

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

TESE DE DOUTORADO

**ESTIMATIVA DO INFLUXO DE CÁLCIO POR MEIO DE CANAIS
TIPO L EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS DE RATOS
NEONATOS E ADULTOS.**

Autor

Sandro Aparecido Ferraz

Campinas - SP - Brasil
Fevereiro de 2003

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

**ESTIMATIVA DO INFLUXO DE CÁLCIO POR MEIO DE CANAIS
TIPO L EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS DE RATOS
NEONATOS E ADULTOS.**

**Autor: Sandro Aparecido Ferraz
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Almada Bassani**

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção
do Título de DOUTOR EM ENGENHARIA ELÉTRICA.

Campinas - SP - Brasil
Fevereiro de 2003

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

TESE DE DOUTORADO
ESTIMATIVA DO INFLUXO DE CÁLCIO POR MEIO DE CANAIS
TIPO L EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS DE RATOS
NEONATOS E ADULTOS.

Autor: Sandro Aparecido Ferraz

Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Almada Bassani

Membros da Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button
DEB, FEEC, UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy
NPT, UMC

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

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

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

Campinas - SP - Brasil

Fevereiro de 2003

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

F413e Ferraz, Sandro Aparecido
Estimativa do influxo de cálcio por meio de canais tipo L em miócitos cardíacos isolados de ratos neonatos e adultos / Sandro Aparecido Ferraz. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1. Cálcio. 2. Rato - Fisiologia. 3. Coração. 4. Eletrofisiologia - Técnica. 5. Ontogenia. 6. Células musculares. 7. Miocárdio. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Há muitas razões para
duvidar e uma só para crer.

Carlos Drummond de Andrade.

Dedico este trabalho ao meu único e grande amor, à minha doce Flavinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. *José Wilson Magalhães Bassani*, pela sua dedicação e se apoio.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. *Rosana Alamada Bassani*, pela sua dedicação, orientação, sugestão e paciência.

Aos amigos *Nivaldo Zafalon Jr.*, *Aldo Mário Mangili*, *Cláudio Watanabe* e *Ruyther Costa Parente*, pela feliz convivência na República nestes últimos anos. Ah! E os churrascos!

Ao amigo, *Joaquim Miguel Maia* pela sua amizade, ajuda, conselhos e risadas. À memória do amigo e Prof. Dr. *Achilles Piedra Buena*, pela amizade, alegria, conhecimentos e poesias.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular: *Gentil*, *Beatriz*, *Pedro*, *Rafael*, *Letícia*. Aos amigos do Departamento de Engenharia Biomédica (DEB): *Hayram*, *Ricardo*, *Maurício*, *Valéria*, *Ana*, *José Paulo*, *Eduardo Jorge*, *Fortal (Jorge)*. Aos amigos, *Marcinha*, *Rogério Marcon*, *Ernesto*, *Marden*, Prof. *Calil*, Prof^a. *Vera*, Prof. *Eduardo*, *Hyan* e demais *amigos* que por acaso eu tenha me esquecido.

Aos *funcionários* do DEB e Centro de Engenharia Biomédica, em especial aos Srs. *Mauro* e *Sérgio Moura*. Agradeço aos técnicos do Laboratório de Apoio a Pesquisa: Srta. *Elizângela*, Srta. *Mariana* e o Sr. *Gilson*. Um agradecimento carinhoso e especial as secretárias *Eloisa*, *Nirlei* e *Marlene*, pela competência e principalmente a amizade. Ao atual secretário do Departamento Sr. *Carlos*.

À minha querida família: *Antenor*, *Vitória*, *Pedro*, *Carmem*, *Débora*, *tia Efigênia*, *tia Therezinha* e *tio Nene (Estevan)*, pelo apoio, ajuda, carinho e amor.

Agradeço ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro durante este trabalho.

RESUMO

O processo de acoplamento excitação-contração no coração envolve o influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de tensão, presentes na membrana celular, durante o potencial de ação (PA). O Ca^{2+} que entra na célula pode contribuir diretamente para a ativação dos miofilamentos, mas também causa a abertura de canais de Ca^{2+} presentes no retículo sarcoplasmático (RS). A liberação de Ca^{2+} pelo RS leva ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), o qual, ao se ligar nos miofilamentos, dispara a contração celular. No coração de mamíferos adultos, a maior parte do Ca^{2+} ativador da contração é proveniente do RS, e uma pequena parte vem do meio extracelular, tendo acesso ao citosol sobretudo por canais de Ca^{2+} tipo L. Há indicações na literatura de que a contribuição das fontes intra e extracelular de Ca^{2+} para a contração ventricular pode depender do estágio de desenvolvimento do animal. Além disso, não há relato na literatura sobre o influxo de Ca^{2+} através de canais tipo L utilizando uma forma de onda despolarizante que simule o PA característico da idade do animal. No presente trabalho, utilizando a técnica de *patch-clamp*, registramos PAs em miócitos ventriculares isolados de ratos durante o desenvolvimento pós-natal, e utilizamos sua forma de onda na idade correspondente como estímulo (técnica de *action-potential clamp*, APC) para evocar corrente de Ca^{2+} através de canais do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$). Estimamos, então, o influxo de Ca^{2+} através desta corrente em células cardíacas de ratos com 1 semana, 2-3 semanas de idade e adultos, por integração de $I_{\text{Ca,L}}$ durante a onda estimulatória. A partir destes dados e de estimativas do volume celular (V_c), foi possível calcular o aumento da concentração total de Ca^{2+} no citosol ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$), resultante do influxo do íon via $I_{\text{Ca,L}}$. Finalmente, a partir de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ e das características de ligação passiva de Ca^{2+} no miocárdio de ratos em desenvolvimento (previamente determinadas), o impacto do influxo de Ca^{2+} através desta corrente sobre a concentração de Ca^{2+} livre no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi estimado nas diferentes faixas etárias. Os principais resultados foram: a) a duração do PA mostrou marcante redução com o amadurecimento; b) houve um considerável aumento da amplitude da $I_{\text{Ca,L}}$ durante APC com o amadurecimento do animal, mas a densidade de $I_{\text{Ca,L}}$ não se alterou, indicando aumento ontogenético da superfície de membrana; c) o volume celular estimado aumentou em função do amadurecimento do animal; e) o impacto do influxo de Ca^{2+} através da $I_{\text{Ca,L}}$ sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi

cerca de 7 vezes maior nos animais de 1 semana de idade do que nos animais de 2-3 semanas e adultos, provavelmente devido à combinação de um PA mais longo e menor capacidade de *buffer* celular de Ca^{2+} . Estes resultados indicam que o influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L tem considerável impacto sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no ventrículo do animal jovem, e que este influxo pode representar uma importante contribuição, direta ou indireta, para o acoplamento excitação contração, nesta fase do desenvolvimento.

ABSTRACT

Excitation-contraction coupling in the heart starts with Ca^{2+} influx through sarcolemmal voltage-dependent channels during the action potential (AP). Ca^{2+} that enters the cell can contribute directly to myofilament activation, but also triggers the opening of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} channels. SR Ca^{2+} release leads to the increase in the intracellular concentration of free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), which starts contraction after binding to the myofilaments. In the adult mammalian heart, most of the contraction-activating Ca^{2+} comes from the SR, and only a small part comes from the extracellular medium, and accesses the cytosol mainly through L-type Ca^{2+} channels. Some authors have proposed that the contribution of extra- and intracellular Ca^{2+} sources for ventricular contraction may depend on the developmental stage of the animal. To our knowledge, it has not yet been attempted to quantitative Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels during depolarizing waveforms that mimic the age-dependent ventricular AP in developing mammals. In the present work, we used the patch-clamp technique to record APs in isolated ventricular myocytes of developing rats, and used the corresponding AP waveform as a stimulus (action-potential clamp, APC) to evoke Ca^{2+} current through L-type channels ($I_{\text{Ca,L}}$). We then estimated the Ca^{2+} influx via $I_{\text{Ca,L}}$ in myocytes of 1 week-old, 2 to 3 week-old of age and adult rats, by $I_{\text{Ca,L}}$ integration during the stimulatory wave. From these data and from cell volume estimates, it was possible to calculate the increase in cytosolic total Ca^{2+} concentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$) caused by Ca^{2+} influx via $I_{\text{Ca,L}}$. Finally, considering myocardial passive Ca^{2+} buffering in developing rats (previously determined), we estimated the impact of Ca^{2+} influx through L-type channels cytosolic free Ca^{2+} concentration free ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The main results were: a) AP duration markedly decreased with development; b) $I_{\text{Ca,L}}$ amplitude under APC has greatly increased with maturation, but $I_{\text{Ca,L}}$ density was did not change, indicating developmental increase in membrane surface area; c) estimated cell volume increased with development; d) the impact of Ca^{2+} influx through $I_{\text{Ca,L}}$ on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was approximately 7 times greater in 1 week-old in than 2 to 3 week-old and adult rats, probably due to the combination of longer AP and smaller capacity of cell Ca^{2+} buffering. The results indicate that L-type channel-mediated Ca^{2+} influx may markedly affect $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ventricular myocardium of infant rats, and that this influx plays an important role in excitation-contraction coupling at this developmental stage.

SUMÁRIO

Capítulo 1. INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2. OBJETIVOS	9
Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODO	
3.1. ANIMAIS	12
3.2. PREPARAÇÃO BIOLÓGICA	12
3.3. ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES	12
3.4. SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	13
3.4.1. Soluções de perfusão	13
3.4.2. Soluções de micropipeta	13
3.5. MICROPIPETAS	13
3.6. MEDIÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA E DA CORRENTE DE CÁLCIO	14
3.6.1. Técnica de <i>patch-clamp</i>	14
3.6.2. Medição da capacitância da membrana celular	16
3.6.3. Medição do potencial de membrana	17
3.6.3.1. Grupos adulto e de 15-21 dias	17
3.6.3.2. Grupos de 0-3 dias e de 6-8 dias	18
3.6.4. Medição de correntes de membrana	19
3.6.4.1. Curva corrente-tensão	20
3.6.4.2. <i>Clamp</i> de tensão com a forma do potencial de ação: <i>action potential-clamp</i> (APC)	20
3.7. INSTRUMENTAÇÃO	

3.7.1. Mesa anti-vibração	22
3.7.2. Microscópio invertido	22
3.7.3. Câmara de perfusão de células isoladas	25
3.7.4. Mini-gaiola de Faraday	25
3.7.5. Micro-manipulador	25
3.7.6. Computador	25
3.7.7. Digidata 1200B	26
3.7.8. pCLAMP 6 [®]	27
3.7.9. Amplificador de <i>patch-clamp</i>	27
3.7.10. Osciloscópio digital	27
3.7.11. Seleccionador de soluções	27
3.8. CÁLCULOS	
3.8.1. Amplitude do PA, taxa de despolarização e APD ₇₅	28
3.8.2. Curva de ativação de I _{Ca,L} em <i>steady-state</i>	28
3.8.3. Cálculo do incremento na concentração total de Ca ²⁺ no citosol ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) devido ao influxo de Ca ²⁺ via I _{Ca,L}	29
3.8.4. Cálculo do volume celular (V _C)	30
3.8.5. Cálculo do incremento da concentração de Ca ²⁺ livre no citosol ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) devido ao influxo de Ca ²⁺ via I _{Ca,L}	33
3.9. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	35

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. CAPACITÂNCIA DE MEMBRANA	38
4.2. POTENCIAIS DE AÇÃO	39
4.3. Correntes de Ca ²⁺	
4.3.1. Curva I-V	43
4.3.2. Registro da corrente de Ca ²⁺ com a técnica de APC	48
4.3.3. Influxo de carga através dos canais de Ca ²⁺ tipo L	51

4.4. ESTIMATIVA DO VOLUME CELULAR (V_C) DE MIÓCITOS CARDÍACOS	53
4.5. INCREMENTO NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+} DEVIDO AO INFLUXO DE Ca^{2+} VIA $I_{Ca,L}$ DURANTE UM PA	
4.5.1. Incremento da concentração citosólica total de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) após influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} tipo L	56
4.5.2. Impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$ sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($\Delta[Ca^{2+}]_i$)	58
Capítulo 5. DISCUSSÃO	
5.1. CAPACITÂNCIA DE MEMBRANA	61
5.2. POTENCIAIS DE AÇÃO	61
5.3. CORRENTE DE Ca^{2+} EM RESPOSTA A DEGRAUS DE TENSÃO	64
5.4. CORRENTE VIA CANAIS DE Ca^{2+} DO TIPO L DURANTE APC	67
5.5. INFLUXO DE Ca^{2+} ATRAVÉS DE CANAIS DE Ca^{2+} DO TIPO L	68
5.6. ESTIMATIVA DO VOLUME CELULAR DE MIÓCITOS CARDÍACOS	69
5.7. INCREMENTO NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR TOTAL DE Ca^{2+} DEVIDO AO INFLUXO VIA $I_{Ca,L}$	71
5.8. IMPACTO DO INFLUXO DE Ca^{2+} VIA $I_{Ca,L}$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE Ca^{2+} LIVRE ($\Delta [Ca^{2+}]_i$)	74
5.9. CONCLUSÃO	77
Capítulo 6. BIBLIOGRAFIA	79
APÊNDICE	90

Lista de símbolos

$\int I_{Ca}(t) dt$: integral no tempo da corrente de cálcio via canais do tipo L

τ_C : constante de tempo de queda da corrente capacitiva

$[Ca^{2+}]_B$: concentração de cálcio ligada a buffers intracelulares

$[Ca^{2+}]_i$: cálcio livre intracelular

$[Ca^{2+}]_{tot}$: concentração total de cálcio no citosol

4-AP: 4-aminopiridina

A/D: analógico / digital

A_F : área estimada da superfície de uma das faces da célula

A_m média: média do valor da área da superfície da membrana das células

A_m : área da superfície da membrana da célula

APC: action-potential clamp

APD₇₅: duração do potencial de ação desde seu início até 75% de sua repolarização

BK: solução de perfusão para o bloqueio dos canais de potássio

B_{max} : densidade máxima dos sítios de ligação de cálcio

CICR: *Ca²⁺-induced cálcio release*

C_m : capacitância da membrana celular

D/A: digital / analógico

D: delta da equação de Bháscara

dV/dt: taxa de despolarização da membrana

E_{dia} : potencial diastólico

EGTA: etileno-bis(oxietilenonitrilo) ácido tetraacético

E_h : potencial no qual a condutância da membrana é de 50% do máximo

E_{hold} : potencial no qual a membrana foi mantida no intervalo entre pulsos-testes

E_m : potencial elétrico

E_{rev} : potencial de reversão da corrente

F: constante de Faraday (96480 C/mol)

f_{nm} : fração não-mitocondrial do volume celular

$g_{Ca,L}$: condutância do canal de cálcio do tipo L

g_{max} : condutância máxima da membrana representada por canais de cálcio do tipo L

g_{\min} : condutância mínima da membrana

HEPES: [4-(2-hidroxiethyl)1-piperazina-ácido etano-sulfônico]

$I_{Ca,L}$: corrente de cálcio via canais do tipo L

I_{Cl} : corrente de cloreto

I_K : corrente de potássio

I_m : corrente de membrana

I_{Na} : corrente de sódio

I_o : pico da corrente capacitiva

I-V: corrente-tensão

k: fator de inclinação da relação entre $g_{Ca,L}$ relativa e o potencial de membrana

K_d : constante de dissociação aparente de Ca^{2+} dos sítios de ligação passiva

NCX: troca Na^+ - Ca^{2+}

NT: solução de Tyrode modificada

PA: potencial de ação

R: fator de conversão de área da superfície da membrana para o volume celular

RS: retículo sarcoplasmático

SL: sarcolema (ou membrana celular)

wcpc: *whole-cell patch clamping*

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O coração é um órgão muscular oco, constituído de quatro câmaras: dois átrios e dois ventrículos. A função do coração é bombear o sangue para os vasos sanguíneos, de modo que um suprimento adequado de sangue sob pressão suficiente seja distribuído a todos os tecidos do corpo. A eficiência do coração como bomba requer que um padrão sequencial de excitação e contração se produza de maneira ordenada e coordenada, dos átrios para os ventrículos. No desempenho de sua função, o coração vale-se de três propriedades básicas, apresentadas em maior ou menor grau por diferentes tecidos que o compõem: a) *auto-ritmicidade* (cronotropismo) – capacidade das células marca-passo de gerar potenciais de ação (PA) espontâneos, que consistem de uma variação transitória da diferença de potencial transmembrana (E_m). b) *condutividade* (dromotropismo) – capacidade de conduzir o impulso elétrico por meio de circuitos locais. Existem contudo, células especializadas para a condução rápida dos impulsos elétricos ao longo dos ventrículos (como por exemplo, as células do feixe de His e células de Purkinje); c) *contratilidade* (inotropismo) – capacidade de desenvolver tensão mecânica e/ou encurtamento (contração), fortemente desenvolvida nas células miocárdicas atriais e ventriculares (Mountcastle, 1978; Berne & Levy, 1996).

A contração é iniciada pela ativação elétrica da célula miocárdica. O processo de acoplamento excitação-contração no coração (vide Figura 1) envolve a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão, presentes na membrana celular (sarcolema, SL), durante a fase de despolarização do potencial de ação (PA), o que causa fluxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior da célula. É possível que a troca Na^+-Ca^{2+} do sarcolema (NCX), operando em seu modo reverso, também possa contribuir para este influxo (Bers, 2001). O Ca^{2+} que entra na célula pode contribuir diretamente para a ativação dos miofilamentos, mas também causa a abertura dos canais de liberação de Ca^{2+} presentes no retículo sarcoplasmático (RS), organela que contém o maior estoque de Ca^{2+} intracelular. Este processo é conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-release* ou *CICR*, Fabiato, 1983). A liberação de Ca^{2+} pelo RS (principal fonte de Ca^{2+} para o processo contrátil em mamíferos) leva ao aumento da concentração do Ca^{2+} livre

intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), o qual se difunde para os miofilamentos, ligando-se à troponina C. Esta ligação provoca, indiretamente, a interação das proteínas contráteis actina e miosina, resultando em contração da célula como um todo. O relaxamento, por sua vez, ocorre devido à diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüente dissociação do Ca^{2+} dos miofilamentos. Há pelo menos quatro processos envolvidos na remoção do Ca^{2+} do citosol: **a)** bomba de Ca^{2+} do RS, que transporta Ca^{2+} ativamente para o interior do RS; **b)** NCX, que, operando no modo direto, remove o Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular; **c)** bomba de Ca^{2+} do SL, que remove ativamente Ca^{2+} para o meio extracelular; e **d)** captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (Bassani *et al.*, 1992; Bers *et al.*, 1996; Bers, 2001; vide Figura 1.1). Os dois primeiros transportadores são responsáveis por 70-95% da redução da $[Ca^{2+}]_i$ em células cardíacas de mamíferos adultos durante o relaxamento (Bassani *et al.*, 1992, 1994a,b; Negretti *et al.*, 1993; Bers *et al.*, 1996; Bassani & Bassani, 2002). É importante observar que, durante ativação cíclica em *steady-state*, a quantidade de Ca^{2+} que entra na célula durante o PA é comparável àquela extruída da célula pela NCX durante o relaxamento. Do mesmo modo, é esperado que a mesma quantidade de Ca^{2+} que é liberada pelo RS durante a ativação seja recaptada pela organela durante o relaxamento. Deste modo, parece haver um equilíbrio dinâmico do balanço de Ca^{2+} transportado entre o citosol e compartimentos intracelulares/meio extracelular (Delbridge *et al.*, 1996, 1997; Yuan *et al.*, 1996).

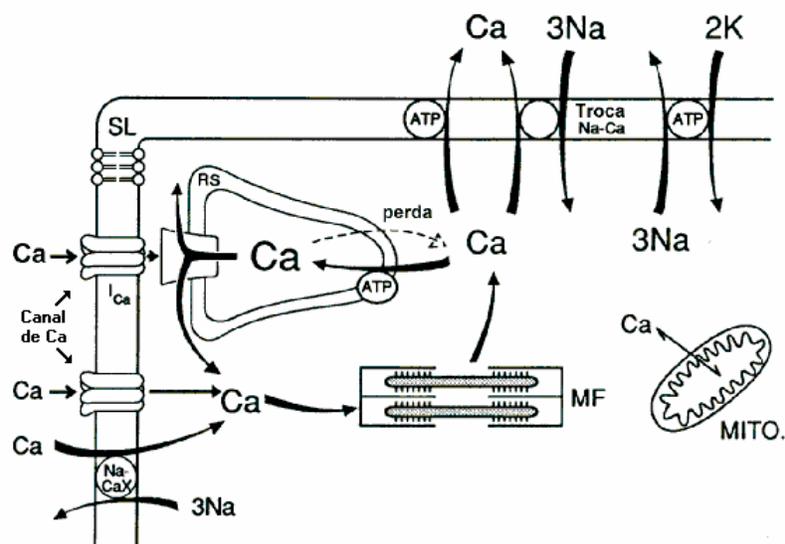


Figura 1.1 Esquema geral do ciclo do Ca^{2+} no músculo cardíaco. O Ca^{2+} pode entrar via canais de Ca^{2+} . A corrente de Ca^{2+} pode induzir a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pela abertura do canal de liberação de Ca^{2+} presente na membrana do RS. O Ca^{2+} é removido dos miofilamentos e citoplasma principalmente pela troca Na-Ca presente no sarcolema e pela ATPase do RS (modificado de Bers, 2001).

Como já exposto, o gatilho mais importante para o CICR no ventrículo de mamíferos adultos é a corrente de Ca^{2+} através do SL, que é ativada pela despolarização da membrana durante o PA. O PA ventricular é longo, em comparação com aquele em células nervosas, e apresenta 4 fases principais (Bers, 2001; ver Figura 1.2):

- 1) fase zero (despolarização rápida da membrana): nesta fase, a ativação de canais rápidos (i.e., de ativação rápida) de Na^+ causa rápida despolarização da membrana e reversão de E_m , que atinge um pico de cerca de 50 mV (positivo na face intracelular da membrana, com relação à extracelular).
- 2) fase 1 (repolarização inicial): esta fase depende não só da inativação dos canais de Na^+ , mas principalmente da corrente transiente de saída (I_{to}) através de canais de K^+ de rápida ativação e inativação.
- 3) fase 2 (platô): nesta fase, E_m permanece próximo a 0 mV, havendo um balanço entre correntes de entrada (principalmente corrente de Ca^{2+} , via canais do tipo L, $I_{Ca,L}$) e de saída (correntes lentas de K^+ , I_K).
- 4) fase 3 (repolarização tardia): nesta fase, E_m retorna a seu valor de repouso (de -90 a -80 mV), basicamente devido à corrente de saída de cátions (componentes de I_K).

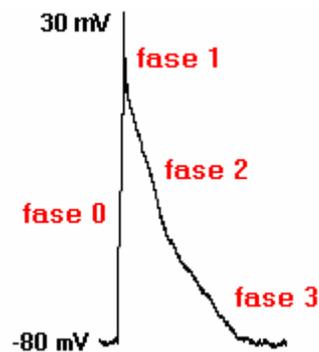


Figura 1.2 Principais fases do potencial de ação ventricular: 1) *fase zero*: despolarização rápida da membrana; 2) *fase 1*: repolarização inicial; 3) *fase 2*: platô; 4) *fase 3*: repolarização tardia.

A corrente de entrada de Ca^{2+} durante o PA contribui para a manutenção do platô, e também para a ativação da contração, diretamente (por ligação do Ca^{2+} que entra aos miofilamentos) e/ou indiretamente (disparando o processo de CICR). No miocárdio, há 2 tipos principais de canais de Ca^{2+} (Bean, 1989; Bers, 2001): do tipo T (de baixa condutância, aberturas transitórias, ativação a valores mais negativos de E_m) e do tipo L

(grande condutância, aberturas longas, ativação a valores menos negativos de E_m e sensibilidade a dihidropiridinas). Em miócitos ventriculares da maioria dos mamíferos adultos estudados, incluindo o rato, correntes de Ca^{2+} mediadas por canais do tipo T são praticamente indetectáveis, de modo que se considera que a corrente de Ca^{2+} transmembrana seja majoritariamente $I_{Ca,L}$ (Bean, 1989).

