1453-1460, 1995b.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Rocha-e-Silva, M. Chronotropic and inotropic effects of hyperosmotic solutions on right and left atria isolated from the rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 20: 471-475, 1987.

Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Rocha-e-Silva, M. Inotropic effect of hyperosmotic NaCl solutions on the isolated rat cardiac tissue. *Arch Intern Physiol Bioch.* 98: 397-402, 1990.

Bassani, J. W. M.; Yuan, W.; Bers, D. M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 268: 1313-1319, 1995a.

Bassani, R. A.; Altamirano, J.; Puglisi, J. L.; Bers, D. M. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. *J Physiol.* 559: 591-607, 2004

Bassani, R. A. & Bassani, J. W. M. Reduced responsiveness to noradrenaline in isolated rat atria exposed to hyperosmotic solutions. *Gen Pharmac.* 22: 151-157, 1991.

Bassani, R. A. & Bassani, J. W. M. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am J Physiol.* 282: 2406-2413, 2002.

Bassani, R. A. & Bassani, J. W. M. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na^+Ca^{2+} exchange to ventricular myocyte relaxation. *Braz J Med Biol Res.* 36: 1717-1723, 2003.

Bassani, R. A.; Bassani, J. W. M.; Bers, D. M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca transport reduce $[Ca]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* 453: 591-608, 1992.

Bassani, R. A. & Bers, D. M. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 26: 1335-1347, 1994.

Bassani, R. A. & Bers, D. M. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 68: 2015-2022, 1995.

Bassani, R. A.; Shannon, T. R.; Bers, D. M. Passive Ca²⁺ binding in ventricular myocardium of neonatal and adult rats. *Cell Calcium.* 23: 433-442, 1998.

Ben-Haim, S. A.; Edoute, Y.; Hayam, G.; Better, O. S. Sodium modulates inotropic response to hyperosmolarity in isolated working rat heart. *Am J Physiol.* 263: 1154-1160, 1992.

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

Bers, D. M.; Bassani, R. A.; Bassani, J. W. M.; Baudet, S.; Hryshko, L. V. Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J Mol Cell Cardiol.* 25: 1047-1057, 1993.

Blaunstein, M. P. & Lederer, W. J. Sodium/Calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79: 763-854, 1999.

Brette, F.; Salle, L.; Orchard, C. H. Differential modulation of L-type Ca²⁺ current by SR Ca²⁺ release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 95: e1-7, 2004.

Cabrales, P.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M. Hyperosmotic-hyperoncotic versus hyperosmotic-hyperviscous: small volume resuscitation in hemorrhagic shock. *Shock.* 22: 431-437, 2004.

Chiara, O.; Pelosi, P.; Brazzi, L.; Bottino, N.; Taccone, P.; Cimbanassi, S.; Segala, M.; Gattinoni, L.; Scalea, T. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran, and hypertonic saline solutions. *Crit Care Med.* 31: 1915-1922, 2003.

De Felipe, J. R.; Timoner, R.; Velasco, I. T.; Lopez, O. U.; Rocha e Silva, M., Jr. Treatment of refractory Hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet.* 2: 1980.

Despa, S. & Bers, D. M. Na/K pump current and [Na]⁽ⁱ⁾ in rabbit ventricular myocytes: local [Na]⁽ⁱ⁾ depletion and Na buffering. *Biophys J.* 84: 4157-4166, 2003

Despa, S.; Brette, F.; Orchard, C. H.; Bers, D. M. Na/Ca exchange and Na/K-ATPase function are equally concentrated in transverse tubules of rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 85: 3388-3396, 2003.

Despa, S.; Islam, M. A.; Pogwizd, S. M.; Bers, D. M. Intracellular [Na⁺] and Na⁺ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J Physiol.* 539: 133-143, 2002.

Diaz, M. E.; O'Neil, S. C.; Eisner, D. A. Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. *Circ Res.* 94: 650-656, 2004.

Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 245: 1-14, 1983.

Fowler, M. R.; Dobson, R. S.; Orchard, C. H.; Harrison, S. M. Functional consequences of detubulation of isolated rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 62: 529-537, 2004.

Fuchs, F. & Wang, Y. P. Sarcomere Length Versus Interfilament Spacing as Determinants of Cardiac Myofilament Ca²⁺Sensitivity and Ca²⁺Binding. *J Mol Cell Cardiol.* 28: 1375-1383, 1996.

Fukuda, N.; Sasaki, D.; Ishiwata, S. i.; Kurihara, S. Length Dependence of Tension Generation in Rat Skinned Cardiac Muscle: Role of Titin in the Frank-Starling Mechanism of the Heart. *Circulation.* 104: 1639-1645, 2001.

Gazitua, S.; Scott, J. B.; Haddy, F. J. Resistance responses to local changes in plasma osmolality in three vascular beds. *Am J Physiol.* 220: 384-391, 1971

Gerber, J. G.; Branch, R. A.; Nies, A. S.; Hollifield, J. W.; Gerkens, J. F. Influence of hypertonic saline on canine renal blood flow and renin release. *Am J Physiol.* 237: 441-446, 1979.

Ginsburg, K. S. & Bers, D. M. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol.* 556: 463-480, 2004.

Ginsburg, K. S.; Weber, C. R.; Bers, D. M. Control of Maximum Sarcoplasmic Reticulum Ca Load in Intact Ferret Ventricular Myocytes . Effects of Thapsigargin and Isoproterenol. *J Gen Physiol.* 111: 491-504, 1998.