Enquanto que no coração de mamíferos adultos, a maior parte do Ca^{2+} ativador da contração é proveniente do RS (especialmente no rato, no qual esta fonte parece atingir ~90% do total, Bers, 2001), há indicações na literatura que a contribuição relativa de fontes extra e intracelulares de Ca^{2+} para a contração de miócitos cardíacos parece depender do estágio de desenvolvimento do animal (para revisões, veja Mahony, 1996 e Bers, 2001).

No aspecto estrutural, observou-se que o ventrículo de mamíferos neonatos apresenta reduzido volume relativo do RS e pequeno número de díades (i.e., junções entre SL e vesículas do RS, onde o processo de CICR é suposto ocorrer), e menor índice de co-localização de canais de Ca^{2+} do SL e do RS, com relação ao de adultos (Page *et al.*, 1974; Olivetti *et al.*, 1980; Page & Buecker, 1981; Wibo *et al.*, 1991).

No aspecto de expressão genética de proteínas do RS envolvidas no transporte de Ca^{2+} , há relatos de menores níveis de expressão (mRNA e/ou proteína) da ATPase de Ca^{2+} (Lompré *et al.*, 1991; Vetter *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000) e de canais de Ca^{2+} (Brillantes *et al.*, 1994) do RS em ventrículos imaturos. Por outro lado, tem sido observado aumento de expressão do trocador Na^+-Ca^{2+} , um transportador situado no SL, no coração de mamíferos muito jovens (Boerth *et al.*, 1994; Vetter *et al.*, 1995). De modo paralelo, tem-se observado, com a maturação, aumento da expressão da ATPase e taxa de captação de Ca^{2+} , pelo RS e redução da expressão da NCX e taxa de transporte de Ca^{2+} dependente de Na^+ em SL cardíaco (Vetter *et al.*, 1987; Hanson *et al.*, 1993; Magyar *et al.*, 1995).

Em termos funcionais, é mais complicado prever o efeito de alterações bioquímicas ou biofísicas subcelulares. Há, no entanto, evidência da existência de corrente de Ca^{2+} mediada por canais do tipo T (Wetzel *et al.*, 1991), de aumento da densidade de corrente mediada pela NCX (Artman *et al.*, 1995; Wetzel *et al.*, 1991; Haddock *et al.*, 1997) e de maior participação da NCX no relaxamento celular (Balaguru *et al.*, 1997; Bassani & Bassani, 2002) em ventrículo de mamíferos neonatos. Estas alterações são acompanhadas por relaxamento mais lento de contrações (Gombosová *et al.*, 1998; Ferraz

et al., 2001; Bassani & Bassani, 2002) e menor sensibilidade da amplitude de contrações a inibidores da função do RS (Agata *et al.*, 1983; Haddock *et al.*, 1997). Há, além disso, indicação de subsensibilidade ao Ca^{2+} do mecanismo de CICR (Fabiato, 1982) e de redução da fração de recirculação do Ca^{2+} ativador da contração (i.e., um parâmetro indireto que estima a mobilização de Ca^{2+} entre RS e citosol durante contrações sucessivas) em músculo ventricular de ratos neonatos (Vornanen *et al.*, 1994; Bassani *et al.*, 2001).

Estes resultados, portanto, são compatíveis com a possibilidade de maior importância do Ca^{2+} de origem extracelular para a ativação da contração em ventrículos de ratos imaturos em relação a adultos. No entanto, para melhor investigar esta possibilidade, são necessárias a quantificação do influxo de Ca^{2+} durante a ativação elétrica da célula miocárdica e a estimativa de quanto este influxo é capaz de modificar $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Para uma abordagem quantitativa do influxo de Ca^{2+} via canais dependentes de tensão do SL, vários autores utilizam a técnica de *voltage-clamp* (no modo *whole cell patch-clamp*, Sakmann & Neher, 1983), a qual, por meio do controle artificial de E_m , permite o registro de correntes iônicas geradas em todo o SL da célula, que podem ser posteriormente integradas para estimativa da quantidade de íons transportada. Neste processo, é importante isolar a corrente de interesse, por meio de bloqueio farmacológico e/ou elétrico de correntes contaminantes.

A influência da etapa ontogenética sobre a magnitude de $I_{\text{Ca,L}}$ no ventrículo de mamíferos tem sido analisada por diversos autores (Cohen & Lederer, 1988; Wetzel *et al.*, 1993; Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1998; Pignier & Potreau, 2000). Vornanen (1996) chegou a quantificar o influxo de Ca^{2+} através desta corrente. Estes autor utilizou, como estímulo, ondas quadradas despolarizantes (em geral para uma tensão de 0 mV), com duração fixa (de 100 a 200 ms) em todas as idades.

No entanto, o estímulo fisiológico para ativação da contração é o PA, que se constitui numa forma de onda complexa. Há, portanto, dois fatores que complicam a interpretação dos resultados obtidos com ondas quadradas. O primeiro é que a duração do PA ventricular sofre drástica modificação do nascimento até a idade adulta (Langer *et al.*, 1975; Fermini & Schanne, 1991). O segundo é que a duração do PA tem se mostrado um importante determinante da quantidade de Ca^{2+} transportada por canais do SL para o citosol de miócitos ventriculares (Sah *et al.*, 2001; Bassani *et al.*, 2002). Uma alternativa para

contornar este problema é a utilização da variação da técnica de *patch-clamp* conhecida como *action potential clamp* (APC), na qual se utiliza como estímulo uma forma de onda de tensão semelhante ao PA fisiológico (Arreola *et al.*, 1991; Janvier & Boyett, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Sah *et al.*, 2001; Bassani *et al.*, 2002). Esta abordagem permite, portanto, uma estimativa mais realista do influxo de Ca^{2+} durante um estímulo com características semelhantes ao fisiológico, e não é de nosso conhecimento nenhum estudo no qual esta abordagem tenha sido usada para avaliar o influxo de Ca^{2+} em células cardíacas durante o desenvolvimento pós-natal.

O único estudo disponível no qual o impacto do influxo de Ca^{2+} sobre a concentração citosólica do íon foi analisado durante o desenvolvimento cardíaco pós-natal é o de Vornanen (1996). Este autor (usando ondas estimulatórias quadradas) estimou que a carga transportada por $I_{\text{Ca,L}}$ em miócitos de ratos neonatos é cerca de apenas 30% daquela em adultos. No entanto, devido a diferenças ontogenéticas de área e volume celulares, o aumento na concentração total de Ca^{2+} no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$) devido a este influxo seria mais de 7 vezes maior em neonatos do que em adultos. Porém, nem todo o *pool* de Ca^{2+} que adentra a célula através do SL permanece no citosol em sua forma livre, na qual o íon está disponível para ligação com os miofilamentos e com canais de Ca^{2+} do RS. Parte deste *pool* equilibra-se com sítios que ligam Ca^{2+} passivamente (na maioria, proteínas citosólicas e organelares). Na sua forma ligada a *buffers*, Ca^{2+} fica, portanto, inacessível aos sítios importantes para o acoplamento excitação-contração e para a contração propriamente dita (Berlin *et al.*, 1994). Portanto, a variável relevante seria $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que é uma função não-linear de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$.

Bassani *et al.* (1998) relataram que a densidade de *buffers* passivos de Ca^{2+} no miocárdio ventricular de ratos sofre um aumento de cerca de 3 vezes do nascimento até a idade adulta. Isto significa que, para uma dada variação de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$, a variação correspondente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seria tanto maior quanto menor a abundância de *buffers*. Estas alterações podem modificar de modo importante o impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, sobre o acoplamento excitação-contração.

No presente estudo, foi proposto quantificar, em miócitos ventriculares isolados de ratos em desenvolvimento, o influxo de Ca^{2+} através da $I_{\text{Ca,L}}$ durante uma forma de onda estimulatória semelhante ao PA característico de cada faixa etária. A partir deste dado e de

estimativas do volume celular, foi possível calcular o efeito deste influxo sobre $[Ca^{2+}]_{tot}$, e, por fim, considerando as características de *buffers* passivos miocárdicos em cada idade, estimar o impacto deste influxo sobre $[Ca^{2+}]_i$.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

A - Determinar a forma de onda do potencial de ação (PA) em miócitos ventriculares isolados de ratos, durante o desenvolvimento pós-natal.

B - Estimar o influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} do tipo L em células cardíacas de ratos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, utilizando uma forma de onda despolarizante que simula um PA (técnica de *action-potential clamp* - APC).

C - Estimar o impacto do influxo de Ca^{2+} através desses canais sobre a concentração de Ca^{2+} livre no citosol.

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram usados ratos Wistar machos adultos (3-5 meses) e imaturos (0-21 dias) de ambos os sexos, 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*, e submetidos a um ciclo claro-escuro 12:12 horas. Os animais jovens permaneceram com as mães até o momento do sacrifício. As faixas etárias estudadas foram as mesmas utilizadas pela equipe em outros estudos.

3.2. PREPARAÇÃO BIOLÓGICA

Foram utilizados miócitos ventriculares de ratos de diferentes idades. Neste trabalho, agrupamos os animais por faixa etária, nos grupos de 0 a 3 dias (neonatos), 6 a 8 dias, 15 a 21 dias e de 3 a 6 meses (adultos).

3.3. ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES

Os miócitos ventriculares foram isolados por digestão enzimática (Bassani *et al.*, 1992; Bassani & Bassani, 2002). Após sacrifício do animal (por decapitação até uma semana de idade, e por exsanguinação após concussão cerebral em animais mais velhos), o coração era dissecado do animal e montado em um sistema de Langendorff, onde era perfundido por via aórtica com solução de Tyrode sem Ca^{2+} por ~6 min a 37 °C. Em seguida, colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ – USA.) era adicionada à solução de Tyrode, e esta solução era perfundida até que o coração ficasse flácido. O tecido ventricular era então separado, fragmentado, agitado e filtrado. As células em suspensão eram lavadas repetidas vezes e a concentração de Ca^{2+} na solução de Tyrode era aumentada progressivamente a cada lavagem, até 1 mM. As células eram colocadas em uma câmara de perfusão (ver item 3.7.3) com fundo de lamínula pré-tratada com colágeno, para melhorar a adesão celular. Após um período de 20 min para sedimentação das células,

a câmara era colocada sobre o estágio de um microscópio invertido (item 3.7.2) equipado com sistema de micromanipulador (item 3.7.5), como mostram as Figuras 3.8 e 3.9.

3.4. SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

3.4.1. Soluções de perfusão:

- a) Solução de Tyrode modificada (NT): contendo (mM) NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 1,5; [4-(2-hidroxietil)1-piperazina- ácido etano-sulfônico] (HEPES) 5; glicose 11,1 e CaCl₂ 1. O pH foi ajustado para 7,4 a 23°C com NaOH.
- b) Solução de perfusão para o bloqueio dos canais de potássio (BK): na solução NT, o KCl foi substituído por CsCl e foram acrescentados 3 mM de 4-aminopiridina (4-AP). O pH foi ajustado para 7,4 a 23°C com CsOH.

3.4.2. Soluções de micropipeta:

- a) Solução de micropipeta para registro do potencial de membrana: contendo (mM) KCl 130; NaCl 7; HEPES 10; e etileno-bis(oxietilenonitrilo) ácido tetraacético (EGTA) 0,5. O pH foi ajustado para 7,2 a 23°C com KOH.
- b) Solução de micropipeta para medição de correntes de Ca²⁺: contendo (mM) CsCl 130; MgCl₂ 5; KCl 1; HEPES 10; e EGTA 1. O pH foi ajustado para 7,2 a 23°C com CsOH.

3.5. MICROPIPETAS

Capilares de boro-silicato (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida - USA – mod. TW150F-3, parede fina) foram estirados em estirador programável (mod. P-97, Sutter Instrument Co., Novato, CA – USA) para produzir micropipetas com resistência de 1-3 MΩ para medição de correntes, e de 7-10 MΩ para medição do potencial de membrana, quando preenchidas com as respectivas soluções. A resistência do eletrodo foi medida com aplicação de um pulso-padrão do equipamento (5mV), que evocava uma corrente, a partir da qual era possível calcular a resistência. Imerso na solução de micropipeta, havia um eletrodo de prata cloretada conectado a um pré-amplificador

(*Headstage*), o qual, por sua vez, faz parte do equipamento de estimulação e aquisição de sinais (ver item 3.7.9).

3.6. MEDIÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA E DA CORRENTE DE CÁLCIO

3.6.1. Técnica de Patch-Clamp

A técnica de *patch-clamp* permite o registro do potencial elétrico e de correntes iônicas na membrana da célula nos modos de fixação da corrente (*current-clamp*) e fixação da tensão (*voltage-clamp*), respectivamente. Neste trabalho, utilizamos a configuração do *patch-clamp* denominada *whole-cell patch-clamping (wcpc)*, que permite o registro de correntes iônicas geradas na membrana de toda a célula. De forma resumida, o *wcpc* é obtido com a aproximação da ponta da micropipeta à célula (Figura 3.1). Em seguida, aplica-se uma pequena pressão negativa ao interior da micropipeta, com a intenção de provocar a adesão de parte da membrana celular à borda da ponta da micropipeta (formando um selo de alta resistência, $\geq 1 \text{ G}\Omega$, ver Figura 3.2). A resistência do selo era medida do mesmo modo usado para medir a resistência do eletrodo. Uma vez formado o selo, aplica-se pressão negativa adicional ao interior da micropipeta, até que a parte da membrana que está na ponta da micropipeta se rompa (*wcpc*, Figura 3.3). Neste momento, é estabelecido o acesso elétrico ao interior da célula, e assim podemos controlar artificialmente o potencial (fixação de potencial) ou a corrente (fixação de corrente) de membrana da célula.

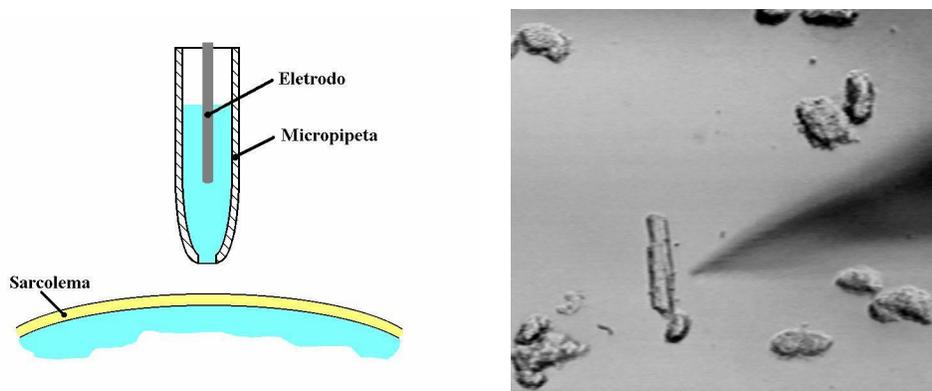


Figura 3.1 Esquema e foto da aproximação da ponta da micropipeta à célula, ambas imersas na solução de perfusão. No esquema representamos o interior da micropipeta preenchido com a solução de micropipeta e, imerso nesta, um eletrodo de prata cloretada.

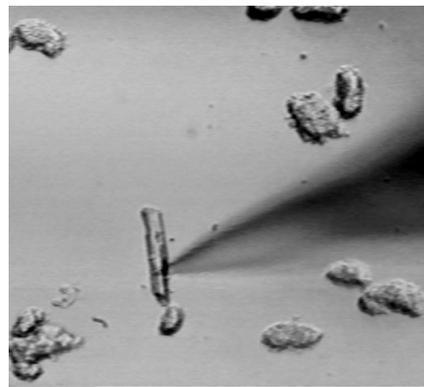
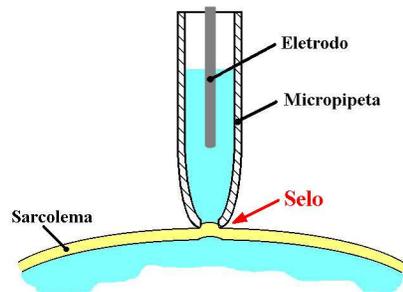


Figura 3.2 Esquema e foto da adesão de parte da membrana da célula à ponta da micropipeta, depois de aplicada pequena pressão negativa ao interior da micropipeta.

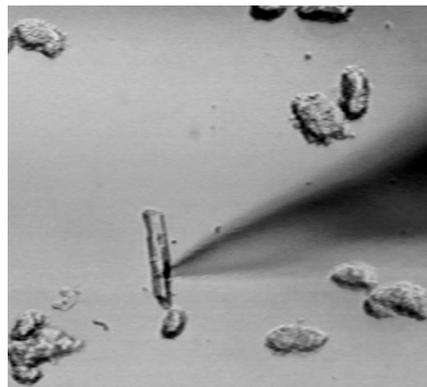
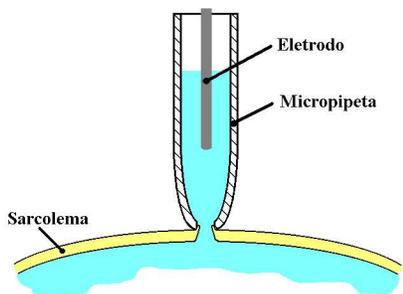


Figura 3.3 Esquema e foto da ruptura de uma pequena área da membrana (*patch*) sob a ponta da micropipeta, após a aplicação de pressão negativa adicional ao interior da micropipeta.

O potencial de junção líquida do eletrodo ($-5,98 \pm 0,97$ mV entre o par de soluções para registro de tensão e $-2,08 \pm 0,67$ mV entre o par de soluções para registro de corrente) foi corrigido antes do início do experimento. A capacitância do eletrodo foi compensada antes do selo ser formado e, para que se mantivesse a menor possível, procurou-se confeccionar eletrodos de baixa resistência, com pontas curtas e formato de bala (*bullet-shape*). Além disso, procurou-se minimizar a área de eletrodo imersa na solução do banho. O ângulo usado para posicionamento dos eletrodos foi ~ 60 graus com relação à horizontal.

3.6.2. Medição da Capacitância da Membrana Celular (C_m)

Neste trabalho os valores de C_m foram importantes para a quantificação da área de membrana e do influxo de Ca^{2+} . A membrana da célula é formada por uma bicamada lipídica que é responsável por suas propriedades dielétricas. Isso implica admitir que, por separar dois meios condutores, a membrana tem propriedades capacitivas. Sua capacitância é de $1\mu F/cm^2$ (Hille, 1992). A C_m total de uma célula ventricular inclui aquela da membrana superficial e aquela da membrana que reveste os túbulos T (estes são invaginações do sarcolema, espaçadas a intervalos regulares). As propriedades elétricas da membrana celular podem ser comparadas às de um equivalente elétrico chamado associação do tipo resistor-capacitor (circuito RC) em paralelo. Portanto, quando E_m é variado, é possível registrar uma corrente capacitiva da membrana em resposta à variação de potencial (ΔE_m). Para estimativa da C_m neste trabalho, a membrana da célula foi hiperpolarizada por um degrau de tensão, de -85 mV para -90 mV. A corrente resultante foi considerada como a resposta capacitiva da membrana, uma vez que, a estes valores de E_m , a ativação de correntes iônicas em miócitos ventriculares pode ser considerada desprezível. A partir do registro desta corrente, o programa *Clampfit* (ver item 3.7.8) permite calcular os valores de I_0 e τ_c (que são o pico e a constante de tempo de queda da corrente capacitiva, respectivamente) e de I_∞ (que é a corrente em *steady-state* no final do pulso). Estes parâmetros são calculados por meio do ajuste de uma função exponencial simples à fase de queda da corrente. Uma vez obtidos estes dados, podemos finalmente calcular C_m pela equação (Puglisi *et al.*, 1999):

$$C_m = \tau_c / \Delta E_m [I_0 / (1 - (I_\infty / I_0))]]$$

[Eq. 3.1]

3.6.3. Medição do Potencial de Membrana (E_m)

Quando é aplicado a uma célula excitável um estímulo elétrico de amplitude adequada (isto é, que causa despolarização da membrana, levando E_m para um valor crítico, o potencial limiar), ocorre uma variação rápida de E_m , de caráter tudo-ou-nada, denominada PA. É amplamente aceito que o PA seja disparado pela abertura de canais de Na^+ , em resposta à despolarização da membrana (Hille, 1992; Aidley, 1998).

No presente trabalho, PAs foram evocados por aplicação de pulsos de corrente a células sob *wcpc*, no modo de fixação de corrente. Inicialmente, registrou-se PAs na presença da solução de *NT*. Após registro do PA controle, foram registrados PAs na presença de *NT* contendo $CdCl_2$ (100 μM), para bloquear canais de Ca^{2+} do tipo L. Este bloqueador foi utilizado com o intuito de estudar a influência da corrente de Ca^{2+} através destes canais ($I_{Ca,L}$) sobre a forma de onda do PA. Os registros de E_m foram adquiridos à taxa de 10 kHz e filtrados a 5 kHz.

3.6.3.1. Grupos adulto e de 15-21 dias

Após aplicação do protocolo experimental para medição da capacitância (item 3.6.2), o modo de fixação de tensão era mudado para fixação de corrente (*current clamp*, Sakmann & Neher, 1993). O protocolo usado para evocar PAs foi bastante simples, consistindo da aplicação de 8 pulsos retangulares de corrente com duração de 2 ms e amplitude crescente de 1 a 8 pA, com incremento de 1 pA, à frequência de 0,5 Hz (Figura 3.4). Observou-se que, quando o estímulo de corrente provocava uma despolarização igual ou superior a 20 mV, um PA era disparado. A amplitude de corrente capaz de disparar um PA nos grupos de 15 a 21 dias e adulto foi de ~ 4 pA.

3.6.3.2. Grupos de 0-3 dias e de 6-8 dias

O protocolo usado neste caso foi semelhante ao descrito para o animal adulto. No entanto, utilizou-se 12 pulsos retangulares de corrente com duração de 8 ms e amplitude crescente de 0,1 a 1,2 pA, com incremento de 0,1 pA, à frequência de 0,5 Hz (Figura 3.5).

A despolarização de membrana requerida para disparo de um PA foi semelhante àquela no grupo adulto. A amplitude de corrente capaz de disparar um PA no grupo de 0 a 3 dias e 6 a 8 dias foi de ~ 1 pA.

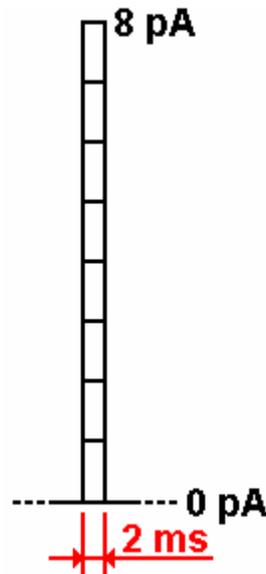


Figura 3.4 Protocolo usado para evocar PAs em miócitos de animais adultos. Aplicou-se pulsos retangulares de corrente de 2 ms de duração, com incremento de 1 pA até a corrente de 8 pA.



Figura 3.5 Protocolo usado na obtenção dos potenciais de ação em miócitos de animais jovens. Aplicou-se pulsos retangulares de corrente de 8 ms de duração com incremento de 0,1 pA até a corrente de 1,2 pA.

3.6.4. Medição de Correntes de Membrana

As correntes de membrana foram medidas no modo de fixação de tensão. A corrente de interesse neste trabalho foi a $I_{Ca,L}$, isto é, a corrente de cálcio do sarcolema mediada por canais de Ca^{2+} do tipo L, sensível a bloqueio por Cd^{2+} . Para evitar contaminação desta

corrente com a corrente de Na^+ , cada pulso de tensão usado para elicitar $I_{\text{Ca,L}}$ foi precedido por uma rampa despolarizante, a partir de um valor de -80 ou -90 mV para -50 mV por 70 ms (vide itens 3.6.3.1 e 3.6.3.2). Sabe-se que a abertura dos canais de Na^+ é ativada por tensão, e a inativação é dependente do tempo. O número de canais que serão abertos em resposta à despolarização depende do potencial de repouso da célula, da amplitude do pulso despolarizante e da taxa de variação deste pulso (ou ângulo da rampa despolarizante; Magistretti & Alonso, 1999; Bers, 2001). Assim, quanto mais rapidamente o potencial de membrana é deslocado do valor de repouso para o potencial-teste, mais canais serão abertos e, conseqüentemente, maior será a amplitude da I_{Na} . Como a inativação deste canal depende do tempo, os canais abertos se inativarão logo a seguir. Assim, o uso de uma rampa despolarizante de inclinação relativamente baixa e duração relativamente grande tem por objetivo inativar os canais de Na^+ (cuja faixa de ativação e inativação ocorre em potenciais bem mais negativos do que aqueles para ativação de $I_{\text{Ca,L}}$) antes da aplicação dos estímulos-testes.

A contaminação da corrente registrada com correntes de K^+ foi minimizada com o uso de inibidores seletivos de canais de potássio (Cs^+ e 4-AP) na solução de perfusão (Bouchard *et al.*, 1995).

Para isolamento de $I_{\text{Ca,L}}$, incluiu-se um bloqueador de canal de Ca^{2+} tipo L (CdCl_2 , na concentração de 100 μM) na solução *BK* que perfundia as células. As correntes obtidas na presença de Cd^{2+} foram subtraídas daquelas obtidas em sua ausência na mesma célula, para determinação da $I_{\text{Ca,L}}$ sem interferência de possíveis correntes contaminantes residuais. Todas as correntes foram adquiridas à taxa de 20 kHz e filtradas a 5 kHz. A amplitude de $I_{\text{Ca,L}}$ foi considerada como a diferença entre o valor de pico e o valor da corrente ao final do pulso estimulatório.

3.6.4.1. Curva corrente–tensão (I-V)

Para descrição da relação entre a amplitude de $I_{\text{Ca,L}}$ e o valor de E_m , determinou-se a curva corrente-tensão (I-V) em células de todas as faixas etárias. O protocolo estimulatório consistiu de degraus de tensão (pulsos-testes) aplicados a partir do potencial de -50 mV,

com incrementos de 10 mV, à frequência de 0,5 Hz, até um potencial-teste máximo de + 50 mV. A duração de cada pulso-teste foi de 100 ms. Cada pulso-teste foi precedido por uma rampa despolarizante, partindo de um potencial de -80 mV (E_{hold} , i.e., potencial no qual a membrana foi mantida no intervalo entre pulsos-testes) para -50 mV, com o objetivo de inativar canais de Na^+ (ver Figura 3.6). As correntes registradas foram armazenadas em computador para análise posterior.

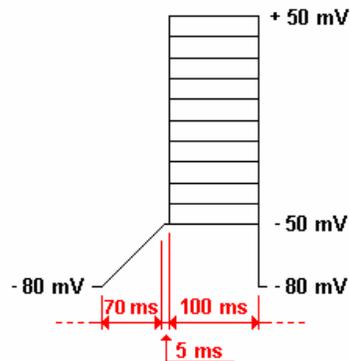


Figura 3.6 Protocolo usado para a obtenção da curva I-V. No início do protocolo de estimulação, foi aplicada uma rampa despolarizante partindo de um potencial de -80 mV para -50 mV (0,7 mV/ms), com o objetivo de inativar os canais de Na^+ . Em seguida, foram aplicados degraus de tensão, de -50 mV até +50 mV, com incrementos de 10 mV e duração de 100 ms, para evocar $I_{\text{Ca,L}}$.

3.6.4.2. *Clamp* de tensão com a forma do potencial de ação: *action potential-clamp* (APC)

Para registrarmos $I_{\text{Ca,L}}$ evocada por estímulos elétricos com a forma do PA fisiológico, criamos no programa pClamp 6[®] uma forma de onda estimulatória semelhante ao PA característico de cada grupo etário, a partir dos respectivos PAs registrados previamente. Na Figura 3.7, estão apresentados exemplos destas formas de onda, baseadas em PAs registrados em miócitos de um animal neonato (3 dias, painel A) e de um animal adulto (painel B). Observe que ambos os estímulos foram precedidos por uma rampa despolarizante de -90 mV para -50 mV (permanecendo neste nível por 70 ms), para inativação dos canais de Na^+ , antes do estímulo propriamente dito.

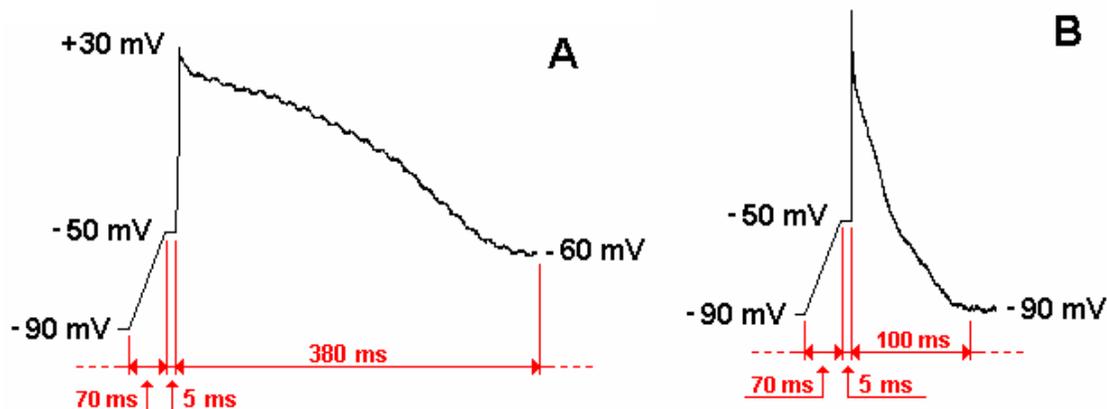


Figura 3.7 Formas de onda estimulatórias, de tensão, baseadas em PAs registrados em miócitos de ratos de 3 dias de idade (A) e adulto (B). Estas formas de onda, utilizadas para evocar $I_{Ca,L}$ em células das respectivas faixas etárias foram precedidas por uma rampa despolarizante para inativação da corrente de Na^+ .

3.7. INSTRUMENTAÇÃO

Na Figura 3.8 apresenta-se uma foto do *setup* experimental e na Figura 3.9, um desenho que ilustra toda a instrumentação utilizada neste trabalho.

Descreve-se a seguir a instrumentação utilizada, conforme as especificações dos respectivos equipamentos:

3.7.1. Mesa anti-vibração (mod. Micro-g 163-531, Technical Manufacturing Corporation (TMC), Peabody, MA – USA): Este equipamento evita que vibrações externas prejudiquem os registros experimentais. O equipamento constitui-se de um suporte metálico que possui quatro amortecedores pneumáticos que filtram o ruído mecânico externo. Sobre estes amortecedores há uma chapa de aço revestida com aço inoxidável, sobre a qual fica o microscópio invertido.

3.7.2. Microscópio invertido (Nikon Corp., Tokyo - Japão – mod. Diaphot 300): Este microscópio permite a observação do material biológico. A ele foi acoplada uma câmara de vídeo digital (Sony Corp., Tokyo - Japão – mod. SSC-M256), que gera um sinal de vídeo para um monitor (Sony Corp., Tokyo - Japão – mod. SSM-930), que pode também ser enviado a um gravador de vídeo-cassete (Sony da Amazônia Ltda., Manaus, AM – mod. SLV – EX5BR).



Figura 3.8 Fotografia do *setup* experimental usado para os experimentos de eletrofisiologia.

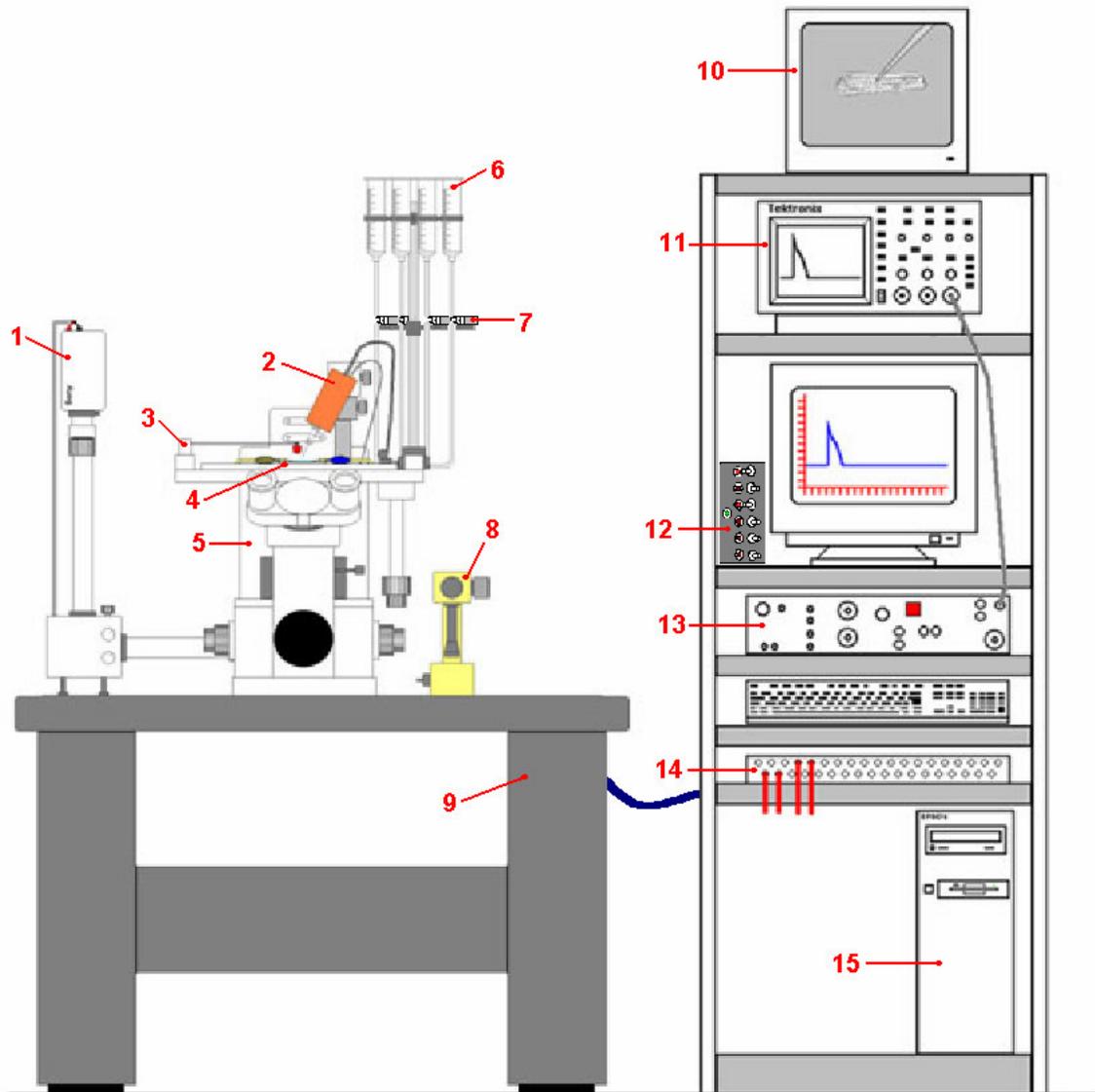


Figura 3.9 Esquema geral da posição dos equipamentos: **1**, câmera de vídeo digital; **2**, mini-gaiola de Faraday e pré-amplificador (dentro desta); **3**, suporte do LED para iluminação; **4**, câmara de perfusão de células isoladas (ver detalhes na Figura 3.10); **5**, microscópio invertido; **6**, seringas para armazenamento de soluções; **7**, válvulas solenóides; **8**, micro-manipulador; **9**, mesa anti-vibração; **10**, monitor de vídeo; **11**, osciloscópio digital; **12**, selecionador de soluções; **13**, amplificador de *patch-clamp*; **14**, conversor A/D e D/A (Digidata 1200B); e **15**, computador. As células cardíacas presentes na câmara de perfusão são banhadas com uma das soluções contidas numa das seringas. As soluções que banham as células são selecionadas por válvulas solenóides, posicionadas próximas às seringas e acionadas pelo selecionador de soluções. A solução de perfusão é aspirada por vácuo. Os sinais analógicos medidos nos miócitos são digitalizados (pelo Digidata 1200B), amplificados e registrados no computador. Os estímulos são gerados no computador e convertidos de digital para analógico pelo Digidata 1200B.

3.7.3. Câmara de perfusão para células isoladas (Confeccionada no Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas, SP): Esta câmara foi fabricada em acrílico, com um rasgo passante no centro. Sob este rasgo era colada uma lamínula de vidro, formando assim um pequeno reservatório onde a suspensão de células era depositada (ver Figuras 3.10 e 3.11).

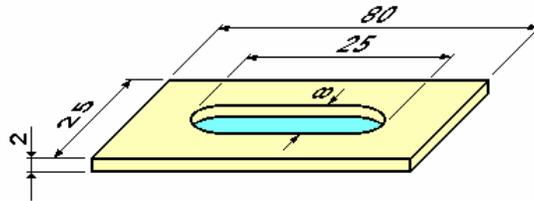


Figura 3.10 Câmara de perfusão onde as células cardíacas são depositadas para a realização dos experimentos. As dimensões em milímetros estão indicadas na figura.

3.7.4. Mini-Gaiola de Faraday (Desenvolvida e confeccionada no Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas, SP): Dada a baixa amplitude dos sinais de corrente e PAs registrados, fez-se necessário o desenvolvimento de uma mini-gaiola de Faraday para o pré-amplificador, para minimizar interferências eletromagnéticas. O equipamento constitui-se de uma caixa de chapa fina de cobre com pequenos furos para ventilação.

3.7.5. Micro-manipulador (mod. Joystick Hydraulic Micromanipulator MO-188, Narishige Co., Ltd., Tokyo - Japão): Este micro-manipulador permite movimentos em 3 eixos, por meio de controle remoto hidráulico. Ele foi utilizado para posicionar a ponta da micropipeta próximo à membrana da célula.

3.7.6. Computador (AT 486 DX4 - 100 MHz, Acer do Brasil Ltda., Barueri, São Paulo, SP): Neste computador estava instalado o pacote de programas *pCLAMP 6* (Axon Instruments Inc., Foster City, CA – USA) que permite a geração dos sinais de estimulação (corrente ou tensão) e aquisição, armazenamento e processamento dos sinais medidos nas células.

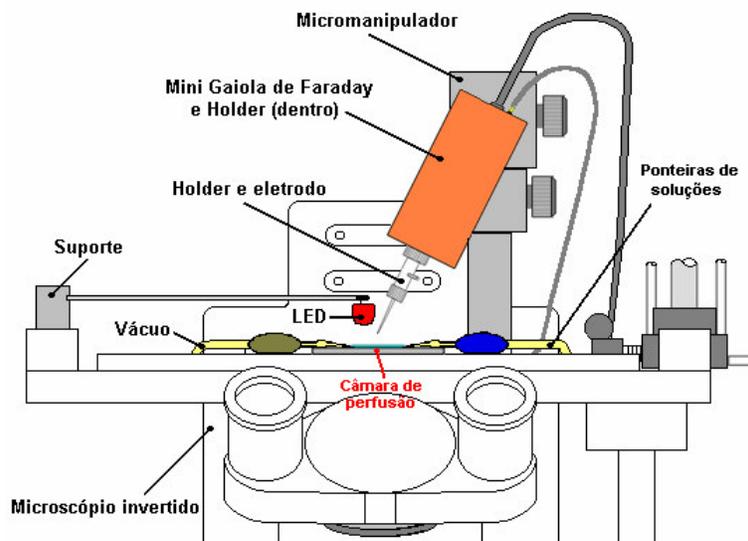


Figura 3.11 Esquema da montagem experimental. Cada solução entra por uma das ponteiros de entrada, posicionada em um canto da câmara de perfusão. A solução que banha as células é aspirada por uma outra ponteira ligada a uma linha de vácuo. Sobre a câmara de perfusão está posicionado o conjunto *Holder* e micropipeta, presos ao pré-amplificador (*Headstage*), que é colocado dentro da mini-gaiola de *Faraday*. Estes componentes são movimentados por um micro-manipulador. Para iluminar o campo onde as células estão presentes, usamos um LED vermelho.

3.7.7. Conversor A/D e D/A (mod. Digidata 1200 B, Axon Instruments Inc., Foster City, CA – USA): Este instrumento consiste de conversores de sinais analógico/digital (A/D) e digital/analógico (D/A). O sinal de estimulação é gerado no programa *Clampex* (que faz parte do pacote *pCLAMP 6*[®]; ver item 3.7.8) e transmitido ao *Digidata 1200B*, que o converte de digital para analógico. Já o sinal medido na célula, após ser amplificado pelo amplificador *Axopatch 200B*, é transmitido para o *Digidata 1200B*, que o converte de analógico para digital, para armazenamento no computador. O *Digidata 1200B* pode adquirir à taxa de até 333 kHz, possui 32 canais de entrada A/D, 2 canais de saída D/A, 8 entradas digitais e 8 saídas digitais.

3.7.8. pCLAMP 6[®] (versão 6.0.3, Axon Instruments Inc., Foster City, CA – USA): O pCLAMP 6 é um pacote de programas para serem utilizados em experimentos eletrofisiológicos. Os programas utilizados neste trabalho foram:

Clampex: permite o controle de parâmetros experimentais, tais como a tensão (fixação de tensão) e a corrente (fixação de corrente) aplicadas às células, e da aquisição de sinais.

Clampfit: permite a análise e cálculos de parâmetros a partir dos sinais obtidos experimentalmente.

3.7.9. Amplificador de *patch-clamp* (mod. Axopatch 200B, Axon Instruments Inc., Foster City, CA – USA): Este equipamento foi utilizado para amplificar e filtrar os sinais adquiridos. Ele é composto por dois módulos: um pré-amplificador (*Headstage*), e o amplificador propriamente dito, que permite a amplificação do sinal de saída de 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 e 500 vezes. Além disso, este equipamento dispõe de controladores para compensação de capacitância e resistência, e de seleção do ganho e do modo de operação (fixação de corrente ou tensão).

3.7.10. Osciloscópio digital (mod. TDS 210, 60 MHz, Tektronix Inc., Beaverton, OR - USA): O osciloscópio digital foi utilizado para a monitoração dos sinais captados pelo equipamento de aquisição de dados.

3.7.11. Seleccionador de soluções (Desenvolvido e confeccionado no Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas): A troca de soluções era realizada por meio de um conjunto de três válvulas solenóides (mod. LFAA 0501618H, Lee Company, Westbrook, CT – USA). Estas eram acionadas manualmente por chaves tipo alavanca de um polo e duas posições (ligadas a uma fonte de alimentação de 5 V, 1 A), independentes para cada válvula solenóide. Assim, pôde-se realizar a troca rápida da solução de perfusão. A fim de isolar o ruído elétrico provocado pelo acionamento das válvulas, que pode se propagar pelo interior da tubulação, um recipiente cata-bolhas foi conectado à saída de cada seringa. As válvulas solenóides possuem as seguintes especificações: a) três vias: uma normalmente fechada (NF), uma normalmente aberta (NA) e uma de entrada; b) pressão (máxima) de 10 PSI; e c) alimentação de 5 V.

3.8. CÁLCULOS

3.8.1. Amplitude do PA, Taxa de Despolarização e APD₇₅

A amplitude do PA foi considerada como a diferença entre o potencial de repouso (E_{dia}) e o pico do potencial de ação. A taxa de despolarização foi calculada por regressão linear para valores de E_m entre -50 mV a 0 mV, durante a fase de despolarização rápida (fase zero) do PA. Para realizar este e os demais cálculos neste estudo, utilizou-se o programa *GraphPad Prism* (versão 2.0, GraphPad Prism Inc., San Diego, CA – USA).

A APD₇₅ foi definida como a duração do PA desde seu início até 75% de repolarização.

3.8.2. Curva de Ativação de $I_{\text{Ca,L}}$ em *Steady-State*

Esta curva foi determinada como em Katsube *et al.* (1998). A partir dos valores de $I_{\text{Ca,L}}$ obtidos da relação I-V, calculou-se, para cada valor de tensão do pulso-teste, a condutância da membrana ao Ca^{2+} mediada por canais de Ca^{2+} do tipo L ($g_{\text{Ca,L}}$):

$$g_{\text{Ca,L}} = I_{\text{Ca,L}} / (E_m - E_{\text{rev}}) \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde $I_{\text{Ca,L}}$ é a amplitude de pico da corrente e E_m é o valor de tensão no qual a membrana foi fixada durante o pulso-teste, respectivamente. E_{rev} é o potencial de reversão da corrente

(i.e, no qual $I_{Ca,L} = \text{zero}$), que foi determinado para cada célula por extrapolação da curva I-V.

Os valores de $g_{Ca,L}$ foram normalizados pelo valor máximo desta variável, e os dados foram ajustados pela equação de Boltzmann, para cálculo de E_h (potencial no qual a condutância da membrana é de 50% do máximo) e k (fator de inclinação da relação entre $g_{Ca,L}$ relativa e o potencial de membrana, tanto menor quanto mais inclinada for a curva). A equação usada para este ajuste foi:

$$g_{Ca,L} = g_{\min} + (g_{\max} - g_{\min}) / \{1 + \exp [(E_h - E_m) / k]\} \quad [\text{Eq. 3.3}]$$

onde g_{\min} e g_{\max} representam os valores mínimo e máximo de $g_{Ca,L}$, respectivamente.

3.8.3. Cálculo do incremento na concentração total de Ca^{2+} no citosol ($\Delta[Ca^{2+}]_{\text{tot}}$) devido ao influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$

O influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$ resulta em aumento da concentração total de Ca^{2+} no citosol de um valor diastólico ($[Ca^{2+}]_{\text{tot-dia}}$) para um valor de pico ($[Ca^{2+}]_{\text{tot-p}}$). Definimos como $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{tot}}$ a diferença entre $[Ca^{2+}]_{\text{tot-p}}$ e $[Ca^{2+}]_{\text{tot-dia}}$. O cálculo da $\Delta[Ca]_{\text{tot}}$ feito neste estudo, em μmoles por litro de volume citosólico não-mitocondrial, foi baseado em técnica já utilizada em outros trabalhos (Delbridge *et al.*, 1996; Puglisi *et al.*, 1999). Neste cálculo, assumimos que todo o Ca^{2+} que teve acesso ao meio intracelular através de $I_{Ca,L}$ distribuiu-se de modo homogêneo no citosol e não foi posteriormente extruído através do sarcolema ou transportado para compartimentos intracelulares.

Para este cálculo, o primeiro passo é a determinação da carga (em pC) transferida através dos canais de Ca^{2+} do tipo L para o interior da célula durante um pulso despolarizante. Para isto, realiza-se a integração da $I_{Ca,L}$ no tempo ($\int I_{Ca}(t) \cdot dt$), ou seja, durante toda a duração do pulso-teste.

O próximo passo é calcular o número de moles de Ca^{2+} equivalentes à carga transferida. Para isso, $\int I_{Ca}(t) \cdot dt$ é dividida pelo produto da constante de Faraday ($F = 96480 \text{ C / mol}$) e valência do íon ($z = +2$).

A seguir, o valor obtido é dividido pelo produto do volume celular (V_C) e da fração não-mitocondrial do volume celular (f_{nm}), para obtenção de $\Delta[Ca^{2+}]_{\text{tot}}$. O valor de f_{nm}

permite a correção para o volume citosólico ao qual o Ca^{2+} tem acesso imediato. Este valor é 0,70 para o grupo de 6-8 dias e 0,65 para os demais grupos etários (Olivetti *et al.*, 1980; Hirakow *et al.*, 1980).

Assim temos:

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}} = \int I_{\text{Ca,L}}(t) \cdot dt / (z \cdot F \cdot V_C \cdot f_{\text{nm}})$$

[Eq. 3.4]

3.8.4 Cálculo do volume celular (V_C)

A amplitude e a integral da corrente iônica são dependentes não somente do potencial de membrana e gradientes de concentração iônica, mas também da área total de membrana através do qual a corrente flui (i.e., área de superfície da célula). O fato da capacitância específica da membrana ser aproximadamente $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ em diferentes tipos de células e espécies (Hille, 1992) permite que valores de C_m medidos por métodos eletrofisiológicos sejam usados para estimar a área da superfície da membrana de células.