Gomes, P. A. P.; Bassani, R. A.; Bassani, J. W. M. Measuring $[Ca^{2+}]_i$ with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. *Cell Calcium.* 24: 17-26, 1998.

Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Bio. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.

Hauge, A. & Bo, G. Blood hyperosmolality and pulmonary vascular resistance in the cat. *Circ Res.* 28: 370-376, 1971.

Howarth, F. C.; Qureshi, M. A.; White, E. Effects of hyperosmotic shrinking on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca^{2+} in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pflugers Arch.* 444: 446-451, 2002.

Hu, Z. W.; Yu, L. D.; Yu, Z. L. Theoretical analysis on ratiometric fluorescent indicators caused biased estimates of intracellular free calcium concentrations. *J Photoch Photobio B.* 78: 179-187, 2005.

Hubbard, J. I.; Jones, S. F.; Landau, E. M. An examination of the effects of osmotic pressure changes upon transmitter release from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol.* 197: 639-657, 1968.

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

Kasamaki, Y.; Guo, A. C.; Shuba, L. M.; Ogura, T.; McDonald, T. F. Potassium current and sodium pump involvement in the positive inotropy of cardiac muscle during hyperosmotic stress. *Can J Cardiol.* 14: 285-294, 1998.

Konhilas, J. P.; Irving, T. C.; de Tombe, P. P. Myofilament Calcium Sensitivity in Skinned Rat Cardiac Trabeculae: Role of Interfilament Spacing. *Circ Res.* 90: 59-65, 2002.

Lopes, O. U.; Pontieri, V.; Rocha e Silva, M.; Velasco, I. T. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock: role of the innervated lung. *Am J Physiol.* 241: 883-890, 1981.

Luo, C. H.; Rudy, Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* 74:1071-1096, 1994.

Maier, L. S.; Zhang, T.; Chen, L.; DeSantiago, J.; Brown, J. H.; Bers, D. M. Transgenic CaMKII δ c overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: Reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res.* 92: 904-911, 2003.

McCall, E.; Ginsburg, K. S.; Bassani, R. A.; Shannon, T. R.; Qi, M.; Samarel, A. M.; Bers, D. M. Ca flux, contractility, and excitation-contraction coupling in hypertrophic rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 274: 1348-1360, 1998.

McDonald, K. S. & Moss, R. L. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca²⁺ sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res.* 77: 199-205, 1995.

Mellander, S. Osmolar control of the circulation. *Acta Physiol Scand.* 40: 375, 1973.

Milnor, W. R. The circulation. In: Mountcastle, V. B. (Editor). *Medical Physiology*, vol. 2. 14^a. ed. St. Louis: The C. V. Mosby Company, 1980.

Minta, A.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem.* 264: 8171-8178, 1989.

Missan, S.; Zhabyeyev, P.; Dyachok, O.; Ogura, T.; McDonald, T. F. Inward-rectifier K⁺ Current in Guinea-pig Ventricular Myocytes Exposed to Hyperosmotic Solutions. *J Memb Biol.* 202: 151-160, 2004.

Muller, U. & Gerhards, H. The efficiency of a hypertonic saline solution (7,5 % NaCl) compared to isotonic saline (0,9 % NaCl) in treatment of equine hypovolemic shock. *Pferdeheilkunde.* 19: 464-472, 2003.

Ogino, R.; Suzuki, K.; Kohno, M.; Nishina, M.; Kohama, A. Effects of hypertonic saline and dextran 70 on cardiac contractility after hemorrhagic shock. *J Trama.* 44: 59-67, 1998.

Ogura, T.; Matsuda, H.; Shibamoto, T.; Imanishi, S. Osmosensitive properties of rapid and slow delayed rectifier K⁺ currents in guinea-pig heart cells. *Clin Exp Pharmacol P.* 30: 616-622, 2003.

Ogura, T.; You, Y.; McDonald, T. F. Membrane currents underlying the modified electrical activity of guinea- pig ventricular myocytes exposed to hyperosmotic solution. *J Physiol.* 504: 135-151, 1997.

Page, E. & Upshaw-Earley, J. Volume changes in sarcoplasmatic reticulum of rat hearts perfused with hypertonic solutions. *Circ Res.* 40: 355-366, 1977.

Pieske, B.; Maier, L. S.; Bers, D. M.; Hasenfuss, G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 85: 38-46, 1999.

Pisarri, T. E.; Jonzon, A.; Coleridge, H. M.; Coleridge, J. C. Vagal afferent and reflex responses to changes in surface osmolarity in lower airways of dogs. *J Appl Physiol.* 73: 2305-2313, 1992.

Procópio-Araujo, J. Transporte através de membranas. In: Aires, M. M. (Editor). *Fisiologia*, 2a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

Puglisi, J. L. & Bers, D. M. LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport. *Am J Physiol.* 281: 2049-2060, 2001.

Raizner, A.; Costin, J.; Croke, R.; Bishop, J.; Inglesby, T.; Skinner NS, Jr. Reflex, systemic, and local hemodynamic alterations with experimental hyperosmolality. *Am J Physiol.* 224: 1327-1333, 1973.

Rocha e Silva, M. Hypertonic Saline Resuscitation. *Medicina (Buenos Aires).* 85: 393-402, 1998.

Rocha e Silva, M.; Braga, G. A.; Prist, R.; Velasco, I. T.; Franca, E. S. Physical and physiological characteristics of pressure-driven hemorrhage. *Am J Physiol.* 263: 1402-1410, 1992.