Infelizmente, a área da superfície da membrana, que pode ser facilmente estimada pela medida da C_m , não permite inferir sobre o volume celular de miócitos cardíacos, porque a geometria celular, o grau de dobramento da membrana e a abundância dos túbulos T são altamente variáveis entre diferentes tipos de células. Mesmo em miócitos ventriculares de uma dada espécie, há grande variação com o estágio de desenvolvimento (Hirakow *et al.*, 1980; Olivetti *et al.*, 1980; Page *et al.*, 1974). Page *et al.* (1974) relataram que o desenvolvimento dos túbulos T em células ventriculares de rato ocorre entre o décimo e o vigésimo dias de vida pós-natal do animal. Além disso, a geometria dos miócitos ventriculares de rato é fortemente dependente da idade do animal (Gomes *et al.*, 2001). Contudo, não foi encontrado na literatura um único método de conversão dos valores de C_m para V_C , no qual fosse levado em conta o estágio de desenvolvimento pós-natal do animal nas faixas etárias do presente estudo. Assim, em nosso trabalho, utilizamos vários métodos para cálculo de V_C nas diferentes faixas etárias, e utilizamos os valores obtidos no cálculo de outras variáveis.

O método A foi baseado em dados de Olivetti *et al.* (1980) que estimaram, por meio de microscopia eletrônica, V_C e a área de membrana celular em cortes de miocárdio ventricular de ratos de 5 e 11 dias. Com estes dados em mãos, calculamos um fator de

conversão de área da superfície da membrana para V_C (R dado em μm) para o grupo etário de 6-8 dias. R foi determinado a partir da média dos valores dos volumes das células dos ventrículos direito e esquerdo ($V_{C\text{médio}}$ dado em pL) desta faixa etária (pois em nosso trabalho não separamos o ventrículo direito do esquerdo durante o isolamento das células), dividida pela média dos valores das áreas da superfície da membrana das células dos ventrículos direito e esquerdo ($A_{m\text{ média}}$ dada em μm^2):

$$R = V_{C\text{ médio}} / A_{m\text{ média}} \quad [\text{Eq. 3.5}]$$

Podemos, portanto, calcular V_C no grupo de 6-8 dias multiplicando R pelo valor da área da membrana celular (A_m , estimada pela C_m medida, considerando-se a relação $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, Hille, 1992), como mostra a equação abaixo:

$$V_C = R \cdot A_m \quad [\text{Eq. 3.6}]$$

O valor de R calculado para o grupo etário de 6 a 8 dias foi de $1,830 \mu\text{m}$. Assim:

$$V_C = 1830 \cdot 10^{-3} \text{ pl}/\mu\text{m}^2 \cdot A_m \quad [\text{Eq. 3.7}]$$

O método **B** foi baseado no trabalho Vornanen (1996), que propôs uma equação para o cálculo de V_C a partir do comprimento e largura da célula vista em um microscópio óptico comum. Em seu trabalho, foram utilizados miócitos ventriculares de rato de diferentes idades (de 1 dia à idade adulta). Todas as células foram consideradas como um tubo de secção transversal elíptica (ver Figura 3.12). Deste modo, V_C pode ser estimado como:

$$V_C = \pi \cdot a \cdot b \cdot l \quad [\text{Eq. 3.8}]$$

onde a e b são os eixos menor e maior da elipse, e l é o comprimento da célula. Os eixos menor e maior da elipse foram considerados como $1/6$ e $1/2$ do comprimento da célula respectivamente. No entanto, Vornanen (1996) não considerou na sua equação o grau de desenvolvimento dos túbulos T, que, no caso dos grupos de 15-21 dias e adulto, já seria bastante avançado (Page, *et al.*, 1978).

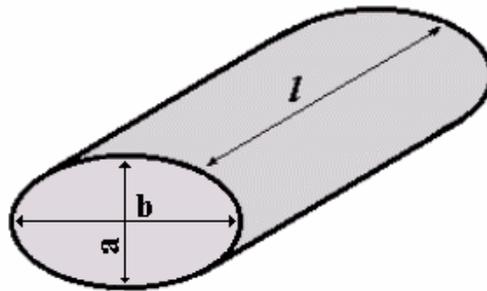


Figura 3.12 Desenho da célula cardíaca se considerada como sendo um tubo com secção transversal elíptica, onde a e b indicam os eixos menor e maior da elipse, e l indica o comprimento da célula.

Finalmente os dois últimos métodos foram obtidos do trabalho de Satoh *et al.* (1996), que mediram, em células ventriculares de ratos adultos de diferentes idades, C_m com a técnica de *wcpc*, e estimaram a área da superfície de uma das faces da célula (A_F) a partir do comprimento e largura das células, medidas por microscopia óptica. Estes valores foram relacionados com V_C , que foi medido por microscopia confocal de rastreamento com laser (*laser scanning confocal microscopy*). Com estes dados, estes autores propuseram duas equações, que estimam o V_C a partir de A_F (método **C**, Eq. 3.9), e outra que permite o cálculo do V_C diretamente a partir de C_m (método **D**, Eq. 3.10):

$$V_C = 7,59 \cdot 10^{-3} \text{ pl}/\mu\text{m}^2 \cdot A_F \quad [\text{Eq. 3.9}]$$

$$V_C = 0,078 \cdot C_m + 11,755 \quad [\text{Eq. 3.10}]$$

No entanto, estas estimativas podem não se aplicar a células de ratos com idade inferior a 3 semanas, pois nestas células o sistema de túbulos T ainda não está totalmente desenvolvido (Hirakow *et al.*, 1980; Page, 1974). Além disso, dependendo da idade, a geometria das células é bem diferente daquelas de adultos (Gomes *et al.*, 2001).

No presente estudo, V_C foi, quando aplicável, estimada pela relação superfície-volume calculada a partir dos dados de Olivetti *et al* (1980), a partir das relações propostas por Satoh *et al* (1996) e a partir do modelo utilizado por Vornanen (1996).

3.8.5. Cálculo do Incremento da Concentração de Ca^{2+} Livre no Citosol ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) Devido ao Influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$

O grau de ativação dos miofilamentos em células musculares estriadas é altamente dependente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e esta variável, mantida em equilíbrio dinâmico, depende do fluxo resultante do íon entre o citosol e outros compartimentos (intracelulares e/ou extracelular), bem como da ligação de Ca^{2+} a diversos sítios de acesso citosólico. Estes sítios incluem, além dos transportadores de Ca^{2+} , os chamados *buffers* passivos de Ca^{2+} , com os quais o íon se liga, sem, no entanto, ser removido do citosol. Tem sido proposto que a ligação de Ca^{2+} aos *buffers* passivos (ex., calmodulina, troponina C, fosfolípides) amortee grandes variações de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico que ocorrem durante, por exemplo, a liberação de Ca^{2+} pelo RS (Langer & Peskoff, 1996; Bers *et al.*, 2001).

Podemos, portanto, considerar que $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja a diferença entre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ e a concentração de Ca^{2+} ligada a estes últimos sítios ($[\text{Ca}^{2+}]_B$), já que:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{Ca}^{2+}]_i + [\text{Ca}^{2+}]_B$$

[Eq. 3.11]

Para uma dada $[Ca^{2+}]_i$, é possível estimar-se $[Ca^{2+}]_B$ e $[Ca^{2+}]_{tot}$ se são conhecidas as características dos sítios de ligação, como sua densidade máxima (B_{max}) e sua constante de dissociação aparente de Ca^{2+} (K_d):

$$[Ca^{2+}]_{tot} = [Ca^{2+}]_i + ([Ca^{2+}]_i \cdot B_{max}) / (K_d + [Ca^{2+}]_i)$$

[Eq. 3.12]

Durante um PA, Ca^{2+} extracelular adentra a célula principalmente através dos canais de Ca^{2+} do SL e liga-se a sítios de alta afinidade presentes nos canais de Ca^{2+} do RS, promovendo, assim, liberação do íon desta organela (Fabiato, 1983). Portanto, além da ativação dos miofilamentos *per se*, também o processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} depende de $[Ca^{2+}]_i$.

No presente estudo, temos interesse em estimar o impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$ sobre a variável relevante para o acoplamento excitação-contração, que é $[Ca^{2+}]_i$. Assim, podemos definir $\Delta[Ca^{2+}]_i$ como a diferença entre o valor de pico de $[Ca^{2+}]_i$ atingido após o incremento devido ao influxo ($[Ca^{2+}]_{i-p}$) e o valor diastólico de $[Ca^{2+}]_i$ prévio ao PA ($[Ca^{2+}]_{i-dia}$).

$$\Delta[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{i-p} - [Ca^{2+}]_{i-dia}$$

[Eq.3.13]

Utilizando $[Ca^{2+}]_i$ para estimar $[Ca^{2+}]_{tot}$ como na eq. 3.12:

$$\Delta[Ca^{2+}]_{tot} = [Ca^{2+}]_{tot-p} - [Ca^{2+}]_{tot-dia} = \{[Ca^{2+}]_{i-p} + ([Ca^{2+}]_{i-p} \cdot B_{max}) / (K_d + [Ca^{2+}]_{i-p})\} - \{[Ca^{2+}]_{i-dia} + ([Ca^{2+}]_{i-dia} \cdot B_{max}) / (K_d + [Ca^{2+}]_{i-dia})\}$$

[Eq. 3.14]

$[Ca^{2+}]_{tot-dia}$ foi calculado a partir de:

a) valores de $[Ca^{2+}]_{i-dia}$ relatados por Bassani & Bassani (2000) em miócitos ventriculares isolados de ratos (0,25, 0,26 e 0,23 μM em células de animais de 1 e 2 semanas de idade e de e adultos, respectivamente); e

b) constantes de *buffer* passivo de Ca^{2+} determinadas em miocárdio ventricular de ratos em desenvolvimento (Bassani *et al.*, 1998): B_{max} de 176, 264 e 300 μM para animais de 1 e 2 semanas de idade e adultos, respectivamente; K_d de 0,53 μM para todas as idades.

Somando o valor calculado de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-dia}}$ àquele de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ estimado como descrito em 3.8.3, temos $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}}$. A partir deste valor, por substituição da eq. 3.12, é possível calcular $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}}$ por meio da equação de segundo grau:

$$([\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}})^2 + (\mathbf{K_d} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}} + \mathbf{B_{max}}) \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}} + (-[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}} \cdot \mathbf{K_d}) = \mathbf{0}$$

[Eq. 3.15]

Esta equação fornece duas raízes, apenas uma delas positiva, que foi tomada como a expressão de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}}$:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}} = (-(\mathbf{K_d} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}} + \mathbf{B_{max}}) + \sqrt{\mathbf{D}}) / 2$$

sendo:

$$\mathbf{D} = (\mathbf{K_d} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}} + \mathbf{B_{max}})^2 - 4(-[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot-p}} \cdot \mathbf{K_d})$$

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ foi então calculado como a diferença entre $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-p}}$ (calculado pela eq. 3.13) e $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i-dia}}$ (Bassani & Bassani, 2000).

3.9. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A comparação entre os valores de capacitância (dado em pF) nas diferentes idades (dado em dias ou meses) foi realizado com análise de variância monofatorial e com o teste *t* para comparação *post-hoc* das médias. Este tipo de análise também foi usado para análise da influência da idade sobre os parâmetros da curva de ativação de $I_{\text{Ca,L}}$ (dado em pS) e as dimensões celulares (dada em μm). Análise de variância bifatorial para dados pareados foi usada para comparação de V_C (dado em pL), $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ (dado em $\mu\text{mol/L}$ citosol) e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ (dado em nM) com relação à idade e ao método de cálculo de V_C .

Utilizamos análise de variância bifatorial seguida de teste *t post-hoc* para avaliarmos os efeitos dos diferentes tratamentos (presença e ausência de Cd^{2+}) e idades sobre E_{dia} (dado em mV), a amplitude do PA (dado em mV), a taxa de despolarização (dado em mV/ms) durante a fase zero do PA e APD_{75} (dado em ms). Este tipo de análise também foi usado para teste do efeito do Cd^{2+} sobre a curva I-V (dado em pA/pF) de miócitos adultos e sobre a amplitude (dado em pA) e densidade de $I_{\text{Ca,L}}$ (dado em pA/pF) em resposta a um degrau estimulatório para zero mV em células de diferentes idades, para comparação das curvas I-V em miócitos de neonatos e adultos, para comparação dos valores de V_C , $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtidos com os diferentes métodos para cálculo de V_C . Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. CAPACITÂNCIA DE MEMBRANA

A Tabela 4.1 apresenta os valores médios da capacitância de membrana (C_m) em miócitos ventriculares de ratos dos diferentes grupos etários. Estes dados estão ilustrados na Figura 4.1. Observou-se que o valor de C_m dependeu do estágio de desenvolvimento do animal ($p < 0,0001$), como já relatado na literatura (Masuda & Sperelakis, 1993; Gomez *et al.*, 1994; Satoh *et al.*, 1996; Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1997, Pignier & Potreau, 2000). No entanto, diferentemente do observado por Vornanen (1996), C_m foi comparável nos grupos de animais imaturos estudados aqui, embora, em todos estes grupos, C_m tenha sido significativamente menor do que em adultos (cerca de 3 vezes, $p < 0,05$). A semelhança do valor médio C_m entre os grupos de 0-3, 6-8 e 15-21 dias provavelmente se deveu ao fato de termos escolhido células maiores nos dois grupos mais jovens, pois foram as únicas células que possibilitaram o registro de $I_{Ca,L}$ e E_m .

Tabela 4.1 Médias \pm erros-padrões (EPM) de capacitâncias de membrana em miócitos ventriculares de ratos de diferentes idades. n = número de células estudadas. * $p < 0,05$ com relação ao grupo adulto.

Capacitâncias (pF)				
Faixa etária	0 a 3 dias	6 a 8 dias	15 a 21 dias	Adulto (3 a 4 meses)
n	10	11	11	16
Capacitâncias	$31,9 \pm 2,6^*$	$37,5 \pm 2,7^*$	$45,3 \pm 3,1^*$	$117,3 \pm 9,9$

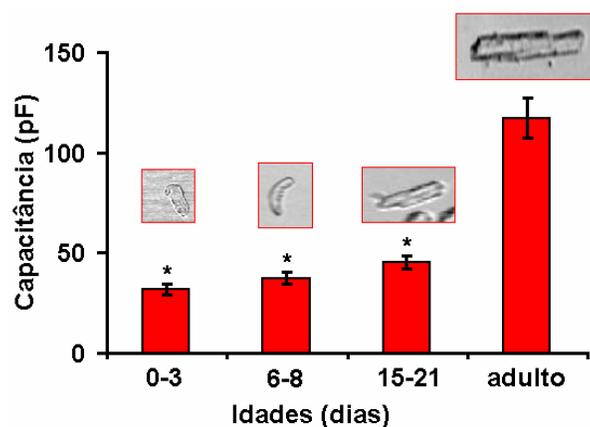


Figura 4.1 Valores médios de capacitância de membrana de miócitos ventriculares de ratos e fotos de células representativas dos diferentes grupos etários. As linhas verticais indicam o EPM. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo adulto.

4.2. POTENCIAIS DE AÇÃO (PA)

Na Figura 4.2, apresentamos os registros típicos dos PAs em células de animais de diferentes idades, perfundidas com *NT* e *NT + Cd²⁺*. O registro de cada idade é o registro que mais se aproxima dos valores médios de *APD₇₅*, amplitude do potencial e *E_{día}* medidos no conjunto de células. Os valores médios destes parâmetros estão apresentados na Tabela 4.2. Para avaliar a influência de *I_{Ca,L}* sobre a forma de onda do PA, procedeu-se ao registro de PAs na presença de *Cd²⁺*, bloqueador desta corrente. Ressalte-se que o PA típico registrado nas células de cada idade, durante perfusão com *NT*, foi utilizado como forma de onda estimulatória em experimentos subsequentes (*action potential clamp*, APC), durante os quais estimou-se o influxo de *Ca²⁺* através de *I_{Ca,L}*.

Tabela 4.2 Características dos PAs controles (painel superior) e durante inibição da *I_{Ca,L}* por 100 μM *Cd²⁺* (painel inferior) em miócitos ventriculares de ratos dos diversos grupos etários. *E_{día}* é o potencial diastólico de membrana; a *amplitude* foi considerada como a diferença entre o pico do PA e *E_{día}*; *dV/dt* é a taxa de despolarização da membrana, estimada por regressão linear entre valores de *E_m* de -50 a 0 mV; *APD₇₅* é a duração do PA até 75% da repolarização. Valores são médias \pm EPM. *n* indica o número de experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, com relação ao grupo adulto; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, com relação ao mesmo grupo etário na ausência de *Cd²⁺* (teste *t* para múltiplas comparações).

Controle					
Faixa etária	<i>n</i>	<i>E_{día}</i> (mV)	Amplitude do PA (mV)	<i>dV / dt</i> (mV/ms)	<i>APD₇₅</i> (ms)
0 a 3 dias	4	-67,0 \pm 1,9 *	81,2 \pm 8,3	12,4 \pm 6,1**	363,3 \pm 94,8 **
6 a 8 dias	4	-74,4 \pm 2,9	96,6 \pm 9,8	25,6 \pm 4,6**	252,6 \pm 53,9 **
15 a 21 dias	5	-83,9 \pm 2,6	123,9 \pm 9,1 *	52,8 \pm 9,3	100,7 \pm 22,2 **
Adulto	7	-81,7 \pm 3,3	98,5 \pm 4,6	64,7 \pm 11,9	36,3 \pm 3,9

<i>Cd²⁺</i>					
Faixa etária	<i>n</i>	<i>E_{día}</i> (mV)	Amplitude do PA (mV)	<i>dV / dt</i> (mV/ms)	<i>APD₇₅</i> (ms)
0 a 3 dias	3	-28,8 \pm 1,8** ##	8,1 \pm 0,1** ##	-	-
6 a 8 dias	2	-54,2 \pm 29,9** #	4,9 \pm 1,8** ##	-	-
15 a 21 dias	5	-83,9 \pm 2,6	120,5 \pm 8,2	86,2 \pm 16,2	40,5 \pm 10,3
Adulto	3	-88,2 \pm 6,2	99,5 \pm 4,6	57,2 \pm 26,7	28,2 \pm 1,2

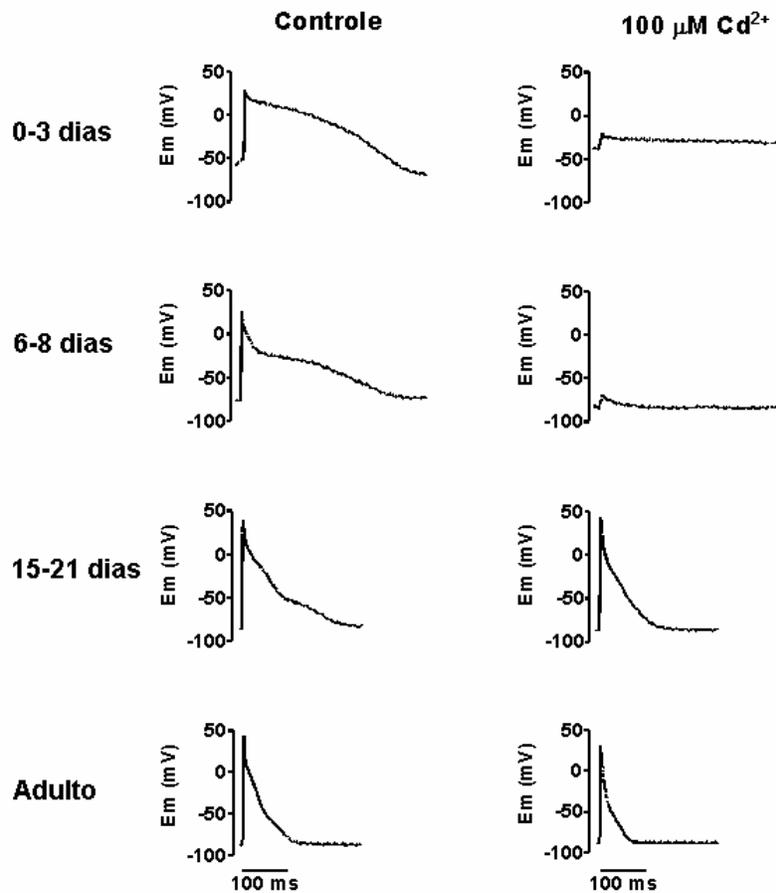


Figura 4.2 Registros de PA em células perfundidas com *NT* (controles, à esquerda) e *NT* + Cd^{2+} (à direita) nas diferentes faixas etárias. Observe que, em condição controle, a duração do PA é fortemente dependente da idade, sendo maior em células de animais mais imaturos. Na presença de *NT* + Cd^{2+} , podemos observar forte supressão da amplitude nos grupos de 0 a 3 dias e 6 a 8 dias.

Na Tabela 4.2, estão apresentadas as características dos PAs, isto é, valores de potencial diastólico de membrana (E_{dia}), amplitude do PA, taxa de despolarização durante a fase zero do PA e duração do PA até 75% da repolarização (APD_{75}), obtidos em miócitos de ratos de diferentes idades. O painel superior desta tabela refere-se aos dados em condições controle, enquanto que o inferior refere-se àqueles obtidos na presença de 100 μM $CdCl_2$, para bloqueio dos canais de Ca^{2+} do tipo L. Como podemos ver na Figura 4.6, Cd^{2+} , nesta concentração, suprimiu efetivamente a corrente de entrada evocada por pulsos despolarizantes em condições nas quais minimizou-se a contaminação com correntes de Na^+ (pelo uso de uma rampa despolarizante para -50 mV) e de K^+ (pela substituição deste íon nas soluções por Cs^+ e adição de 4-AP à solução de perfusão).

A análise de variância revelou uma interação significativa ($p= 0,001$) entre idade e tratamento com Cd^{2+} sobre E_{dia} . Como pode ser visto na Tabela 4.2, E_{dia} controle variou com a idade do animal, sendo menos negativo em células de ratos neonatos ($p< 0,05$). Esta dependência de E_{dia} da idade do animal já foi relatada por Haddock *et al.* (1998) em células cardíacas de coelho. A adição de Cd^{2+} ao perfusato não alterou E_{dia} em células de animais de 15-21 dias e adultos. Porém, causou uma marcante despolarização, da ordem de 20-40 mV ($p< 0,05$) em células de animais mais jovens.

Também se observou interação ($p< 0,001$) entre o estágio de desenvolvimento e o tratamento com Cd^{2+} com relação à amplitude do PA. Em condição controle, a variação da amplitude do PA com a idade do animal não se mostrou monotônica, como foi o caso para E_{dia} , e a comparação das médias revelou diferença significativa ($p< 0,05$) apenas entre os grupos de 15-21 dias e adulto. Cd^{2+} não afetou esta variável nos grupos de 15-21 dias e adulto, mas reduziu em mais de 90% a resposta elétrica da membrana à estimulação ($p< 0,001$), levando à supressão da geração de PAs nos grupos de 0-3 e de 6-8 dias (Figura 4.3). Este efeito foi condizente com a profunda despolarização diastólica causada pelo Cd^{2+} em miócitos de animais mais jovens e conseqüente perda de excitabilidade celular.