Rocha e Silva, M. & Poli de Figueiredo, L. F. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics.* 60: 157-172, 2005.

Roos, K. P. Length, width, and volume changes in osmotically stressed myocytes. *Am J Physiol.* 251: 1373-1378, 1986.

Scalabrini, A.; Corregiari, F.; Rocha-e-Silva, M. Effects of hypertonic sodium chloride solution on the electrophysiologic alterations caused by bupivacaine in the dog heart. *Braz J Med Biol Res.* 36: 531-540, 2003.

Shannon, T. R.; Ginsburg, K. S.; Bers, D. M. Potentiation of fractional SR Ca release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys J.* 78: 334-343, 2000

Spurgeon, H. A.; duBell, W. H.; Stern, M. D.; Sollott, S. J.; Ziman, B. D.; Silverman, H. S.; Capogrossi, M. C.; Talo, A.; Lakatta, E. G. Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. *J Physiol.* 447: 83-102, 1992

Stones, R.; Billeter, R.; Harrison, S.; White, E. Heterogenic contractile response of rat left ventricular myocytes to beta(1)-adrenoceptor stimulation. *Eur J Pharmacol.* 512: 117-120, 2005.

Vandenberg, J. I.; Rees, S. A.; Wright, A. R.; Powell, T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 32: 85-97, 1996.

Velasco, I. T. & Baena, R. C. The role of the vagus nerve in hypertonic resuscitation of hemorrhagic shocked dogs. *Braz J Med Biol Res.* 37: 419-425, 2004.

Velasco, I. T.; Pontieri, V.; Rocha e Silva, M., Jr; Lopes, O. U. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 239: H664-673, 1980.

Whalley, D. W.; Hemsworth, P. D.; Rasmussen, H. H. Sodium-hydrogen exchange in guinea-pig ventricular muscle during exposure to hyperosmolar solutions. *J Physiol.* 444: 193-212, 1991.

Whalley, D. W.; Hool, L. C.; Ten Eick, R. E.; Rasmussen, H. H. Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na⁺-K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 265: 1201-1210, 1993.

Wildenthal, K.; Adcock, R.; Crie, J.; Templeton, G.; Willerson, J. Negative inotropic influence of hyperosmotic solutions on cardiac muscle. *Am J Physiol.* 229: 1505-1509, 1975.

Willerson, J. T.; Wheelan, S.; Adcock, R. C., Templeton, G. H., Wildenthal, K. Species differences in responses to hyperosmolality and D600 in cat and rat heart. *Am J Physiol.* 235: 276-280, 1978

Wright, A.; Rees, S.; Vandenberg, J.; Twist, V.; Powell, T. Extracellular osmotic pressure modulates sodium-calcium exchange in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 488: 293-301, 1995.

Yang, Z.; Pascarel, C.; Steele, D. S.; Kornukai, K.; Brette, F.; Orchard, C. H. Na⁺-Ca²⁺ exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 91: 315-322, 2002.

Younes, R. N.; Aun, F.; Tomida, R. M.; Birolini, D. The role of lung innervation in the hemodynamic response to hypertonic sodium chloride solutions in hemorrhagic shock. *Surgery.* 98: 900-906, 1985.

Zima, A. V.; Copello, J. A.; Blatter, L. A. Effects of cytosolic NADH/NAD⁺ levels on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 555: 727-741, 2004.

Apêndice A

Apêndice A – Medição da concentração intracelular de Ca^{2+}

A.1 Bases Teóricas

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, seja esta na forma de gases, líquidos ou sólidos. Dentre as várias técnicas espectroscópicas disponíveis, iremos tratar nesse texto especificamente da espectroscopia de luminescência. A luminescência consiste em um processo de emissão de luz sem combustão e conseqüentemente sem incandescência. O fato deste processo utilizar temperaturas mais baixas do que as necessárias para a incandescência é muito vantajoso, trazendo um número enorme de aplicações.

O fenômeno da luminescência pode ser definido como a imediata emissão de energia realizada por uma molécula ou átomo após absorção de radiação. Quando esta energia é absorvida e emitida na forma de luz (fótons) este fenômeno é chamado de fotoluminescência. Absorção de energia normalmente está ligada a transições eletrônicas no átomo em questão. Esta transição, por sua vez, leva o átomo para um estado eletrônico de maior energia (e para os diversos níveis vibracionais e rotacionais deste estado eletrônico). Porém a absorção de energia somente ocorre em níveis discretos, conhecidos como *quantum*. A energia de um *quantum* é dada por:

$$E = h\nu \quad (A.1)$$

ou

$$E = h\frac{C}{\lambda} \quad (A.2)$$

onde h é a constante de Planck, C é a velocidade da luz no vácuo, ν é freqüência de vibração do fóton e λ é o comprimento de onda da radiação absorvida.

Existem duas formas de fotoluminescência, que são classificadas de acordo com o tipo de emissão realizada pelo átomo: a fosforescência e a fluorescência (objeto de nosso

estudo). Para distinguirmos essas duas classes utilizaremos o diagrama de Jablonski (Rendell, 1987), apresentado na Figura A.1.

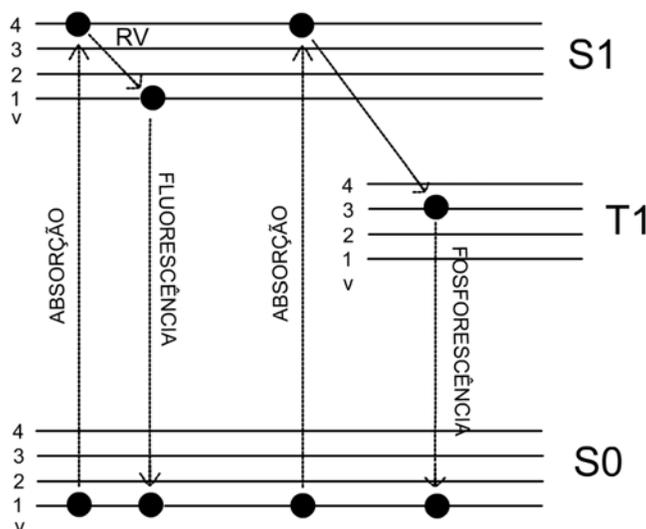


Figura A.1 – Diagrama de Jablonski – Transições eletrônicas envolvidas na fluorescência e fosforescência. Veja texto para explicação. Modificado de Rendell (1987)

Resumidamente, na fosforescência a absorção de energia (que leva o elétron do nível S0 para o nível singleto S1) é seguida de uma transição eletrônica proibida (*i.e.*, probabilidade muito pequena). Essa transição ocorre primeiramente para o estado excitado tripleto (T1) e em seguida para o estado S0, liberando energia na forma de luz (fosforescência) em um processo que pode durar segundos.

Na fluorescência, quando ocorre absorção de energia, o elétron passa do estado fundamental (S0) para o estado excitado S1. Nesse estado o elétron pode ocupar vários níveis vibracionais e rotacionais, de acordo com a energia absorvida ($v = 1, 2, 3, 4$). Geralmente o primeiro processo após a absorção do fóton é a relaxação vibracional (RV) ao nível mais baixo de S1. Nessa transição sem radiação, a energia é dissipada em forma de calor. Por fim, na transição de S1 para S0 normalmente ocorre emissão de fótons (fluorescência) e o elétron volta ao estado fundamental (menor energia). Este processo tem uma duração da ordem de 10^{-8} s. A probabilidade de relaxação com emissão de um fóton é denominada eficiência quântica (EQ) e é uma característica intrínseca do átomo. Esta probabilidade é numericamente igual ao número de fótons emitidos pelo átomo dividido pelo número de fótons absorvidos pelo mesmo. De maneira geral, estes

fenômenos também são observados em átomos quando estes formam uma molécula. Porém, neste caso, a absorção ou emissão de fótons irá compor o espectro de absorção/emissão de energia da molécula, dado pela somatória da energia absorvida ou emitida por cada átomo que compõe a molécula.

Outra característica importante da fluorescência é a relação entre o espectro de absorção e emissão. Conforme descrito anteriormente, o elétron normalmente dissipa energia sem emitir radiação (*i.e.*, relaxação vibracional) antes do processo de fluorescência. Dessa maneira, a energia disponível para a emissão de radiação é menor do que a absorvida. Portanto, o comprimento de onda da radiação emitida pelo átomo será maior que o comprimento de onda da radiação absorvida, uma vez que o comprimento de onda está relacionado com a energia emitida (Equação A.2). Esta característica é conhecida como Lei de Stokes, e é ilustrada na Figura A.2.

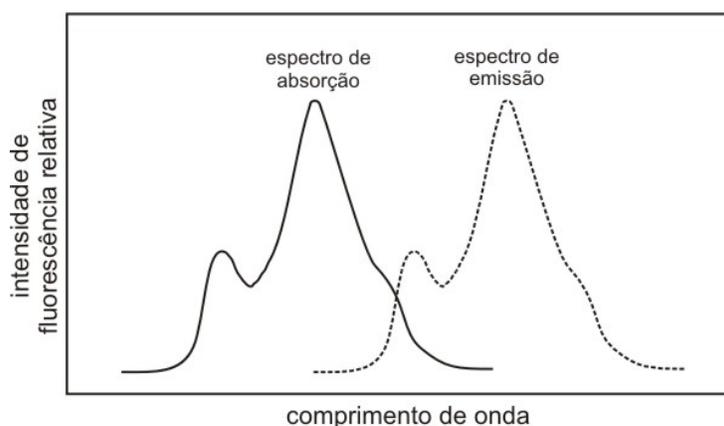


Figura A.2 – Esquema ilustrativo da Lei de Stokes – Devido à dissipação de energia por relaxação vibracional, o comprimento de onda da radiação emitida é maior do que o comprimento de onda da radiação absorvida. Modificado de Redell (1987).

A.2 Medição de $[Ca^{2+}]$ usando técnicas de espectroscopia de fluorescência

Nos últimos anos, a espectroscopia de fluorescência vem se destacando como uma importante ferramenta em análise química quantitativa, podendo ser utilizada, entre outras aplicações, na determinação de concentrações de substâncias químicas. Entre

suas principais vantagens, destaca-se a rápida resposta temporal, pois as transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência ocorrem em períodos da ordem de 10^{-8} s.

Para que seja possível a medição de concentrações iônicas, no caso específico da medição da concentração intracelular de íons de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), torna-se necessário o uso de compostos (indicadores) fluorescentes, pois a maior parte dos íons não são auto-fluorescentes.