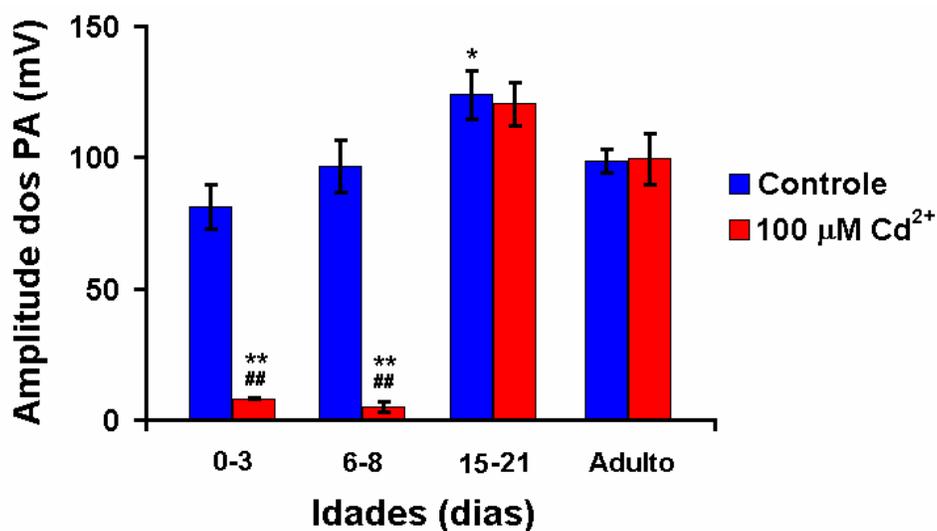


Figura 4.3 Amplitude máxima do PA em células ventriculares de ratos de diferentes idades, em condições controles e na presença de 100 µM Cd^{2+} . As barras indicam as médias e as linhas verticais indicam o EPM. * $p< 0,05$, ** $p< 0,01$ com relação ao grupo adulto na mesma condição experimental; ## $p< 0,01$ com relação ao mesmo grupo etário na ausência de Cd^{2+} .

Na análise de variância referente à taxa de despolarização durante a fase zero do PA, foi necessário assumir ausência de interação entre os fatores idade e tratamento com Cd^{2+} , pois esta variável não pôde ser obtida na presença de Cd^{2+} em células dos 2 grupos mais jovens, devido à abolição do PA. A análise de variância acusou uma influência significativa da idade ($p= 0,003$) sobre dV/dt . Em condições controles, observou-se que dV/dt sofreu um aumento gradativo com o desenvolvimento, sendo menor em células de animais de 0-3 e 6-8 dias ($p< 0,01$) do que em miócitos de adultos. O tratamento com Cd^{2+} também teve uma influência significativa ($p= 0,023$), tendendo a acelerar a despolarização, embora o teste *t post-hoc* não acusasse alteração significativa desta variável em células de ratos adultos e de 15-21 dias de idade.

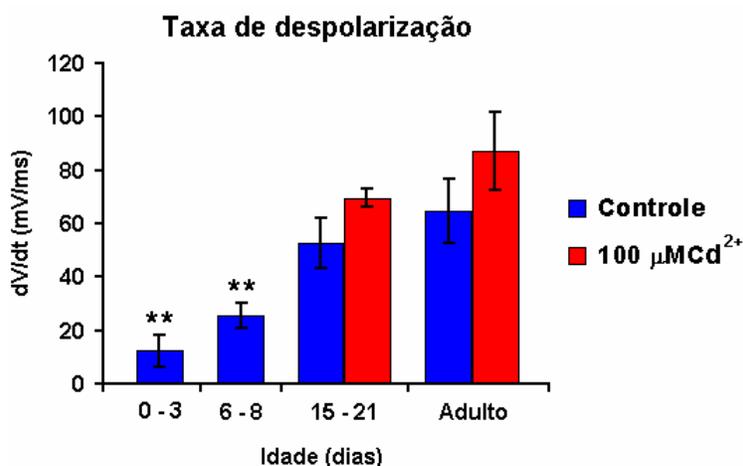


Figura 4.4 Taxa de despolarização média (dV/dt) durante a fase zero do PA em miócitos ventriculares nos diferentes grupos etários. As linhas verticais indicam o EPM. ** $p< 0,01$ com relação ao grupo adulto na mesma condição experimental.

No caso da duração do PA, avaliada pela APD_{75} , também foi necessário assumir ausência de interação significativa entre idade e tratamento com Cd^{2+} . Foi detectada uma influência significativa ($p< 0,001$) da idade sobre esta variável, com progressivo encurtamento do PA ao longo do desenvolvimento (Figura 4.5). Em miócitos de neonatos e do grupo 6-8 dias, o PA controle foi cerca de 10 e 7 vezes mais longo do que em adultos, respectivamente ($p< 0,001$). O bloqueio de canais de Ca^{2+} do tipo L não afetou significativamente APD_{75} em células dos grupos 15-21 dias e adulto, embora no primeiro, Cd^{2+} tenha reduzido APD_{75} em 60%, e apenas ~20% no segundo. Na presença de Cd^{2+} , no

entanto, foi abolida a diferença significativa entre os valores de APD_{75} ($p < 0,001$) observada em condições controles entre os grupos 15-21 dias e adulto. A diminuição na duração do PA durante o desenvolvimento pós-natal já havia sido descrita em preparações multicelulares de coração de rato (Langer *et al.*, 1975, Fermini & Schanne, 1991) e em miócitos ventriculares de (Fermini & Schanne, 1991).

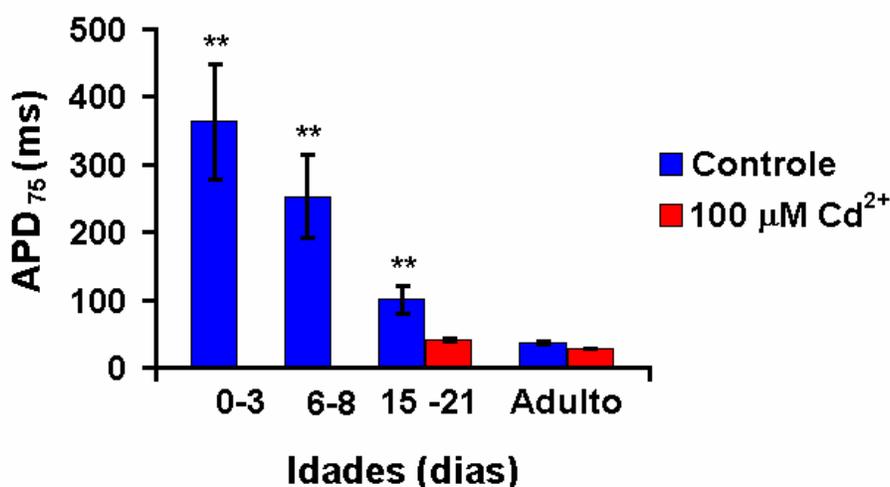


Figura 4.5 Valores médios da duração do PA até 75% da repolarização (APD_{75}), obtidos nos diferentes grupos etários, em condições controles e na presença de Cd^{2+} . As linhas verticais indicam o EPM. ** $p < 0,01$ com relação ao grupo adulto na mesma condição experimental.

4.3. CORRENTES DE Ca^{2+}

4.3.1. Curva I-V

Como já descrito anteriormente, após a eliminação da contaminação da corrente de Ca^{2+} por outras correntes iônicas (por exemplo, I_{Na} e I_K), a confirmação do Ca^{2+} como carreador das correntes registradas foi obtida pela inclusão de um bloqueador de canal de Ca^{2+} tipo L (Delbridge *et al.*, 1996; Vornanen, 1996; Puglisi *et al.*, 1999). A Figura 4.6A ilustra registros de corrente em resposta a degraus de tensão, obtidos em miócito ventricular de rato adulto, nos quais a amplitude da corrente de membrana (I_m) dependeu do valor-teste de tensão aplicado durante o degrau. Após a inclusão do Cd^{2+} , o protocolo de estimulação foi repetido, e observamos (Figura 4.6B) que as correntes de entrada em resposta aos

estímulos foram bastante reduzidas. Na Figura 4.6C, estão apresentados os traçados da corrente sensível a Cd^{2+} (a qual denominamos $I_{\text{Ca,L}}$), isto é, resultantes da subtração das correntes da Figura 4.6A e 4.6B. As curvas I-V referentes à amplitude máxima das correntes em A, B e C estão apresentadas na figura 4.6D, após normalização por C_m . Observe que, no conjunto de 5 miócitos de ratos adultos, a amplitude das correntes sensíveis a Cd^{2+} ($I_{\text{Ca,L}}$) foi ligeiramente, mas significativamente ($p < 0,001$), menor do que a de I_m (referida como controle). Isto se deve à provável existência de correntes contaminantes residuais na ausência de Cd^{2+} , mesmo na presença de bloqueadores de correntes de K^+ e partindo-se de um E_m no qual espera-se alto grau de inativação de I_{Na} .

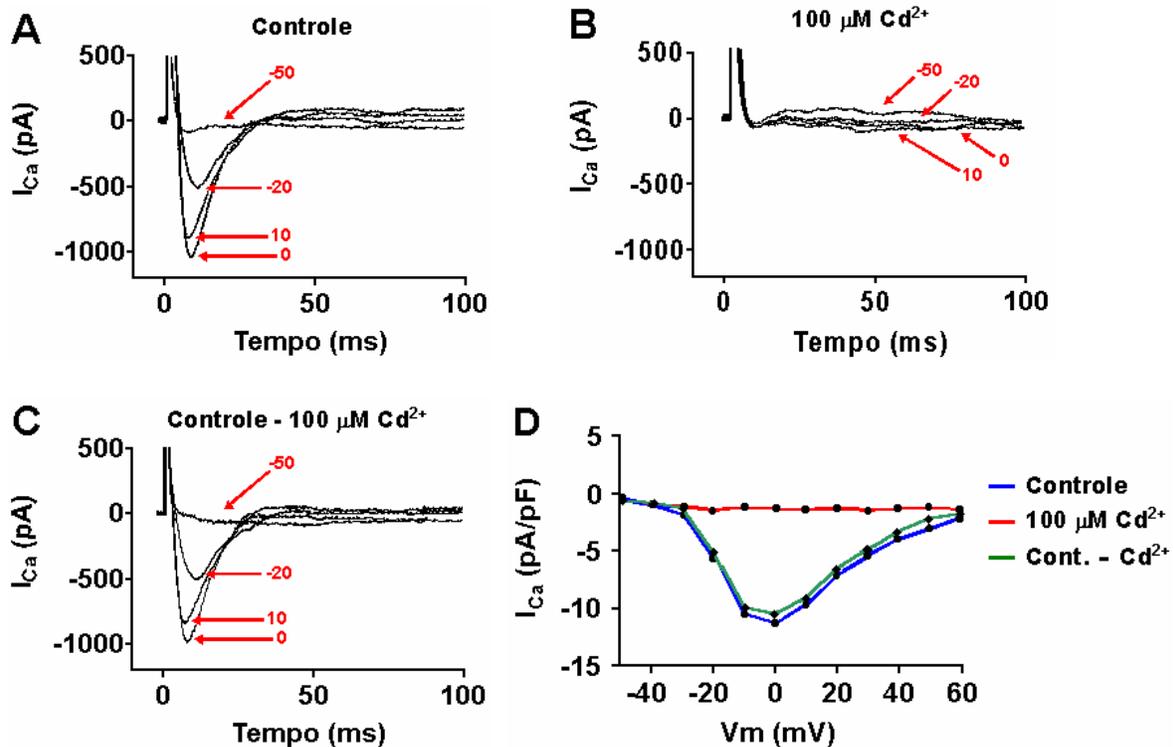


Figura 4.6 Correntes registradas em condições controles (A) e na presença de $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} (B, Cd^{2+}) em miócito ventricular de rato adulto. Em C, estão apresentadas as correntes sensíveis a Cd^{2+} , isto é, resultantes da subtração das correntes em A e B. Em D, ilustra-se as curvas corrente-tensão referentes aos traçados em A, B e C, nas quais a resposta é expressa como densidade de corrente (i.e., após normalização pela C_m). Os números em vermelho em A, B e C indicam os respectivos valores de tensão dos pulsos-testes.

A Tabela 4.3 mostra os valores de amplitude de pico da corrente (a 0 mV) e respectiva densidade de corrente (normalizada por C_m) da corrente de membrana (i.e., I_m) e da corrente sensível a Cd^{2+} (i.e., $I_{Ca,L}$) nos vários grupos etários.

Tabela 4.3. Amplitudes de pico de correntes registradas a um pulso-teste de 0 mV (pico da curva I-V) em miócitos ventriculares isolados de ratos de diversas idades. Estão apresentados os valores de corrente de membrana (I_m) e da corrente resultante depois que foi subtraída de I_m a corrente registrada na presença de 100 μM Cd^{2+} (corrente sensível a Cd^{2+} ou $I_{Ca,L}$). Esta última está apresentada também após normalização por C_m . Valores são médias \pm EPM. Os números entre parênteses referem-se ao número de células estudadas. ** $p < 0,01$ com relação ao grupo adulto.

<i>Amplitude de Correntes Registradas a 0 mV</i>			
Faixa Etária (n)	I_m (pA)	$I_{Ca,L}$ (pA)	$I_{Ca,L}$ (pA/pF)
0-3 dias (6)	312 \pm 24**	297 \pm 23**	10,97 \pm 0,93
6-8 dias (7)	425 \pm 15**	390 \pm 16**	12,15 \pm 0,54
15-21 dias (5)	524 \pm 31**	473 \pm 27**	11,20 \pm 0,46
adulto (5)	1030 \pm 20	978 \pm 14	10,88 \pm 0,93

A análise de variância bifatorial revelou que a corrente de entrada a zero mV (em pA) sofreu aumento considerável com o amadurecimento do animal ($p < 0,0001$), e que, no conjunto de idades, a corrente sensível a Cd^{2+} foi menor do que aquela na ausência deste bloqueador ($p = 0,016$). Esta última observação indica a presença de correntes contaminantes em todas as idades e evidencia a importância do isolamento de $I_{Ca,L}$ com Cd^{2+} . O teste *post-hoc* indicou que os valores tanto de I_m quanto de $I_{Ca,L}$ foram significativamente menores ($p < 0,001$) em células de animais imaturos do que em de adultos (Figura 4.7A). No entanto, quando $I_{Ca,L}$ foi normalizada pela área da membrana da célula (pA/pF), os valores de pico não foram estatisticamente diferentes entre as idades (Figura 4.7B), o que sugere que a menor amplitude da corrente em células de animais jovens seja devida à sua menor área de membrana.

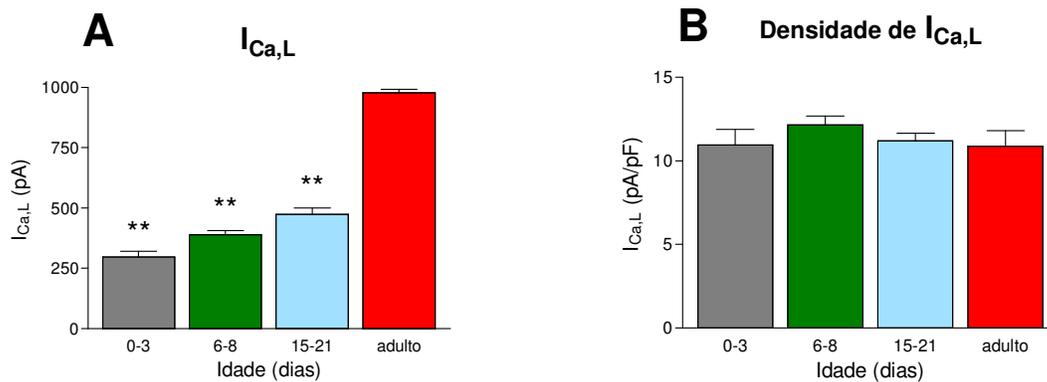


Figura 4.7 Valores de amplitude de pico (A) e densidade de $I_{Ca,L}$ (B) evocada em miócitos ventriculares de ratos de diferentes idades por um degrau de despolarização para zero mV. Barras indicam médias e linhas verticais indicam EPM. ** $p < 0,001$ com relação ao grupo adulto.

Para melhor entendimento da influência do desenvolvimento sobre a relação I-V de $I_{Ca,L}$ em miócitos ventriculares, obtivemos e comparamos a curva I-V completa em miócitos de animais neonatos (0-3 dias de idade) e adultos. A Figura 4.8 mostra traçados originais de $I_{Ca,L}$ (painéis A e B) e a curva I-V de $I_{Ca,L}$ após normalização por C_m (painel C), em ambas as idades. Em células de neonatos, a amplitude de $I_{Ca,L}$ foi consideravelmente menor do que em miócitos adultos em todas as tensões-testes estudadas (compare Figuras 4.8A e B). Este dado também foi relatado por Vornanen (1996) em células ventriculares de rato. No entanto, a densidade de pico de $I_{Ca,L}$ foi semelhante em células de neonatos e adultos (Figura 4.7B, Figura 4.8C). Esta semelhança da densidade da $I_{Ca,L}$ nestas duas idades está de acordo com os dados obtidos por outros autores (Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1998).

Analisando a relação entre a densidade de $I_{Ca,L}$ e a tensão estimulatória, pode-se observar que tanto em neonatos, quanto em adultos, há influência significativa da tensão ($p < 0,0001$) sobre a corrente. Ambas as curvas apresentaram forma de sino invertido, com pico de amplitude a zero mV (o que também ocorreu nos demais grupos etários, embora a relação I-V completa não tenha sido determinada), o que está de acordo com as características desta corrente, amplamente descritas em miócitos ventriculares de mamíferos (Masuda, & Sperelakis, 1993; Gomez *et al.*, 1994; Vornanen, 1996; Yuan *et al.*,

1996; Katsube *et al.*, 1998; Pignier & Potreau, 2000). No entanto, a idade foi um fator estatisticamente significativo na determinação da relação I-V ($p= 0,003$), e isto se manifestou na fase inicial da curva. A densidade de $I_{Ca,L}$ foi significativamente maior ($p < 0,05$) em células de neonatos nas tensões de -30 e -20 mV ($-4,00 \pm 1,01$ e $-6,05 \pm 1,18$ pA/pF, respectivamente) do que em adultos ($-0,87 \pm 0,07$ e $-2,98$ pA/pF, respectivamente). Nas demais tensões, no entanto, não foi observada diferença dependente da idade (por exemplo, a zero mV, a densidade de $I_{Ca,L}$ foi $-10,97 \pm 0,93$ e $-10,88 \pm 0,93$ pA/pF em neonatos e adultos, respectivamente). Isto levanta a possibilidade de desvio à esquerda da curva de ativação de $I_{Ca,L}$ em miócitos de neonatos.

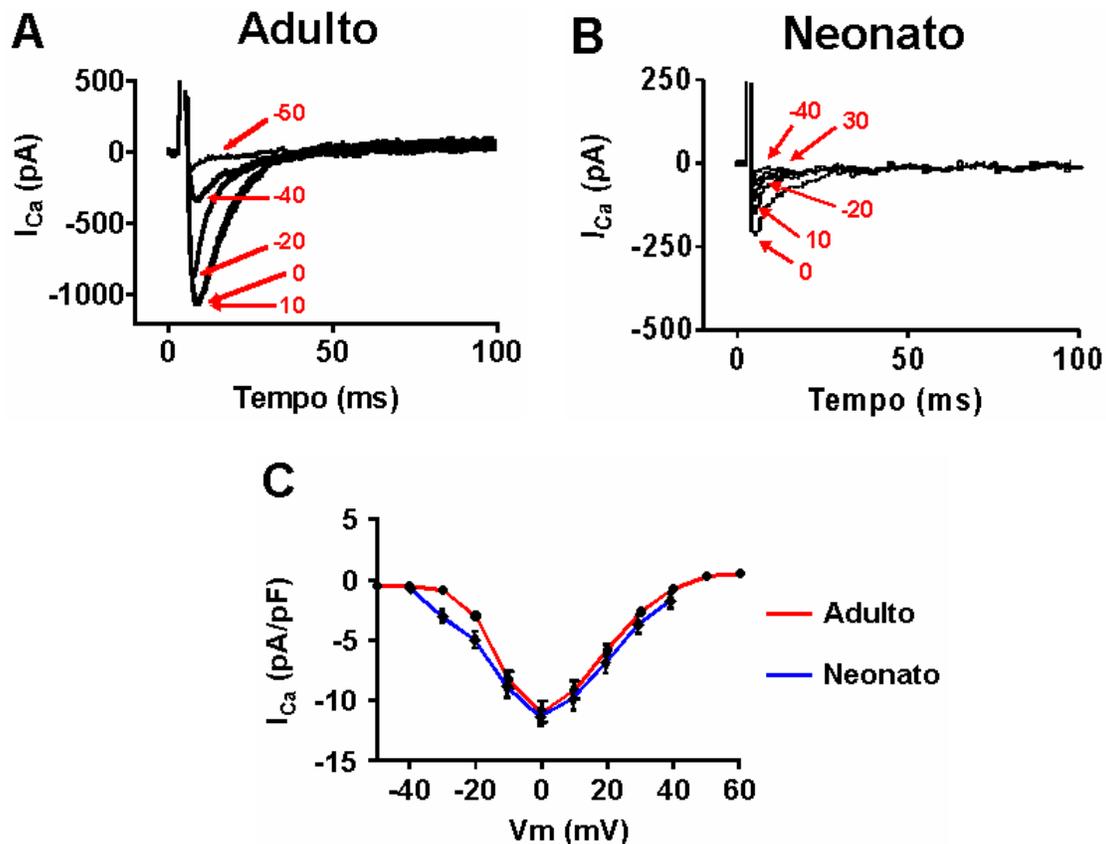


Figura 4.8 Corrente de membrana sensível a Cd^{2+} ($I_{Ca,L}$) em células ventriculares de ratos adulto (A) e neonato (B). Em C, estão apresentadas as respectivas curvas I-V, para densidade de $I_{Ca,L}$. Em A e B, os valores de tensão dos pulsos-testes estão indicados em vermelho. Em C estão apresentadas médias e EMPs ($n = 6$ e 5 para neonatos e adultos, respectivamente).

A Figura 4.9 mostra as curvas de ativação de $I_{Ca,L}$ em *steady-state* em miócitos de neonatos e adultos. Não foi observada diferença significativa entre idades quanto a E_h (tensão correspondente a 50% da ativação dos canais), embora o valor de k tenha sido próximo da significância estatística ($-17,2 \pm 1,9$ mV e $-12,5 \pm 0,1$ mV em neonatos e adultos, respectivamente, $p= 0,057$), indicando uma tendência de maior ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L em valores mais negativos de tensão em células de neonatos. Além disso, k (fator de inclinação da curva, que é maior para curvas menos inclinadas) foi significativamente maior em miócitos de neonatos ($8,05 \pm 0,99$ mV) do que em adultos ($4,19 \pm 0,01$ mV, $p= 0,0064$).

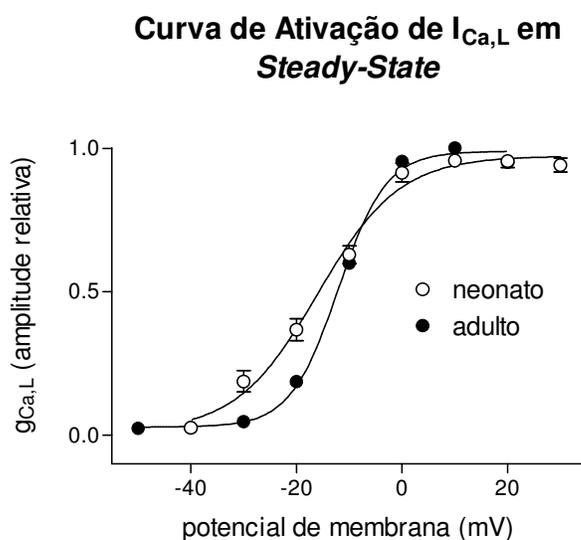


Figura 4.9 Curva de ativação de $I_{Ca,L}$ em *steady-state* em células ventriculares de ratos adultos e neonatos. Dados estão apresentados como médias e EMP.

4.3.2. Registro da corrente de Ca^{2+} com a técnica de APC

PAs típicos registrados em células ventriculares de cada grupo etário foram utilizados como pulsos estimulatórios para evocar $I_{Ca,L}$, com o objetivo de utilizar a forma de onda estimulatória fisiológica. Ressalte-se que a corrente de interesse foi aquela sensível ao bloqueio pelo Cd^{2+} .