Atualmente, a tecnologia de fabricação de indicadores fluorescentes permite a medição de uma série de íons no interior de células vivas, como por exemplo, íons cálcio, magnésio, sódio e hidrogênio. Porém, neste texto, iremos tratar apenas dos indicadores fluorescentes de Ca^{2+} . Estes indicadores são normalmente divididos em dois grupos: os ratiométricos e os não-ratiométricos (Kao, 1994).

A.2.1 Indicadores ratiométricos

Os indicadores ratiométricos não só apresentam alterações na intensidade de fluorescência emitida quando ligados ao Ca^{2+} , mas principalmente têm seu pico de emissão (ou excitação) deslocado quando formam o composto Ca^{2+} -indicador. São assim chamados pois permitem o uso do método da razão. O método da razão consiste em analisar a razão entre a intensidade da fluorescência emitida pelo indicador ligado ao Ca^{2+} e aquela emitida pelo indicador não ligado ao Ca^{2+} . Este método tem como principal vantagem a diminuição de erros de medida causados por variação da concentração do indicador no interior da célula, intensidade da iluminação de excitação, ganho da medição da fluorescência e artefatos de movimento. Atualmente os indicadores ratiométricos mais utilizados são o indo-1 e o fura-2, porém abordaremos nesse texto apenas o indo-1. A principal vantagem do indo-1 em relação ao fura-2 é que o espectro de emissão de ambas as formas do indo-1 (ligado e livre) podem ser monitoradas simultaneamente, resultando em uma instrumentação mais simples. As principais características espectroscópicas do indo-1 são apresentadas na Tabela A.1 e, na Figura A.3, temos seu espectro de emissão.

Tabela A.1 – Principais características espectroscópicas dos indicadores fluorescentes para $[Ca^{2+}]_i$. EQ: Eficiência Quântica. CE: Coeficiente de Extinção ($M^{-1} cm^{-1}$). “livre” significa indicador não ligado ao Ca^{2+} e “ligado” significa indicador ligado ao Ca^{2+} . (modificado de Minta *et al.*, 1989; Grynkiewicz *et al.*, 1985).

	K_d (nM)	Pico de Excitação (nm)	Pico de Emissão (nm)	EQ (livre)	EQ (ligado)	CE (livre)	CE (ligado)
Indo-1	250 ^a	349	485/410	0,38	0,56	79	83
Fluo-3	400 ^b	506	526	0,0051	0,183	34	34

^a K_d aparente *in vitro* obtido em 37°C, em solução aquosa, 110mM KCl, pH 7,05

^b K_d efetivo *in vitro* obtido em 22°C, solução aquosa, 100mM KCl, pH 7-7,5

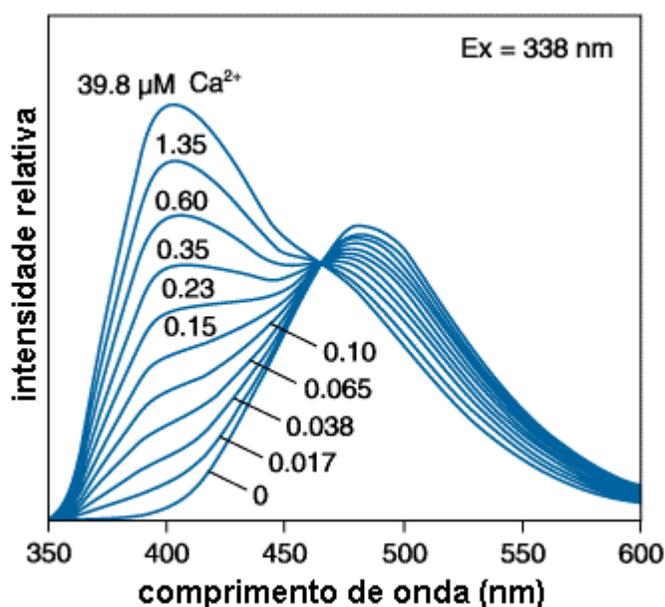


Figura A.3 – Espectro de emissão do indo-1. O pico do espectro de excitação é 338nm. Modificado de Haugland (1999).

Para que seja possível a análise dos transientes de Ca^{2+} no interior da célula, é necessário converter o sinal de fluorescência medido em $[Ca^{2+}]_i$. A intensidade de luz emitida por uma amostra contendo indicador fluorescente é dada por:

$$I = \rho \times A \times \delta \times EQ \times P(\lambda) d\lambda \times c \quad (A.3)$$

onde ρ é a densidade de luz incidente na amostra, A e δ são a área e espessura da amostra, $P(\lambda)d\lambda$ é a probabilidade de emissão entre λ e $\lambda+d\lambda$ e c é a concentração do indicador na amostra.

Simplificando-se a Eq. A.3, temos:

$$I = S \times c \quad (A.4)$$

Desta maneira, a intensidade de luz emitida em uma faixa $d\lambda$ em torno de λ depende da constante S e é proporcional a concentração do indicador.

Para chegar em uma relação entre intensidade luminosa e $[Ca^{2+}]_i$, considere as equações A.5, A.6 e A.7 (Grynkievics *et al.*, 1985).

$$F_1 = S_{f1}c_f + S_{b1}c_b \quad (A.5)$$

$$F_2 = S_{f2}c_f + S_{b2}c_b \quad (A.6)$$

$$c_b = \frac{c_f [Ca^{2+}]}{K_d} \quad (A.7)$$

onde F_1 e F_2 são, respectivamente, as intensidades do sinal luminoso medidas em λ_1 e λ_2 ; c_f e c_b são as concentrações do indicador ligado e não-ligado ao Ca^{2+} , respectivamente; K_d é a constante de dissociação aparente do indicador; S_b e S_f equivalem a constante S quando o indicador está ligado e não ligado ao Ca^{2+} , respectivamente.

Substituindo (A.7) em (A.6) e (A.5) e resolvendo a equação para $[Ca^{2+}]$ temos:

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (A.8)$$

onde $R = \frac{F_1}{F_2}$.

Note que $R_{\min} = \frac{S_{f1}}{S_{f2}}$ é o valor limite inferior de R com $[Ca^{2+}] = 0$ e $R_{\max} = \frac{S_{b1}}{S_{b2}}$ é o valor limite superior de R com $[Ca^{2+}]$ saturante. O termo $\frac{S_{f2}}{S_{b2}}$ é a razão das intensidades de fluorescência medidas em λ_2 com $[Ca^{2+}]$ mínima e máxima, respectivamente. Este termo normalmente é chamado de β . Assim a equação para conversão de R em $[Ca^{2+}]$ é dada por:

$$[Ca^{2+}] = K_d \beta \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \quad (A.9)$$

A correta escolha dos parâmetros de calibração (i.e. K_d , β , R_{\min} e R_{\max}) é de grande importância para a estimativa de $[Ca^{2+}]$. Essa questão será discutida oportunamente.

A.2.2 Indicadores não-raciométricos

Nos indicadores não-raciométricos, a excitação, assim com a captação da luz emitida, é realizada em apenas um comprimento de onda. Variações na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) refletem-se em variações na intensidade da fluorescência emitida, sem que haja alterações no pico do espectro de emissão. Um dos indicadores fluorescentes não-raciométricos mais utilizados na medição de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos é o fluo-3 (Minta *et al.*, 1989). As principais características espectroscópicas do fluo-3 são apresentadas na Tabela A.1. A Figura A.4 ilustra seu espectro de emissão. O

pico de emissão do indicador ligado e não-ligado ao Ca^{2+} praticamente não sofre alteração, impossibilitando o uso do método da razão.

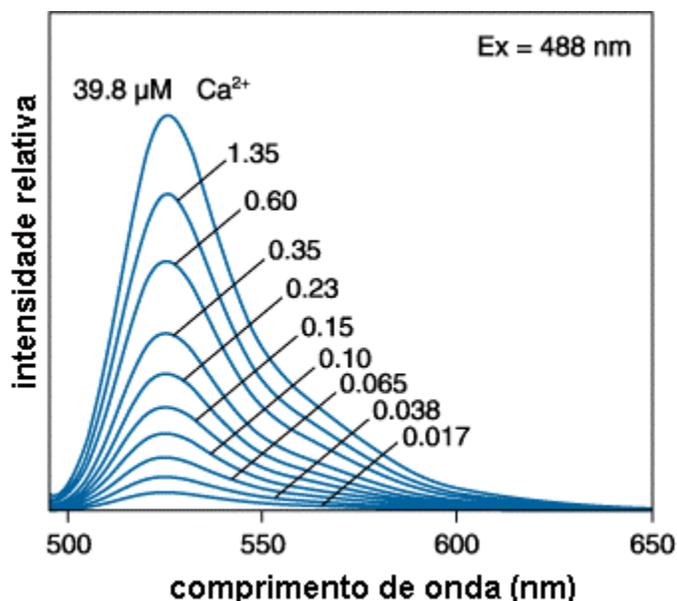


Figura A.4 – Espectro de emissão do fluo-3. O pico do espectro de excitação é 488nm. Modificado de Haugland (1999).

Uma das principais vantagens do fluo-3 é sua alta intensidade de fluorescência. Apesar de sua eficiência quântica ser inferior a do indo-1, o produto EQ x CE – parâmetro intrínseco do indicador que melhor expressa a intensidade de fluorescência emitida - é maior no fluo-3 para valores fisiológicos de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos (Figura A.5). Assim, é necessária menor quantidade de indicador no interior da célula para se obter bons níveis de fluorescência. O coeficiente de extinção (CE) é uma característica que indica a quantidade de luz absorvida por uma substância em um determinado comprimento de onda.

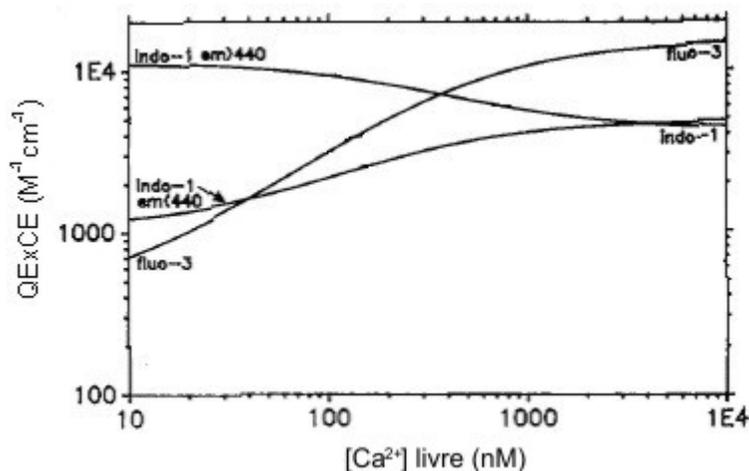


Figura A.5 – Produto EQ x CE em função da concentração de Ca^{2+} livre. Modificado de Minta *et al.* (1989).