A Figura 4.10 ilustra registros de $I_{Ca,L}$ em miócitos de ratos em cada faixa etária e as respectivas formas de onda estimulatórias (AP-S). Durante um AP-S, o pico de $I_{Ca,L}$ (normalizado pela C_m) em célula de um animal de 3 dias (mostrada na Figura 4.10A) foi muito pequeno (-1,3 pA/pF), em relação aos picos das correntes dos demais grupos etários (~ -5 pA/pF). Isto está em discordância com os resultados da Tabela 4.3 e Figura 4.7B, que mostram valores comparáveis de pico de densidade de $I_{Ca,L}$ em resposta a degraus depolarizantes em todas as idades. Infelizmente não foi possível realizar mais experimentos deste tipo em células de neonatos. O maior obstáculo encontrado foi que nosso sistema de blindagem não foi efetivo para reduzir os ruídos elétricos para um nível suficientemente baixo para permitir registro de correntes de magnitude tão pequena (observe-se que o pico da $I_{Ca,L}$ desenvolvida no AP-S foi, em média, de cerca da metade daquele em resposta a degraus de tensão para zero mV). Além disso, houve dificuldade em manter vivos miócitos de neonatos durante este tipo de experimento. Portanto, com base em dados de um único experimento, não podemos inferir se há diferenças reais de $I_{Ca,L}$ durante APC entre células de neonatos e das demais faixas etárias.

Os valores de pico de $I_{Ca,L}$ durante o AP-S nas várias idades estão apresentados na Tabela 4.4 e na Figura 4.11. Embora os valores de amplitude e de densidade de $I_{Ca,L}$ tenham sido consistentemente menores do que aqueles registrados durante degraus de tensão para zero mV (Tabela 4.3 e Figura 4.7), o padrão observado foi o mesmo: efeito significativo da idade sobre a amplitude de $I_{Ca,L}$ ($p < 0,0001$), mas não sobre a densidade de $I_{Ca,L}$ ($p = 0,092$).

Tabela 4.4 Médias \pm EPM dos valores de pico de $I_{Ca,L}$ e densidade de pico de $I_{Ca,L}$ obtidos em miócitos ventriculares de ratos de diferentes idades durante aplicação do AP-S como estímulo. n representa o número de experimentos; ** $p < 0,01$ com relação ao grupo adulto.

	6 a 8	15 a 21	Adulto
N	7	6	6
$I_{Ca,L}$ (pA)	122 \pm 13**	202 \pm 17**	692 \pm 53
$I_{Ca,L}/C_M$ (pC / pF)	3,83 \pm 0,44	4,85 \pm 0,25	6,38 \pm 1,34

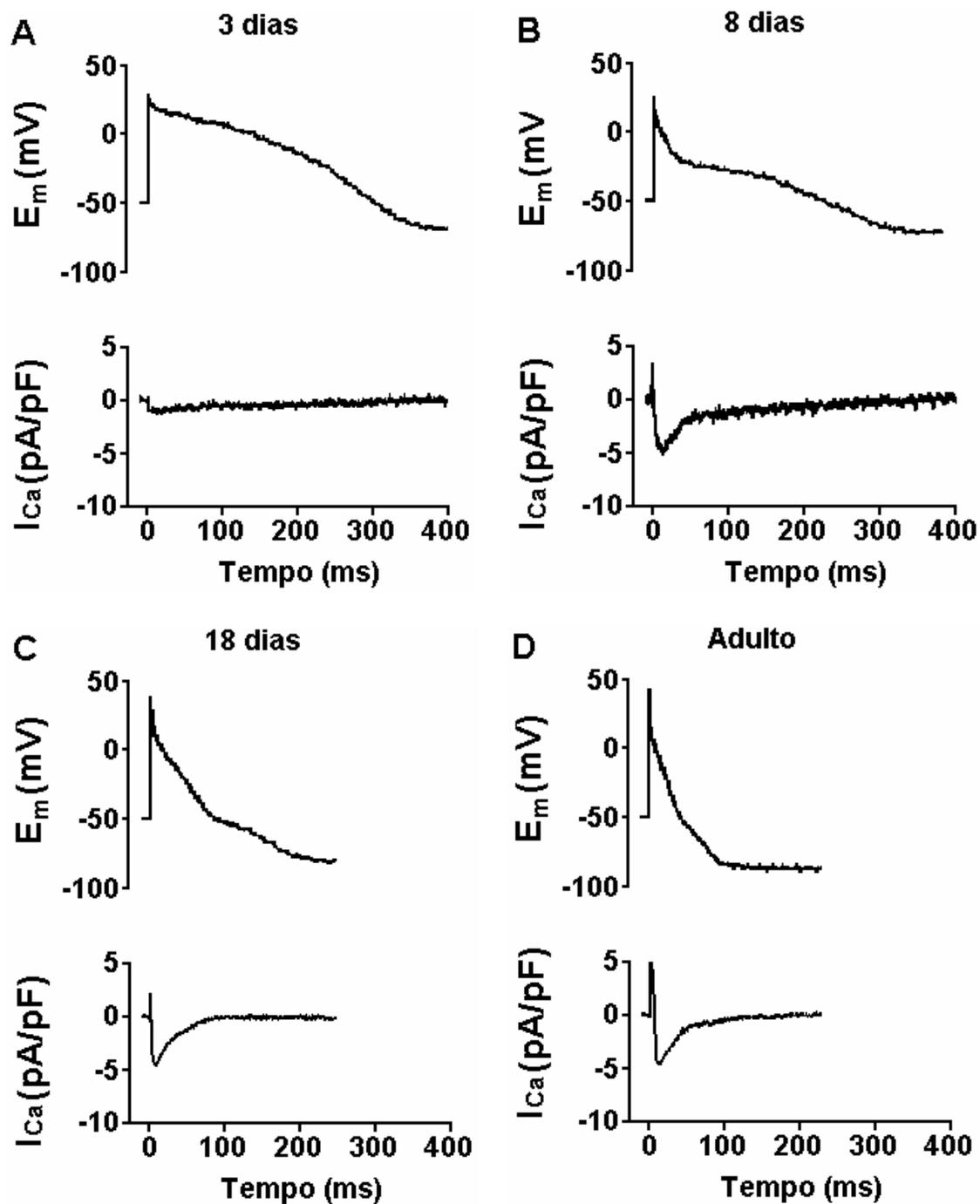


Figura 4.10 Densidade das correntes de Ca^{2+} sensíveis a Cd^{2+} (painéis inferiores) evocadas por formas de ondas estimulatórias (painéis superiores) formuladas a partir de potenciais de ação típicos registrados em miócitos ventriculares isolados de ratos de 3 (A), 8 (B) e 18 (C) dias de idade, e em adultos (D).

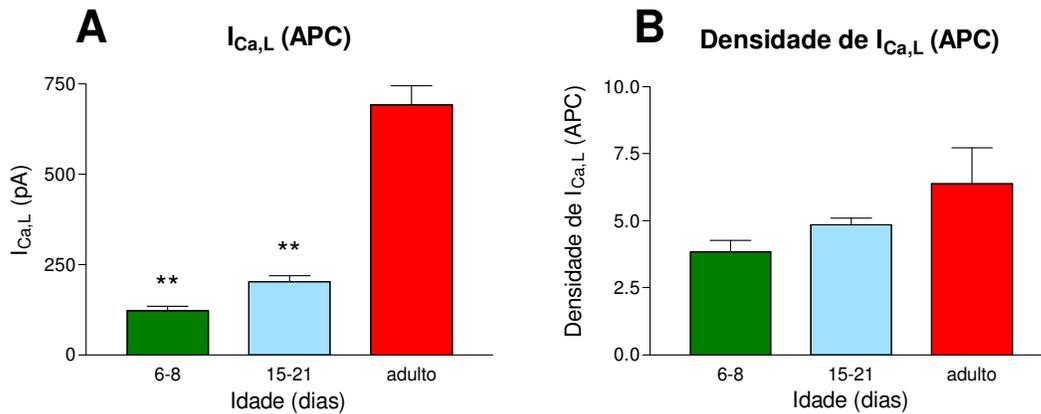


Figura 4.11 Valores (média e EPM) de pico de $I_{Ca,L}$ evocada por formas de onda estimulatórias mimetizando o PA característico de cada idade, em miócitos ventriculares de ratos de várias faixas etárias. ** $p < 0,01$ com relação ao grupo adulto.

A Figura 4.10B ilustra $I_{Ca,L}$ normalizada pela capacitância obtida num miócito de um rato de 8 dias de idade, sob APC. Como se pode observar, a densidade de pico da corrente não diferiu daquela em células de animais mais maduros. No entanto, a queda da corrente é mais lenta do que nos grupos de 15-21 dias e adulto, o que pode indicar maior influxo de Ca^{2+} pelo canal de Ca^{2+} tipo L ao longo do PA nesta idade do que em estágios subsequentes do desenvolvimento pós-natal, apesar da densidade de pico de $I_{Ca,L}$ não ser maior. Isto evidencia a importância da estimativa do influxo total de Ca^{2+} carregado por $I_{Ca,L}$ durante o estímulo.

4.3.3. Influxo de carga através dos canais de Ca^{2+} tipo L

Como descrito anteriormente, procedeu-se à integração da $I_{Ca,L}$ no tempo para estimar a carga carregada pelo Ca^{2+} que entra na célula através do canal de Ca^{2+} tipo L, durante o AP-S. Os fluxos integrados foram definidos como a quantidade de carga que entra na célula (dada em pC), e podem ser normalizados pela capacitância específica da respectiva célula. Na Figura 4.12 e Tabela 4.5 estão apresentados os valores da integral de $I_{Ca,L}$ em três grupos etários, como valores totais e valores normalizados pela respectiva C_m .

Tabela 4.5 Integral de $I_{Ca,L}$ medida durante experimentos de APC. Estão apresentados valores de carga total transportada (pC) e de carga normalizada pela capacitância de membrana ($\int I_{Ca} / C_m$) via $I_{Ca,L}$ durante um AP-S. ** $p < 0,001$ com relação ao grupo adulto; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ com relação ao grupo 15-21 dias.

	6 a 8	15 a 21	Adulto
N	7	6	6
$\int I_{Ca}$ (pC)	$11,0 \pm 0,6^{**\#}$	$6,1 \pm 0,3^{**}$	$18,3 \pm 2,5$
$\int I_{Ca}/C_m$ (pC / pF)	$0,343 \pm 0,023^{**\#\#}$	$0,146 \pm 0,002$	$0,160 \pm 0,023$

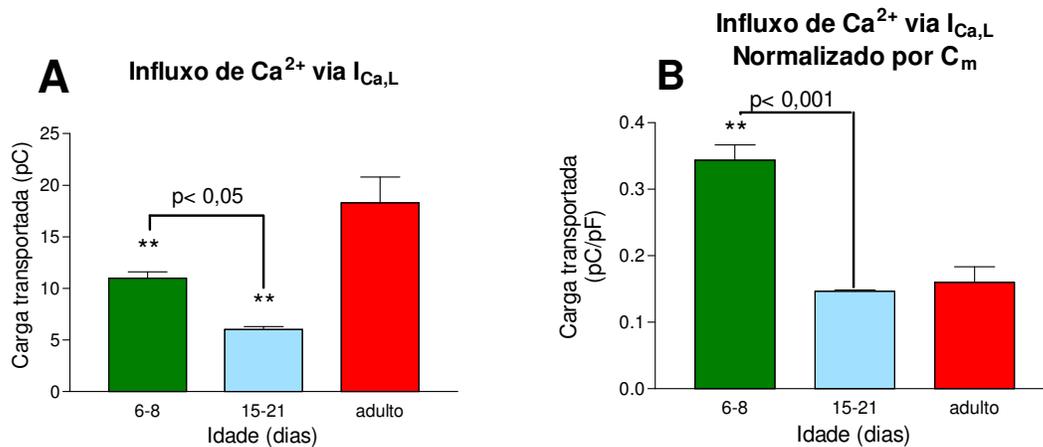


Figura 4.12 Integral de $I_{Ca,L}$ durante um AP-S, apresentada tanto em valor absoluto (A), quanto após normalização pela respectiva C_m (B). ** $p < 0,001$ com relação ao grupo adulto. Diferenças significativas entre grupos de animais imaturos estão indicadas na figura.

Podemos observar que o influxo total de carga via $I_{Ca,L}$ (pC) dependeu significativamente da idade do animal ($p < 0,0001$), mas esta variação não foi monotônica. Embora o influxo fosse menor em células dos dois grupos imaturos do que em de adultos ($p < 0,001$), ele foi maior em animais mais jovens, de 6 a 8 dias, do que em animais de 15 a 21 dias ($p < 0,05$). Isto possivelmente deveu-se ao curso temporal mais lento de queda de $I_{Ca,L}$ no grupo mais jovem, como aparente na Figura 4.10, que teria sido capaz de resultar num influxo maior, apesar do valor relativamente baixo do pico de $I_{Ca,L}$ (Figura 4.11A).

Quando a integral de $I_{Ca,L}$ foi normalizada pela área de membrana (pC/pF), observamos a existência de uma significativa influência da idade ($p < 0,001$), o que não

havia sido observado com os valores de pico de densidade de $I_{Ca,L}$ durante degraus estimulatórios ou AP-S (Figuras 4.7B e 4.11B). Isto mostra o risco de erro em inferências sobre o influxo baseadas apenas na amplitude da corrente. Após a normalização do influxo, observamos que a carga total carregada pelo íon (após normalização por C_m) foi mais do dobro em células de ratos de 6-8 dias de idade ($p < 0,001$) do que aquela em animais de 15-21 dias e adultos. Ressalte-se ainda que a densidade do influxo nestes 2 últimos grupos etários foi comparável.

4.4. ESTIMATIVA DO VOLUME CELULAR (V_C) DE MIÓCITOS CARDÍACOS

Como já descrito, os valores de V_C de miócitos ventriculares de diferentes grupos etários foram calculados por diferentes métodos:

A – razão superfície/volume a partir de dados de microscopia eletrônica obtidos por Olivetti *et al.* (1980): usado apenas para o grupo 6-8 dias.

B – aproximação pelo volume de um tubo de secção transversa elíptica (Vornanen, 1996): usado para todos os grupos etários;

C - relação entre dimensões transversal e longitudinal e volume (Satoh *et al.*, 1996): usado para todos os grupos;

D - relação direta entre C_m e volume (Satoh *et al.*, 1996): usado apenas para o grupo adulto.

Foram medidas, com o auxílio de um micrômetro ocular, as dimensões longitudinal e transversal (comprimento e largura, respectivamente) das células, pois a primeira é utilizada para o cálculo de V_C pelo método B, e ambas são usadas para o cálculo de V_C pelo método C. Estes valores encontram-se na Tabela 4.6 e estão ilustrados na Figura 4.13.

Tabela 4.6 Médias \pm EPM do comprimento e largura de miócitos ventriculares isolados de ratos de diferentes idades. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ com relação ao grupo adulto; # $p < 0,05$ com relação ao grupo 15-21 dias.

	6 a 8	15 a 21	Adulto
N	7	6	6
Comprimento (μm)	$57,4 \pm 1,2^{**}$	$69,3 \pm 1,1^{**}$	$125,0 \pm 9,2$
Largura (μm)	$18,9 \pm 0,5^{**\#}$	$26,0 \pm 0,6^*$	$33,3 \pm 3,6$

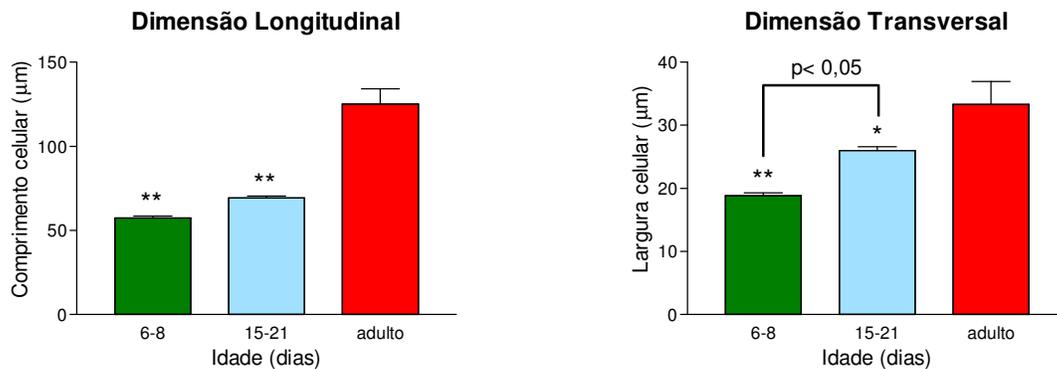


Figura 4.13 Valores médios e EPM do comprimento (A) e largura (B) de miócitos ventriculares de ratos de diversas idades, medidos por microscopia óptica. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ com relação ao grupo adulto. Diferenças significativas entre grupos de animais imaturos estão indicadas na figura.

A análise de variância indicou um aumento significativo de ambas as dimensões celulares com o amadurecimento ($p < 0,001$). Nos grupos imaturos, ambas as dimensões foram estatisticamente diferentes daquelas de adultos ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ para grupos 6-8 dias e 15-21 dias, respectivamente). No caso da dimensão transversal, foi possível detectar também um aumento significativo de 6-8 para 15-21 dias de idade ($p < 0,05$). Portanto, a partir destes resultados, poderíamos esperar que V_C devesse também sofrer importante variação ontogenética.

Para avaliar a influência da idade do animal sobre V_C , comparou-se valores obtidos com o método B, que pôde ser aplicado a todos os grupos etários. Como esperado e já relatado em outros estudos nos quais esta variável foi medida ou estimada indiretamente (Olivetti *et al.*, 1980; Vornanen, 1996), observamos marcante aumento de V_C com o amadurecimento ($p < 0,0001$). Além disso, detectamos diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores estimados nos grupos imaturos com relação ao grupo adulto (vide Tabela 4.7 e Figura 4.14).

Para comparar os diferentes métodos usados para estimar V_C , utilizou-se análise de variância para dados pareados. No grupo de 6-8 dias, o valor de V_C dependeu do método ($p < 0,0001$), sendo mais alto com o método C ($p < 0,001$) e comparável com os métodos A e B. No grupo de 15-21 dias, apesar da diferença ter sido de apenas cerca de 10%, os valores de V_C determinados pelo método C foram significativamente maiores do que com o

método B ($p < 0,0031$). No grupo adulto, os valores de V_C também dependeram do método usado ($p < 0,036$); no entanto, os métodos B e C levaram a valores de V_C comparáveis, enquanto que o método D produziu valores significativamente menores do que esses ($p < 0,05$).

Tabela 4.7 Volume celular (média \pm EPM) de miócitos ventriculares de ratos de diferentes idades, calculado por diferentes métodos. **A:** a partir da relação superfície/volume calculada de dados obtidos por microscopia eletrônica (Olivetti *et al.*, 1980); **B:** assumindo a forma da célula como um tubo de secção transversa elíptica (Vornanen, 1996); **C:** a partir da relação entre volume e dimensões de uma face da célula (Satoh *et al.*, 1996); e **D:** a partir da relação entre o volume e a capacitância total da membrana (Satoh *et al.*, 1996). Estão também indicadas, para cada método, as equações usadas, que foram explicitadas no Capítulo 3 deste trabalho. A omissão dos valores em certos campos indica a impossibilidade ou pouca adequação do método em questão para o cálculo do volume celular num dado grupo etário. ** $p < 0,01$ com relação ao valor do grupo adulto determinado pelo mesmo método. ♦♦ $p < 0,01$ com relação ao valor obtido na mesma idade com o método A; ## $p < 0,01$ com relação ao valor obtido na mesma idade pelo método B. ⊗ $p < 0,05$ com relação ao valor obtido na mesma idade pelos métodos C e D.

Volume celular (pL)					
Grupo etário	N	A (eq. 3.6)	B (eq.3.8)	C (eq. 3.4)	D (eq. 3.3)
6-8 dias	7	5,89 \pm 0,14	5,38 \pm 0,34**	8,23 \pm 0,34♦♦##	-----
15-21 dias	6	-----	12,26 \pm 0,37**	13,66 \pm 0,14##	-----
Adulto	6	-----	36,05 \pm 6,06	30,68 \pm 1,82	21,41 \pm 1,40⊗

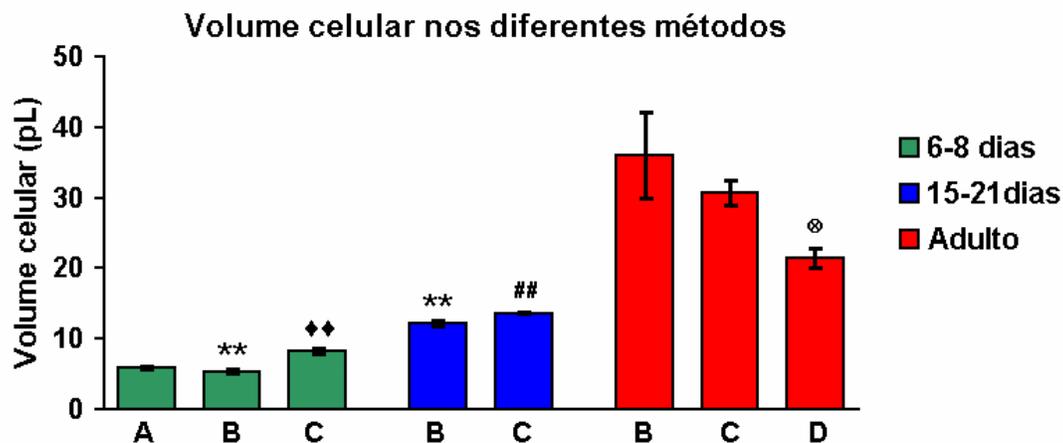


Figura 4.14 Volume celular de miócitos ventriculares de ratos em diferentes faixas etárias, calculados por diferentes métodos. Vide legenda da Tabela 4.7 para detalhes e símbolos.

4.5. INCREMENTO NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+} DEVIDO AO INFLUXO DE Ca^{2+} VIA $I_{Ca,L}$ DURANTE UM PA

4.5.1. Incremento da concentração citosólica total de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) devido a influxo de Ca^{2+} através dos canais do tipo L

Como explicado no Capítulo 3, a conversão da carga total transportada por $I_{Ca,L}$ para moles de Ca^{2+} , seguida de correções para a fração do volume citosólico acessível, e posterior “dissolução” deste influxo integrado do íon no volume celular acessível (calculado para cada respectiva célula), nos permitem estimar o incremento da concentração total de Ca^{2+} no citosol ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) causada pelo influxo. Como V_C foi estimado por diferentes métodos, chegamos também a diferentes valores de $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$, que estão apresentados a seguir na Tabela 4.8 e Figura 4.15.

Tabela 4.8 Incremento das concentrações total ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) e livre ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) de Ca^{2+} no citosol de miócitos ventriculares, resultante do influxo do íon por $I_{Ca,L}$ durante uma forma de onda estimulatória mimetizando o potencial de ação típico de cada faixa etária. Os valores apresentados são médias \pm EPM. **n** indica o número de células estudadas. Nos cálculos foram utilizados os valores de influxo de Ca^{2+} e volume celulares apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.7, respectivamente, tendo sido os últimos calculados por diferentes métodos, que estão indicados nesta tabela (**A**: Olivetti *et al.*, 1980; **B**: Vornanen, 1996; **C**: Satoh *et al.*, 1996). ** $p < 0,01$ com relação ao valor do grupo adulto determinado pelo mesmo método; ## $p < 0,01$ com relação ao valor obtido na mesma idade pelo método B.