Além disso, o fato do fluo-3 ter seu pico de excitação na faixa da luz visível (azul), ou seja, em comprimentos de onda maiores que do ultravioleta (UV), também é uma grande vantagem, pois a luz na faixa do UV pode causar danos às células vivas e excitar a auto-fluorescência de alguns componentes celulares (*e.g.* NADH) (Minta *et al.*, 1989).

Por outro lado, a principal desvantagem do fluo-3 é justamente a impossibilidade de se usar o método da razão. Sendo assim, alguns eventos, como por exemplo, a perda de indicador para o meio extracelular, variações no produto EQ x CE, na intensidade da iluminação de excitação, eficiência na medição da fluorescência, podem introduzir erros na medida da fluorescência.

Novamente, para se avaliar $[Ca^{2+}]_i$ em células vivas torna-se necessário ainda mais um passo: a conversão do sinal luminoso medido em $[Ca^{2+}]$. Para isso, é utilizada a equação A.10, análoga à equação A.9.

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right) \quad (A.10)$$

onde F_{min} e F_{max} são, respectivamente, a fluorescência medida na ausência de Ca^{2+} e na presença de Ca^{2+} saturante.

Porém, a equação A.8 não é normalmente utilizada para se fazer a conversão de fluorescência em $[Ca^{2+}]$. Primeiro porque a determinação de F_{min} é bastante complicada,

pois a emissão do fluo-3 em baixas $[Ca^{2+}]_i$ é muito pequena (Figura A.4). Para se contornar esse problema, o indo-1 é utilizado na determinação de $[Ca^{2+}]_i$ diastólica e, a partir de então, usa-se o fluo-3 na determinação das variações de $[Ca^{2+}]_i$.

A.3 Parâmetros de calibração

Certamente a conversão da intensidade de fluorescência medida em $[Ca^{2+}]_i$ é uma etapa que requer muitos cuidados. Portanto, a determinação dos parâmetros de calibração (*i.e.*, R_{max} , R_{min} , β e K_d) é fundamental para uma análise quantitativa correta da $[Ca^{2+}]_i$. Sendo assim, é fundamental que seja obtida a calibração *in vivo* do indicador fluorescente (indo-1).

Muitos são os fatores que alteram os parâmetros de calibração, sendo K_d o parâmetro mais crítico. Este parâmetro é função principalmente do meio onde o indicador está inserido. Mudanças de temperatura, pH, viscosidade e principalmente a presença de proteínas causam grandes variações de K_d (Bassani *et al.*, 1995). Portanto torna-se extremamente necessário determinar K_d para cada tipo de preparação em uso, além dos outros parâmetros. Apesar disso, comumente encontramos na literatura trabalhos que utilizam K_d determinados *in vitro*, o que poderia subestimar $[Ca^{2+}]_i$ (Takahashi *et al.*, 1999). Para se ter uma idéia desse problema, encontramos K_d (*in vitro*) desde 250 nM (a 37°C, Grynkiewicz *et al.*, 1985) até K_d determinado *in vivo* da ordem de 844 nM (a 22°C, Bassani *et al.*, 1995).

A seguir apresentamos alguns procedimentos relativamente simples, porém muito eficazes na determinação *in vivo* de R_{max} , R_{min} e β .

A.3.1 Determinação de R_{max} e R_{min}

Para atingir os dois limites de R , R_{min} e R_{max} , fazemos uso de ferramentas simples que envolvem os próprios mecanismos de transporte de Ca^{2+} da célula cardíaca, sem a utilização de muitos fármacos, que poderiam influir na medição do sinal de fluorescência (Bassani *et al.*, 1994).

Para a obtenção de R_{min} (razão de fluorescência com $[Ca^{2+}]_i$ mínima), os miócitos são perfundidos com solução de Tyrode sem Ca^{2+} por cerca de 20 minutos, com aplicação da mesma solução contendo 10 mM cafeína a cada 5 min, para depletar o estoque de Ca^{2+} do RS. Em seguida, o meio de incubação é trocado por uma solução

sem cálcio contendo 7 mM de EGTA (quelante de Ca^{2+} utilizado para garantir a redução do Ca^{2+} contaminante da solução para níveis nanomolares). Dessa maneira, espera-se atingir valores mínimos de $[Ca^{2+}]$ no interior da célula e, então, pode-se determinar R_{min} .

Para a obtenção de R_{max} (razão de fluorescência com $[Ca^{2+}]$ máxima), é necessário elevar ao máximo a $[Ca^{2+}]_i$, para saturar os sítios de ligação do indo-1. Para isso, banha-se os miócitos com solução de Tyrode com 20 mM de Ca^{2+} . Este processo resulta em uma contratura irreversível da célula seguida, em alguns casos, de morte celular. Durante esta etapa a fluorescência é medida, possibilitando a determinação de R_{max} .

A.3.2 Determinação de β

O parâmetro β é geralmente definido na literatura como sendo a razão das intensidades de fluorescência medidas em $\lambda = 485$ nm, com $[Ca^{2+}]$ mínima e máxima (item A.2.1). Porém, durante as medições de fluorescência para o cálculo do β é necessário que a concentração do indicador seja mantida constante no interior das células, o que nem sempre é possível. Para contornar esse problema, apresentamos a seguir um procedimento proposto por Gomes *et al.* (1998) para se determinar β com maior exatidão.