		Faixa etária (dias)		
		6 a 8	15 a 21	Adulto
N		7	6	6
$\Delta[Ca]_{tot}$ (μ M)	Método A	13,90 \pm 0,93	-----	-----
	Método B	15,59 \pm 1,47**	3,98 \pm 0,25	4,64 \pm 0,92
	Método C	-----	3,55 \pm 0,18##	4,97 \pm 0,86
$\Delta[Ca]_i$ (nM)	Método A	102,7 \pm 7,7	-----	-----
	Método B	117,6 \pm 12,5**	18,0 \pm 1,2	17,2 \pm 3,5
	Método C	-----	16,0 \pm 0,8##	18,5 \pm 3,3

No entanto, vale a pena tecer considerações sobre a aplicabilidade dos diversos métodos para cálculo de V_c em cada idade, pois nem todos foram usados para estimar os valores descritos a seguir. No grupo de 6-8 dias, observamos que o método B, mas não o método C, forneceu valores semelhantes ao método A. Consideramos que o método mais confiável seja o A, pois parte de medições estereológicas de área de superfície e volume celular feitas em secções de miocárdio ventricular de rato (Olivetti *et al.*, 1980). Infelizmente, estes dados não foram descritos para animais mais velhos. Devido à discrepância entre os valores de A e C, consideramos que este último tenha sido pouco adequado para estimar V_C neste grupo etário, e portanto o excluímos dos cálculos a seguir. Uma das razões desta discrepância pode ser a geometria da célula: nesta idade, os miócitos tendem a ser mais fusiformes do que apresentar a forma de um paralelepípedo típica da célula adulta (vide Gomes *et al.*, 2001), para a qual a relação do método C foi desenvolvida (Satoh *et al.*, 1996). Já no grupo adulto, os métodos B e C (que, embora usando diferentes modelos geométricos para a célula, são, em essência, semelhantes) produziram estimativas comparáveis, mas aquelas pelo método D foram claramente discrepantes. Neste último método utiliza-se uma relação linear entre C_m e V_C , que, embora tenha sido determinada a partir de medições diretas (por técnicas eletrofisiológicas e microscopia confocal de rastreamento, respectivamente) em miócitos ventriculares adultos de ratos de diferentes idades, apresenta origem consideravelmente diferente de zero (Satoh *et al.*, 1996). Isto compromete a confiabilidade deste método, e por esta razão, valores de V_C obtidos pelo método D foram descartados para cálculos posteriores.

Comparando os valores estimados do $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ pelos diferentes métodos, observamos que não houve diferença significativa no grupo de 6 a 8 dias entre os métodos A e B ($P = 0,142$) e no grupo adulto entre os métodos B e C ($P = 0,301$), como demonstrado por teste t para amostras pareadas. Observou-se diferença significativa entre os valores de $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ obtidos com os métodos B e C no grupo 15-21 dias ($p = 0,0068$), embora a diferença entre as médias não tenha sido superior a 11%. Ao compararmos entre os grupos os valores do $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ calculado com valores de V_C obtidos pelo método B, observamos que o incremento de $[Ca^{2+}]_{tot}$ causado pelo influxo de Ca^{2+} via I_{Ca-L} dependeu fortemente da idade ($p < 0,0001$), e foi, no grupo de 6-8 dias, mais de 3 vezes maior do que nos grupos de 15-21 dias e adulto ($p < 0,01$), não tendo sido observada diferença estatisticamente

significativa entre este 2 últimos grupos. Os dados na Tabela 4.5 mostram que a integral de $I_{Ca,L}$ nos grupos imaturos foi menor que em adultos. O maior incremento em $[Ca^{2+}]_{tot}$ aos 6-8 dias e semelhante incremento aos 15-21 dias, com relação a adultos, parece ter sido, portanto, devido aos menores volumes de mistura do Ca^{2+} (V_C) em miócitos de animais em desenvolvimento.

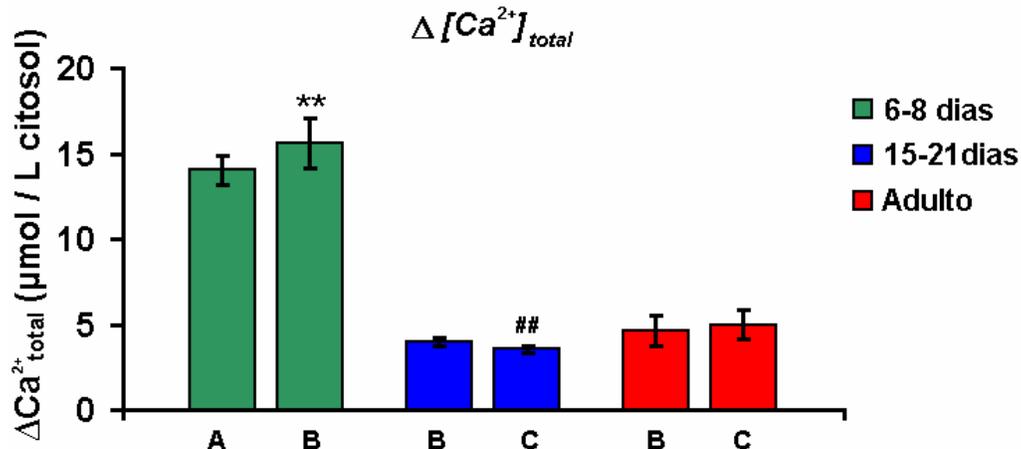


Figura 4.15 Médias e EPM do incremento da concentração total citosólica de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) em miócitos ventriculares de rato, calculados a partir de diferentes métodos de estimativa do V_C (vide Tabela 4.7). ** $p < 0,01$ com relação ao valor do grupo adulto determinado pelo mesmo método; ## $p < 0,01$ com relação ao valor obtido na mesma idade pelo método B.

4.5.2. Impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$ sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($\Delta[Ca]_i$)

Espera-se que $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ cause aumento da $[Ca^{2+}]_i$, a qual, em valores adequados, pode disparar processos como a liberação de Ca^{2+} do RS e a contração celular. Para estimar-se $\Delta[Ca^{2+}]_i$, são levados em conta $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ e as características dos *buffers* passivos de Ca^{2+} , assumindo-se que todo o íon que tem acesso ao citosol através de $I_{Ca,L}$ é homogeneamente distribuído e não é transportado para fora deste compartimento. Os valores de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nos diferentes grupos etários estão apresentados na Tabela 4.8 e ilustrados na Figura 4.16.

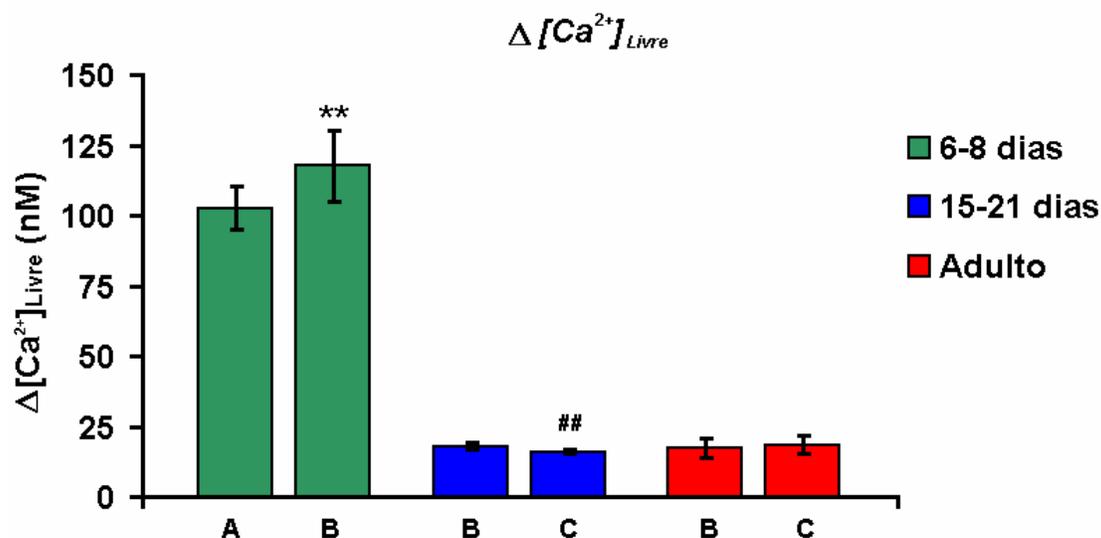


Figura 4.16 Variação da concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($\Delta[\text{Ca}]_i$) resultante do influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ durante uma forma de onda estimulatória simulando o potencial de ação. Estão apresentados médias e EPM de valores calculados a partir de estimativas de volume celular por diferentes métodos, como descrito na Figura 4.15 (vide texto): **A**: Olivetti *et al.*, 1980; **B**: Vornanen, 1996; **C**: Satoh *et al.*, 1996. ** $p < 0,01$ com relação ao valor do grupo adulto determinado pelo mesmo método; ## $p < 0,01$ com relação ao valor obtido na mesma idade pelo método B.

Do mesmo modo que para $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$, não foi observada diferença significativa em $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ usando os métodos A e B para calcular V_C no grupo de 6-8 dias ($p = 0,137$), e os métodos B e C no grupo adulto ($p = 0,302$), embora tenha sido observada diferença devida ao método no grupo de 15-21 dias ($p = 0,0073$). No entanto, independentemente do método utilizado, é clara a influência da idade sobre $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Analisando os valores obtidos com o método B, esta influência foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), tendo sido $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ cerca de 5 vezes maior no grupo de 6-8 dias do que em adultos ($p < 0,001$). Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os grupos de 15-21 dias e adulto.

CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos em miócitos ventriculares de ratos durante o desenvolvimento pós-natal: *a)* a medição da capacitância de membrana; *b)* o registro de PAs; *c)* o registro de $I_{Ca,L}$ evocada por pulsos-testes quadrados ou com a forma do PA da respectiva idade; *d)* a estimativa do influxo de carga através dos canais de Ca^{2+} tipo L; *e)* a estimativa do volume celular; *f)* a estimativa do incremento na concentração intracelular total de Ca^{2+} ; *g)* a estimativa do impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$ sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} livre.

5.1. CAPACITÂNCIA DE MEMBRANA

Observou-se que o valor de C_m é dependente do estágio de desenvolvimento do animal (ver Figura 4.1), como já relatado na literatura (Masuda & Sperelakis, 1993; Gomez *et al.*, 1994; Vornanen, 1996; Satoh *et al.*, 1996; Katsube *et al.*, 1998; Pignier & Potreau, 2000). No entanto, neste trabalho, o valor de C_m em células de ratos de zero a 3 semanas de idade não apresentou diferença significativa, o que diverge com os dados da literatura (Gomez *et al.*, 1994; Vornanen, 1996; Pignier & Potreau., 2000). Após isolamento de miócitos ventriculares de ratos durante as primeiras semanas de vida, encontram-se células de vários tamanhos e formas (Gomes *et al.*, 2001). Como não foi possível estabelecer um giga-selo em células esferóides, de menor tamanho (talvez por causa de dobras na membrana devidas a deformação mecânica durante o isolamento), foi necessário utilizar as células maiores, mais alongadas. Portanto, acreditamos que esta tenha sido a razão da ausência de variação significativa de C_m ao longo das 3 primeiras semanas de vida pós-natal.

5.2. POTENCIAIS DE AÇÃO

PAs foram registrados em células de cada grupo etário e, posteriormente, o registro típico de cada grupo foi utilizado como forma de onda estimulatória. Na condição controle, observamos que E_{dia} variou com a idade do animal (ver Figura 4.2 e Tabela 4.2), sendo

menos negativo em células de ratos neonatos e atingindo valores adultos (-80 a -90 mV) já na segunda semana de vida.

Fermini & Schanne (1991) registraram PAs em miócitos e músculo ventricular de ratos de 2 dias de idade e encontraram valores médios de E_{dia} (-66 mV e -67,6 mV, respectivamente) semelhantes ao obtido em nosso trabalho (-67 ± 1,9 mV). O mesmo (E_{dia} de -67 mV) foi relatado por Haddock *et al.* (1998) em células ventriculares de coelho de 1 a 5 dias. Estes autores também observaram que o valor do E_{dia} foi dependente da idade e atingia o nível maduro (~-71 mV) aos 15 dias de vida, embora estes últimos valores tenham sido menos negativos que os encontrados em nosso estudo. Contudo, Kato *et al.* (1996) não encontraram variação de E_{dia} , o qual permaneceu estável em aproximadamente -85 mV, em miócitos ventriculares de cobaia em desenvolvimento. Estes dados sugerem que a variação de E_{dia} ao longo do desenvolvimento do animal pode depender da espécie.

Na presença de Cd^{2+} , observamos marcante despolarização da membrana em células de animais neonatos e de 6-8 dias de idade (20 a 40 mV) e supressão do PA, aparentemente como consequência da perda de excitabilidade da membrana. A remoção de Cd^{2+} do perfusato não restaurou os valores controles de E_{dia} , nem a capacidade das células de responder a estímulos de corrente com um PA. Isto sugere um efeito letal do Cd^{2+} sobre células de animais muito jovens. Experimentos futuros, com outros bloqueadores de $I_{\text{Ca,L}}$, deverão auxiliar no esclarecimento desta questão.

No caso da amplitude do PA, diferença significativa dependente da idade foi observada somente entre os grupos 15-21 dias e adulto. Não temos dados para explicar esta diferença, e nem podemos afirmar se a mesma teria algum impacto fisiológico. Outros autores registraram PAs em miócitos ventriculares de outras espécies durante o desenvolvimento. No coelho, Haddock *et al.* (1998) observaram diferença significativa da amplitude do potencial entre os grupos etários de 10-14 dias e adulto, no entanto o inverso do nosso caso, sendo a amplitude maior no grupo adulto e a menor no grupo de 10-14 dias. Já em cobaia, Kato *et al.* (1996) não observaram diferença significativa da amplitude dos PA durante o desenvolvimento pós-natal.

Sabe-se que a fase zero do PA ocorre pela ativação de canais rápidos de Na^+ , causando a rápida despolarização da membrana que leva E_m a valores positivos (Bers, 2001).

Observamos que a taxa de despolarização da membrana de miócitos durante a fase zero do PA foi dependente da idade, sendo menor em células de animais de 0-3 e 6-8 dias do que em miócitos de animais de 15-21 dias e adultos. Poder-se-ia especular se, em células ventriculares de ratos mais jovens, os canais de Na^+ poderiam apresentar ativação mais lenta, ou mesmo se a fase zero do PA envolveria fluxo de corrente iônica por outros tipos de canais de ativação mais lenta (e.g., canais de Ca^{2+}). No momento, não temos elementos para avançar propostas neste sentido, e o esclarecimento desta variação requer investigação adicional, como por exemplo, o uso de bloqueadores de canais de Ca^{2+} e Na^+ . Não encontramos na literatura experimentos nos quais a taxa de despolarização durante o PA tenha sido analisada em miócitos de mamíferos em desenvolvimento.

Mudança da duração do PA dependente da idade já foi previamente relatada em células cardíacas de várias espécies. Observou-se que a duração do PA registrado em miócitos ventriculares de coelho (Haddock *et al.*, 1998) e cobaia (Kato *et al.*, 1996) e em células atriais humanas (Escande *et al.*, 1985) aumenta com a maturação pós-natal. No entanto, no rato (Langer *et al.*, 1975; Kilborn & Fedida, 1990; Wahler *et al.*, 1994; dados do presente trabalho) e no camundongo (Wang *et al.*, 1996), ocorre o inverso: a duração do PA diminui com a idade (Figuras 4.2 e 4.5 e Tabela 4.2). Wang & Duff (1997), estudaram a corrente transiente de saída de K^+ (I_{t0}), carregada por canais de ativação rápida, e que tem sido considerada importante na determinação da pequena duração do PA característico do ventrículo de roedores adultos (Josephson *et al.*, 1984). Wang & Duff (1997) observaram que a densidade de I_{t0} em células ventriculares de camundongo aumenta significativamente com a idade. Os autores relataram que a adição de 4-AP (bloqueador de I_{t0} , na concentração de 1 mM) prolongou mais o PA em células de animais adultos do que em neonatos. Wang & Duff (1997) sugeriram que este resultado seria um indício de que o aumento da densidade da I_{t0} durante o desenvolvimento poderia contribuir no encurtamento do PA. Estes dados são semelhantes aos de Kilborn & Fedida (1990), em células ventriculares de ratos em desenvolvimento. Há indicações de que I_{t0} também seja sujeita a aumento com desenvolvimento no miocárdio humano (Crumb *et al.*, 1995), o que contradiz a hipótese de que o aumento da densidade da I_{t0} durante o desenvolvimento poderia contribuir no encurtamento do PA, já que em células atriais humanas a duração do PA diminui. Assim não podemos afirmar que o aumento da densidade da I_{t0} durante o desenvolvimento pode

contribuir efetivamente no encurtamento do PA Além disso, há um aumento da amplitude de corrente de K^+ de retificação anômala (*inwardly rectifying K^+ current*, I_{K1}) com o desenvolvimento que tem sido considerado como um dos fatores que podem contribuir para o encurtamento do PA durante o amadurecimento (Whaler *et al.*, 1994). A maior duração do PA (especialmente da fase de platô) em células de animais muito jovens pode implicar em maior influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L nestas células, uma vez que a membrana permanece por mais tempo em valores de E_m nos quais é alta a condutância da membrana representada por estes canais (i.e., próximo de zero mV).

5.3. CORRENTE DE Ca^{2+} EM RESPOSTA A DEGRAUS DE TENSÃO

Em nossos experimentos para medição de correntes de Ca^{2+} , procuramos minimizar outras correntes iônicas ativadas por despolarização. Para suprimir I_{Na} que, além de contaminar o registro, pode causar perda do controle de E_m em *voltage-clamp* devido à sua alta magnitude (Brown *et al.*, 1981), utilizamos, antes do degrau estimulatório ou AP-S, uma rampa despolarizante de -80 para -50 mV, potencial no qual grande parte dos canais de Na^+ são inativados (Magistretti & Alonso, 1999). Para minimizar I_{to} , de rápido curso temporal, adicionamos ao perfusato o bloqueador 4-AP (Wang & Duff, 1997). Para bloquear I_K , substituímos K^+ por Cs^+ no perfusato e na solução de pipeta, exceto por uma pequena quantidade de K^+ na última, para minimizar interferência com a liberação de Ca^{2+} do RS (Dr. Kenneth S. Ginsburg, comunicação pessoal). Os experimentos foram realizados a $23^\circ C$, o que contribuiu para inibir I_{Cl} , presente a temperaturas mais altas (Puglisi *et al.*, 1999). Experimentos preliminares com DIDS (4,4'-diisotiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), bloqueador de I_{Cl} (Puglisi *et al.*, 1999), confirmaram que esta corrente não parece ter sido ativada de modo detectável em nossos experimentos. Contudo, apesar destas precauções, a amplitude da corrente sensível a Cd^{2+} ($I_{Ca,L}$) registrada em resposta a degraus despolarizantes, mostrou-se significativamente menor do que a corrente de membrana registrada na ausência do bloqueador (I_m), na faixa de tensões-testes aplicadas (vide Tabela 4.3). Esta diferença entre os picos de I_m e $I_{Ca,L}$ já havia sido relatada na literatura (Vornanen, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Katsube *et al.*, 1998) e sugere a existência de correntes contaminantes na ausência de Cd^{2+} , como por exemplo, correntes carregadas por trocadores iônicos.

Na Tabela 4.3 e na Figura 4.7A, pode-se observar um considerável aumento da amplitude da $I_{Ca,L}$ evocada por degraus de tensão com o amadurecimento do animal, o que está de acordo com o relatado na literatura em células de ratos (Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1998). Observe-se que estes dados foram obtidos em células recém-isoladas. Em células de ratos neonatos em cultura, Cohen & Lederer (1988) encontraram maior amplitude de $I_{Ca,L}$ em miócitos de neonatos do que de adultos.

Na Figura 4.7B, no entanto, é aparente que a densidade de $I_{Ca,L}$ apresentou valores semelhantes em todas as faixas etárias, o que difere dos resultados de Vornanen (1996), que relatou que a densidade desta corrente atingiu um pico em ratos de 10 a 15 dias (~22 pA/pF), caindo posteriormente, a partir de 1 mês de idade, para valores semelhantes aos observados em neonatos (16-17 pA/pF). Gomez *et al.* (1994) relataram que a densidade da corrente do animal neonato é de apenas 25% daquela no animal adulto, diferindo do observado em nosso trabalho. Contudo, outros autores (Masuda *et al.*, 1993; Katsube *et al.*, 1998) observaram, como nós, que a densidade de $I_{Ca,L}$ não varia durante o desenvolvimento pós-natal do rato.

Wibo *et al.* (1991) não observaram alteração significativa da concentração de canais de Ca^{2+} do tipo L (com relação à massa de tecido) em ventrículo de rato, a partir de 1 dia de idade. Isto apoia os nossos resultados no que diz respeito à constância da densidade de $I_{Ca,L}$ nas diversas idades e indica que a maior amplitude de corrente em animais mais desenvolvidos seria resultado do aumento da área de membrana.

Quanto à amplitude de pico da densidade de corrente observada em células de ratos adultos e neonatos, a literatura é controversa. Por exemplo, no presente trabalho, a densidade de pico de $I_{Ca,L}$ em resposta a degraus estimulatórios (zero mV) foi cerca do dobro da encontrada por Katsube *et al.* (1998) e aproximadamente a metade daquela registrada por Vornanen (1996), embora nestes dois últimos estudos, tenha sido analisada a corrente sensível a Cd^{2+} , tenham sido utilizadas soluções de pipeta com composições semelhantes (exceto pela concentração de EGTA) e a concentração extracelular de Ca^{2+} tenha sido igual (1,8 mM vs. 1 mM no presente estudo).

Embora, no presente trabalho, a amplitude de $I_{Ca,L}$ tenha atingido seu pico a uma tensão estimulatória de zero mV e a densidade de corrente a este potencial tenha sido comparável em células de ratos de diferentes idades, encontramos diferença significativa na

relação I-V em miócitos de adultos e neonatos. Na Figura 4.8C, podemos observar que, para um potencial de -30 mV, amplitude de $I_{Ca,L}$ em miócitos de animais neonatos foi de $-4,00 \pm 1,01$ pA/pC, contra $-0,87 \pm 0,07$ pA/pC obtidos em células ventriculares de animais adultos. A -20 mV, a amplitude $I_{Ca,L}$ foi de $-6,05 \pm 1,18$ e $-2,98$ pA/pC em neonatos e adultos, respectivamente. Porém, nas demais tensões não observamos discrepância entre as duas idades. A maior amplitude de $I_{Ca,L}$ em neonatos a potenciais-testes mais negativos não foi observada em outros trabalhos (Vornanen, 1996; Katsube *et al.*, 1998). Contudo, Kato *et al.* (1996) observaram que este fenômeno estava presente em miócitos ventriculares de fetos de cobaia (44-55 dias após a concepção; duração da gestação: 65 dias), mas não em células de animais de 1 dia de idade após o nascimento. É possível que esta diferença exista em miócitos fetais de rato, e tenha sido aparente em nosso estudo porque muitas das células de neonatos eram provenientes de animais com menos de 24 h de vida pós-natal. É, portanto, importante que, em estudos futuros, seja analisada a relação I-V em miócitos de animais mais velhos (por exemplo, com 6-8 dias de idade), para determinar se este fenômeno é restrito ao período perinatal.

Determinamos a curva de ativação em *steady-state* nestas células, e observamos maior condutância relativa da membrana representada por canais de Ca^{2+} do tipo L (i.e., sensível a Cd^{2+}) a -30 e -20 mV em neonatos do que em adultos. Isto poderia explicar a maior amplitude de $I_{Ca,L}$ em neonatos a estes potenciais-testes. No entanto, devido à menor inclinação da relação $g_{Ca}-V$ no primeiro grupo, esta diferença tende a desaparecer para valores menos negativos de potencial-teste (Figura 4.9). A curva de ativação encontrada por nós mostrou-se bastante diferente da obtida por Katsube *et al.* (1998) em miócitos ventriculares frescos de ratos de 1 a 7 dias de idade e adultos. Estes autores encontraram em células de neonatos um valor de k (fator de inclinação da curva) semelhante ao obtido por nós (8 mV), e que foi comparável ao em células adultas (7 mV), enquanto que no presente estudo, a curva em adultos foi mais inclinada (k de 4 mV). Além disso, Katsube *et al.* (1998) observaram um desvio à direita da curva de ativação em neonatos, comparada a adultos, com valores médios de E_h (i.e., tensão à qual g_{Ca} é a metade da máxima) de $+5$ e -8 mV, respectivamente. Em contraste, observamos, em células de neonatos, um pequeno desvio à esquerda com relação a adultos (E_h de -17 e -12 mV, respectivamente). Mais uma vez, torna-se necessário determinar se este comportamento observado por nós é restrito à

fase imediatamente perinatal. Em tese, pequenas diferenças de idade nesta fase crítica do desenvolvimento poderiam implicar em diferenças na dependência de tensão dos canais (e.g., tipos de subunidades associadas para a formação do canal, distribuição de carga na face extracelular da membrana). No entanto, nossos dados presentes não nos permitem levantar propostas para explicar as diferenças observadas.