Primeiramente, extraímos de um experimento o registro de um transiente de Ca^{2+} , com o valor de fluorescência de fundo (*background*) devidamente subtraída em cada comprimento de onda, como mostrado na Figura A.6.A. Mede-se, então, a intensidade de fluorescência (nos dois comprimentos de onda, 405 nm e 485 nm) em pelo menos três pontos de um transiente de Ca^{2+} típico, incluindo o pico. Em seguida, traça-se um gráfico $F_{485} \times F_{405}$, como na Figura A.6.B. Por meio de uma regressão linear, estima-se a equação da reta que melhor se ajusta a esses pontos. Com isso, pode-se definir β como sendo:

$$\beta = \frac{R_{max} - a}{R_{min} - a} \quad (A.11)$$

onde "a" é o coeficiente angular da reta.

Uma outra vantagem desse método é a possibilidade de se determinar limites teóricos para β . Sendo o valor de "a" sempre negativo, temos que:

$$1 < \beta < \frac{R_{\max}}{R_{\min}} \quad (A.12)$$

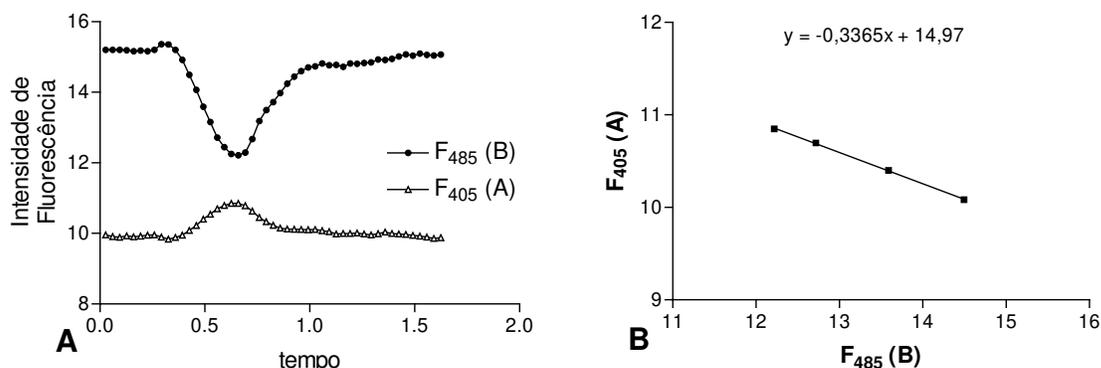


Figura A.6 - Cálculo de β pelo método gráfico. Transiente de Ca^{2+} medido nos dois comprimentos de onda de emissão do indo-1 (A) e regressão linear referente aos pontos medidos no transiente de Ca^{2+} (B).

Muitas vezes este parâmetro é classificado como um fator de escala (dependente da instrumentação usada), porém, como demonstrado por Gomes *et al.* (1998), ele é fortemente dependente das características de absorção e emissão do indicador.

A.3.3 Determinação de K_d (constante de dissociação aparente)

Devido às dificuldades de se determinar este parâmetro em cada experimento, normalmente utilizamos valores de K_d pré-estabelecidos, obtidos nas mesmas condições em que se pretende trabalhar. Existem na literatura alguns métodos para se determinar K_d . Nesse trabalho, apresentaremos o método proposto por Bassani *et al.* (1995), que é utilizado em nosso laboratório.

Este método se baseia em controlar a $[Ca^{2+}]_i$ por meio da concentração extracelular de Ca^{2+} (solução de perfusão, $[Ca^{2+}]_o$). Para que isso seja possível, é necessário considerar que a troca Na^+/Ca^{2+} seja o transportador de Ca^{2+} majoritário durante os experimentos e garantir as seguintes condições: $[Na^+]_i = [Na^+]_o$, potencial de

membrana nulo ($E_m=0$), RS depletado e ATPases de Ca^{2+} do RS e de membrana bloqueadas.

Estabelecidas estas condições, mede-se a intensidade de fluorescência emitida pelo indicador em diversos valores de $[Ca^{2+}]_i$. Juntamente com os valores de β , R_{max} e R_{min} obtidos como descrito acima, ajusta-se uma sigmóide (Equação A.13) sobre os pontos obtidos.

$$R = \left(\frac{R_{max} - R_{min}}{1 + \left(\frac{K_d \beta}{[Ca^{2+}]_i} \right)^n} \right) + R_{min} \quad (A.13)$$

onde R é a razão de fluorescência e n é o coeficiente de Hill.

Com isso, pode-se determinar K_d (844nM) e o coeficiente de Hill (1,02) (Bassani *et al.*, 1995).

A.4 Referências Bibliográficas

1. Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A.; Bers D.M. Calibration of indo-1 and resting intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys J.* 68: 1453-1460, 1995.
2. Gomes, P.A.P.; Bassani, R.A.; Bassani, J.W.M. Measuring $[Ca^{2+}]_i$ with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. *Cell Calcium.* 24: 17-26, 1998
3. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
4. Haugland, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.* 6° ed. Molecular Probes. 1999. 680 p.

5. Kao, J.P.Y. Practical aspects of Measuring [Ca²⁺] 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.
6. Minta, A.; Kao, J.P.Y.; Tsien, R.Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264: 8171-8178, 1989.
7. Rendell, D. *Fluorescence and phosphorescence*. New York: John Wiley & Sons. 1987. 419 p.
8. Takahashi, A.; Camacho, P.; Lechleiter, J. D.; Herman, B. Measurement of Intracellular Calcium. *Physiol. Rev.* 79: 1089-1125, 1999.