5.4. CORRENTE VIA CANAIS DE Ca^{2+} DO TIPO L DURANTE APC

O influxo de Ca^{2+} durante o PA se dá quando a membrana é despolarizada para potenciais nos quais ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} . Dada a evidência de que, em miócitos ventriculares, a duração do PA pode afetar o influxo de Ca^{2+} (Yuan *et al.*, 1996; Sah *et al.*, 2001; Bassani *et al.*, 2002), é possível que alterações na duração do PA durante o desenvolvimento, como aquelas observadas no presente trabalho, tenham influência sobre o influxo de Ca^{2+} através destes canais. Ao que nos consta, o presente trabalho representa a primeira tentativa de quantificar o influxo de Ca^{2+} em células miocárdicas durante variação de E_m com amplitude e curso temporal semelhantes aos do PA durante o desenvolvimento pós-natal.

Deve-se observar, no entanto, que as formas de onda estimulatórias utilizadas aqui não foram idênticas aos PAs representativos, pois a fase de despolarização rápida foi precedida por uma rampa para -50 mV (em contraste com valores de E_{dia} entre -65 a -80 mV). Infelizmente, não tivemos sucesso em nossas tentativas iniciais para minimizar I_{Na} por substituição completa do NaCl da solução de perfusão por cloreto de colina. A remoção do Na^+ extracelular resulta em rápido influxo de Ca^{2+} pela troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (modo reverso), o que, entre outros efeitos indesejáveis, causa morte celular por sobrecarga de Ca^{2+} . Deste modo, foi necessário aplicar o AP-S a partir de valores de potencial menos negativos do que os fisiológicos. Por outro lado, dado que este trabalho foi focalizado apenas em $I_{\text{Ca,L}}$, e esta corrente tem seu limiar de ativação entre -40 e -30 mV, podemos considerar que nossa manobra de rampa despolarizante não deve ter levado a uma subestimativa da corrente de interesse.

Assim como o observado para degraus de tensão, a amplitude de pico de $I_{\text{Ca,L}}$ durante APC foi tanto maior quanto mais maduro o animal, e a normalização da corrente por C_m aboliu as diferenças significativas observadas com a corrente absoluta (Tabela 4.4 e

Figura 4.11). Em todas as idades, os valores de pico de densidade de corrente foram menores com APC do que com degraus de tensão para zero mV (compare Tabelas 4.3 e 4.4). Isto poderia ser explicado pelo fato de que, no primeiro caso, a despolarização inicial da membrana leva E_m para cerca de +20 mV, e neste potencial, apesar da ativação já ser completa, o grau de inativação dos canais é maior (vide, por ex., Katsube *et al.*, 1998) e a *driving force* para o influxo de Ca^{2+} é menor do que a zero mV.

É interessante, contudo, mencionar que, na única célula de animal neonato na qual foi possível aplicar esta técnica, a densidade de pico de $I_{Ca,L}$ foi apenas 20% daquela registrada em células de adulto (-1,3 vs. -6,8 pA/pC), apesar deste valor ser comparável nas duas idades em resposta a degraus de tensão para zero mV (cerca de -11 pA/pC). Se esta observação é de fato representativa, poderíamos especular que a menor taxa de despolarização em neonatos do que em adultos durante o APC (12 vs. 65 mV/ms) poderia ter um papel nesta diferença, pois a despolarização mais lenta poderia levar a um recrutamento menos síncrono de canais e favorecer sua inativação parcial, como proposto no fenômeno de acomodação (Aidley, 1998).

Apesar da ausência de diferença significativa da densidade de pico de $I_{Ca,L}$ em miócitos de ratos desde 6 dias de vida até a idade adulta, pudemos observar que a queda de corrente do grupo de 6-8 dias foi mais lenta que nos grupos de 15-21 dias e adulto (vide Figura 4.10). Isto pode indicar que a $I_{Ca,L}$ evocada por uma onda com a forma do PA da respectiva idade é acompanhada por um influxo total de Ca^{2+} pelo canal tipo L que pode ser drasticamente diferente ao longo do desenvolvimento do animal. O declínio mais lento de $I_{Ca,L}$ em células de animais de 6-8 dias de idade poderia ser consequência da maior duração do platô do PA observada nesta idade, em comparação a animais mais maduros.

5.5. INFLUXO DE Ca^{2+} ATRAVÉS DE CANAIS DE Ca^{2+} DO TIPO L

$I_{Ca,L}$, medida nas diferentes idades, foi integrada no tempo ao longo do AP-S para estimativa da quantidade de carga (pC) carregada pelo Ca^{2+} que entra na célula através do canal de Ca^{2+} tipo L. Observou-se que a quantidade de carga transportada em células de animais dos grupos de 6-8 dias e 15-21 dias foi cerca de 60 e 30%, respectivamente, daquela no animal adulto (Figura 4.12A). Veja-se, portanto, que apesar da área de membrana (a julgar pelas C_m médias, Tabela 4.1) e do pico de $I_{Ca,L}$ terem sido cerca de 30%

e 60% maiores, respectivamente, no grupo de 15-21 dias do que no grupo de 6-8 dias de idade, a carga total transportada por esta corrente no grupo de 15-21 dias foi pouco mais da metade daquela estimada no grupo de 6-8 dias. A explicação mais plausível para esta diferença seria o lento declínio de $I_{Ca,L}$ durante a fase prolongada de platô do AP-S no grupo de 6-8 dias. Nossos resultados, portanto, indicam a forte influência da duração do PA sobre o influxo total de Ca^{2+} durante o PA ventricular em animais imaturos. Esta é, ao nosso conhecimento, a primeira vez que este fenômeno é demonstrado experimentalmente.

Esta diferença foi amplificada quando se calculou o influxo integrado por unidade de área da membrana (pC/pF): em células de animais de 6-8 dias, o influxo de Ca^{2+} foi mais de 2 vezes maior do que aquele em ratos de 15-21 dias e adultos (vide Tabela 4.5). Nestes dois últimos grupos etários, no entanto, o influxo integrado do íon foi comparável. Curiosamente, à idade de 15-21 dias, a duração do PA ventricular do rato é mais próxima daquela em adultos do que em neonatos (Langer *et al.*, 1975; presentes resultados).

Os resultados do presente estudo, portanto, mostram que inferências quanto ao influxo de Ca^{2+} utilizando degraus estimulatórios podem levar a erro devido à complexa variação de E_m durante um PA, que é o estímulo fisiológico para evocar esta corrente. Do mesmo modo, considerar o pico de $I_{Ca,L}$ como um indicador do influxo pode ser problemático, pois a variação de E_m no tempo pode causar profunda influência sobre o influxo, de modo não detectável se apenas o pico de corrente é considerado. Além disso, mudanças no curso temporal de inativação da corrente podem resultar em diferenças não detectáveis pela quantificação pontual de $I_{Ca,L}$. Neste estudo, utilizando APC, estimamos que o influxo total de Ca^{2+} , por unidade de área de membrana, em animais de 6-8 dias de idade seja mais do dobro do que em adultos. Se houvéssimos considerado apenas o pico de $I_{Ca,L}$ durante um degrau para zero mV, teríamos concluído que os influxos seriam semelhantes.

5.6. ESTIMATIVA DO VOLUME CELULAR DE MIÓCITOS CARDÍACOS

Em nosso trabalho, foi preciso estimar o volume celular (V_C) em cada faixa etária para cálculo do incremento total da concentração intracelular de Ca^{2+} devido ao influxo de Ca^{2+} via $I_{Ca,L}$. Não encontramos na literatura um único e definitivo método para o cálculo do V_C de miócitos ventriculares no qual fosse levado em conta o estágio de

desenvolvimento pós-natal do animal nas faixas etárias do presente estudo. Assim, optamos pela utilização de 4 métodos diferentes e comparamos os resultados.

O método **A** foi baseado num estudo estereológico de Olivetti *et al.* (1980), que estimaram, em cortes de miocárdio ventricular de ratos, o V_C e a área de membrana celular por meio de microscopia eletrônica. Utilizamos estes dados para o cálculo da relação superfície-volume, que nos permitiu estimar um fator de conversão (R) para converter em V_C a área da superfície da membrana estimada por C_m . Apesar de ser aparentemente o método mais confiável, por ser baseado em dados morfométricos obtidos experimentalmente, e não em modelos geométricos, os dados de Olivetti *et al.* (1980) restringiam-se a animais de até 11 dias de idade. Portanto pudemos utilizá-lo apenas no grupo de 6-8 dias.

O método **B** foi baseado no modelo usado por Vornanen (1996) para descrever a forma tridimensional de um miócito ventricular de rato, desde a idade de 1 dia até o estágio de adulto jovem. Este modelo é o de um tubo de secção transversa elíptica, cujo volume pode ser calculado a partir do comprimento da célula medido com um microscópio óptico comum. Este método tem as desvantagens de: *a*) considerar que as células de animais de todas as idades têm a mesma geometria, o que vai de encontro à observação experimental (células de animais mais jovens são fusiformes, e aquelas de adultos tendem à forma de um paralelepípedo); e *b*) não considerar o desenvolvimento do sistema de túbulos T, que, no ventrículo de rato, está ausente em animais com menos de 10 dias de idade e parece estar completo ao fim de 3 semanas após o nascimento (Hirakow *et al.*, 1980; Page *et al.*, 1974).

O método **C** foi baseado no trabalho de Satoh *et al.* (1996), que mediram, em células ventriculares de ratos adultos, o volume celular por meio de microscopia confocal de rastreamento, e estabeleceram uma relação entre V_C e a área da superfície de uma das faces da célula, calculada a partir do comprimento e largura das células medidas por microscopia óptica. Este método tem como principal desvantagem, para uso no presente trabalho, ter sido realizado apenas em células de animais adultos e, portanto, ter aplicação discutível a células imaturas nas quais o sistema T ainda não se desenvolveu.

O método **D** também foi obtido do trabalho de Satoh *et al.* (1996), a partir da relação direta entre V_C e C_m (esta medida sob *voltage-clamp*). Também para este método, há a desvantagem de ter sido realizado apenas em células de animais adultos. Além disso, a

relação linear obtida entre as variáveis C_m e V_C não apresentou zero como origem, o que torna sua confiabilidade questionável.

Aplicamos o método **A** apenas para animais de 1 semana de idade, pelos motivos já citados. Os métodos **B** e **C** foram aplicados a todos os grupos etários. No grupo de 6 a 8 dias, o valor de V_C obtido com o método **B** foi semelhante ao valor obtido pelo método **A**. Contudo, o método **C**, aplicado no grupo de 6 a 8 dias, resultou num valor de V_C discordante do obtido com os métodos **A** e **B**, (provavelmente por ter sido originalmente desenvolvido para células que apresentam o sistema T já formado) e, por este fato, foi descartado. No grupo de 15 a 21 dias, apesar da diferença significativa encontrada entre os métodos **B** e **C**, a diferença entre os valores de V_C foi apenas da ordem de 10%, portanto consideramos ambos os métodos equivalentes. Finalmente, o método **B**, aplicado ao grupo adulto, originou resultados semelhantes ao método **C**. O método **D**, no entanto, resultou num valor de V_C discordante do obtido com os métodos **B** e **C**. Devido ao problema já mencionado quanto à origem da relação entre V_C e C_m , este método foi descartado.

Como o método **B** pôde ser usado em todas as idades, foi utilizado para avaliarmos a influência da idade sobre V_C , que se mostrou significativa.

5.7. INCREMENTO NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR TOTAL DE Ca^{2+}

DEVIDO AO INFLUXO VIA $I_{Ca,L}$

No presente trabalho comparamos os valores estimados de $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ calculados pelos diferentes métodos de cálculo do V_C (Tabela 4.8 e Figura 4.15). Com a finalidade de simplificar os cálculos, assumimos que:

- a) o Ca^{2+} que adentra a célula via $I_{Ca,L}$ permanece no citosol, sem ser transportado posteriormente para fora da célula ou para compartimentos intracelulares. Esta premissa é obviamente irreal, já que os diversos sistemas de transporte de Ca^{2+} são esperados operar de acordo com a lei da ação das massas, segundo a qual a velocidade de transporte é tanto maior quanto maior for a concentração do substrato. Portanto, $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ seria menor se esta premissa não fosse tomada.
- b) o Ca^{2+} que adentra a célula via $I_{Ca,L}$ distribui-se homogeneamente no citosol. Esta premissa causa uma grande subestimativa da $[Ca^{2+}]$ no espaço imediatamente subjacente ao

sarcolema (*fuzzy space*), no qual situam-se os sítios de ligação para Ca^{2+} dos canais de Ca^{2+} do RS, e cujo volume é suposto representar apenas uma pequena fração do citosol (Langer & Peskoff, 1996). Portanto, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ no *fuzzy space* seria esperado ser muito maior do que o calculado no presente estudo.

c) o volume de mistura do $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ é o volume celular menos o volume ocupado pelas mitocôndrias. Pelas mesmas razões descritas em (b), com esta premissa incorre-se em grande subestimativa do $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ no *fuzzy space*.

A influência do método utilizado para estimativa de V_C sobre $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ foi basicamente a mesma encontrada para o cálculo de V_C propriamente dito. Mas, independentemente do método usado, pudemos constatar que $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ foi, em média, 3,5 vezes maior em miócitos do grupo mais jovem estudado (6-8 dias), do que em animais de 15-21 dias e adultos. Deste modo, a correção por V_C amplificou mais ainda a diferença observada do influxo integrado de Ca^{2+} , o que era mais que esperado, devido ao aumento de V_C com o amadurecimento.

Vornanen (1996) também calculou os valores de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ nas diferentes idades, porém utilizando valores da integral da $I_{\text{Ca,L}}$ evocadas por pulsos-testes quadrados. Assim, comparamos nossos valores de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ obtidos nas diferentes faixas etárias no presente trabalho, com os valores obtidos por Vornanen (1996). Observamos que os nossos resultados indicam que o valor de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ no grupo de 6 a 8 dias é cerca de 3,2 vezes maior que os valores obtidos no grupo de 15-21 dias e adulto, que, por sua vez, não diferem entre si. Vornanen (1996), por outro lado estimou que o valor de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ no animal de 6 dias é cerca de 1,7 vezes maior que o animal de 15-21 dias e 4,5 vezes maior que o animal adulto, e que este último é cerca de 2,5 vezes menor que no animal de 15-21 dias.

Yuan *et al.* (1996) compararam o valor $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ calculado a partir de correntes de Ca^{2+} evocadas por diferentes formas de pulso-teste, entre eles o pulso-teste quadrado de 200 ms (como utilizado por Vornanen, 1996) e o pulso-teste com a forma do PA, em miócitos ventriculares de ratos adultos (como utilizado no presente trabalho). Estes autores encontraram, como nós, maior $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ em resposta a um pulso quadrado do que a um pulso com a forma do PA (9,5 e 18 $\mu\text{moles/L}$ citosol, respectivamente). Este resultado,

mais uma vez, reforça a importância do uso do APC para estimativas mais realistas do influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$. No entanto, a estimativa de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ em células ventriculares de ratos adultos sob APC feita por Yuan *et al.* (1996) foi cerca do dobro da obtida no presente trabalho. As razões para esta discrepância parecem ser metodológicas: a) concentração extracelular de Ca^{2+} , de 2 mM (vs. 1 mM neste estudo); e b) concentração de EGTA na solução de pipeta: Yuan *et al.* (1996) usaram 10 mM, enquanto que usamos apenas 1 mM. A maior concentração de quelantes de Ca^{2+} no meio citosólico tende a amortecer variações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, portanto, reduzir a inativação de $I_{\text{Ca,L}}$ pelo aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Como já exposto no Capítulo 1 deste trabalho, durante ativação cíclica em *steady-state*, a quantidade de Ca^{2+} que entra na célula durante o PA deve ser igual àquela extruída da célula pela NCX durante o relaxamento, para que a carga intracelular de Ca^{2+} permaneça constante e em equilíbrio. Bassani & Bassani (2002) estimaram, a partir de valores medidos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o efluxo integrado de Ca^{2+} pela NCX (dado em $\mu\text{mol/L}$ citosol) em miócitos ventriculares de ratos em desenvolvimento. O valor obtido por estes autores em células de animais com 1 semana de idade foi 13 $\mu\text{mol/L}$ citosol, enquanto que no presente trabalho, usando métodos eletrofisiológicos, encontramos um $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ devido ao influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ de $\sim 15 \mu\text{mol/L}$ citosol. No animal de 15-21 dias de idade, no entanto, estimamos em nosso trabalho um influxo de $\sim 4 \mu\text{mol/L}$ citosol, enquanto que estes autores encontraram um efluxo de 8-12 $\mu\text{mol/L}$ citosol, ou seja 2-3 vezes maior. Apesar desta discrepância, os valores de efluxo e influxo foram próximos também em células de animais adultos encontramos um $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$, devida ao influxo, de $\sim 5 \mu\text{mol/L}$ citosol, e Bassani & Bassani (2002) estimaram o efluxo integrado via NCX em $\sim 4 \mu\text{mol/L}$ citosol. Assim podemos concluir que, de modo geral, há concordância entre o influxo de Ca^{2+} durante a ativação elétrica determinado neste trabalho e o efluxo, estimado por Bassani & Bassani (2002), dependente da NCX, o principal transportador trans-sarcolema durante o relaxamento, mesmo em miócitos de ratos tão jovens quanto aqueles com 1 semana de idade.

Esta concordância tem uma importante implicação. Alguns autores (e.g., Wetzel *et al.*, 1991, 1993, 1995) propuseram, com base na aparente imaturidade do RS e na relativamente pequena amplitude das correntes mediada por canais de Ca^{2+} em miócitos de animais jovens, que deveria haver outra via de acesso de Ca^{2+} extracelular (sugerida como a

NCX operando em modo reverso), que fosse capaz de suprir Ca^{2+} para o processo contrátil nestas células. Como Bassani & Bassani (2002) demonstraram que a NCX (em modo direto) é a via mais importante para efluxo de Ca^{2+} durante o relaxamento desde o nascimento até a idade adulta, e como nossas estimativas de influxo integrado de Ca^{2+} foram muito próximas das obtidas por estes autores para o efluxo integrado do íon pela NCX, parece não haver indicação de uma via adicional que promova influxo significativo de Ca^{2+} durante a ativação elétrica. Indicações mais recentes de que o RS ventricular de animais muito jovens contém um estoque considerável de Ca^{2+} e pode contribuir mais do que se supunha para a contração têm sido providas em diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem (Hatem *et al.*, 1995; Bonnet & Léoty, 1996; Höhl *et al.*, 1997; Bassani *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Bassani & Bassani, 2000, 2002). É ainda interessante observar que a participação relativa do RS na remoção de Ca^{2+} citosólico durante o relaxamento, calculada a partir dos fluxos integrados via cada transportador em miócitos isolados, foi estimada em ~70% em ratos de 1 semana de idade (Bassani & Bassani, 2002), e este valor foi muito próximo daquele da fração de recirculação do Ca^{2+} ativador da contração, determinado em músculo ventricular de animais da mesma idade (Bassani *et al.*, 2001). Os presentes resultados, de quantificação do influxo de Ca^{2+} durante a ativação elétrica, estão de acordo com o quadro emergente que prevê uma maior participação do RS no acoplamento-excitação-contração em ventrículo de mamíferos imaturos do que se supunha anteriormente.

5.8. IMPACTO DO INFLUXO DE Ca^{2+} VIA $I_{\text{Ca,L}}$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE Ca^{2+} LIVRE ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Para investigarmos o impacto do influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$, é necessário que levemos em conta a ligação passiva do íon a *buffers* intracelulares. Foi demonstrado que, embora a afinidade aparente destes sítios não seja alterada com o desenvolvimento, há um aumento considerável da densidade de sítios no ventrículo do rato, durante o primeiro mês de vida pós-natal. A concentração de sítios foi estimada em 98, 176 e 300 $\mu\text{moles/L}$ citosol em animais neonatos, com 1 semana e a partir de 1 mês de idade, respectivamente (Bassani *et al.*, 1998). Esta variação, portanto, seria esperada afetar marcadamente o impacto do

influxo de Ca^{2+} sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$, uma vez que a ligação do íon a estes sítios leva ao amortecimento da variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para um dado $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$.

As diferenças previamente encontradas com relação aos métodos usados para cálculo de V_C sobre os valores de V_C e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ também foram observadas para $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, ou seja, equivalência dos métodos, exceto em animais de 15-21 dias de idade. Vale dizer que esta faixa etária é um pouco complicada, pois nela se encontra a maior heterogeneidade dos miócitos quanto ao estado de diferenciação, especialmente no que diz respeito ao sistema de túbulos T.

Observamos que, no grupo de 6-8 dias, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi ~7 vezes maior que nos demais grupos etários, que não apresentaram diferença entre si. Portanto, a diferença observada de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ entre animais de 6-8 dias e adultos foi mais que dobrada com o cálculo de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. Isto aparentemente se deveu à menor capacidade de *buffer* passivo no animal imaturo.

Seria esta $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ suficiente para ativar os miofilamentos nestes animais jovens? No ventrículo do rato neonato, Solaro *et al.* (1988) observaram desvio à esquerda da curva pCa x tensão, o que aponta maior sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} do que em adultos. De acordo com os resultados de Solaro *et al.* (1988) em miocárdio ventricular permeabilizado, 50% da força máxima é desenvolvida a uma $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ~650 nM (em contraste com ~1,5 μM em adultos). De acordo com nossos resultados, o influxo de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ durante um PA elevaria $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 250 para cerca de 365 nM ($[\text{Ca}^{2+}]_i + \Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$). De acordo com a Figura 3 do artigo de Solaro *et al.* (1988), podemos inferir que este valor de pico corresponde a uma tensão não superior a 25% da máxima. Assumindo que: a) dados de contrações na ausência de carga possam ser transpostos para contração isométrica; e b) valores máximos de contração sejam desenvolvidos em miócitos de neonatos em resposta a 10 mM cafeína (que libera todo Ca^{2+} do RS) durante inibição da NCX, poderíamos inferir que a amplitude de contrações evocadas pelo PA fisiológico em células de ratos de 1 semana é cerca de 20% da máxima (Bassani & Bassani, 2000). Portanto, à primeira vista, poderíamos concluir que o influxo de Ca^{2+} via canais do tipo L seria suficiente para prover o Ca^{2+} necessário para uma contração típica, à idade de 1 semana. No entanto, há que se considerar outros fatores, como:

- a) os experimentos de Solaro *et al.* (1988) foram realizados em ratos de zero dias de idade. Não temos informações que confirmem ou não se a supersensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} permanece até 1 semana após o nascimento;
- b) é possível que em células de animais imaturos, a contração desenvolvida em resposta a cafeína seja menor do que o teto de resposta contrátil, assim como ocorre em células de adultos;
- c) nossa premissa para o cálculo de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ (e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi de que o Ca^{2+} que atravessa o SL durante todo o PA (i.e., centenas de milissegundos) se distribui no citosol e ali permanece. Porém, como já apontado, esta premissa é irreal, pois os vários transportadores (e.g., NCX, ATPase de Ca^{2+} do RS) seriam esperados deslocar Ca^{2+} do compartimento citosólico à medida que o influxo progredisse.

Deste modo, já não é tão claro que apenas o influxo via $I_{\text{Ca,L}}$ seria capaz de sustentar contrações em miócitos ventriculares de ratos imaturos.

Outra possibilidade seria a de que um maior influxo relativo de Ca^{2+} durante um PA funcione como um *trigger* mais potente para induzir a abertura dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS nesta idade. Há indicação de subsensibilidade do mecanismo de CICR em ventrículo de ratos muito jovens (Fabiato, 1982). A entrada de uma quantidade considerável de Ca^{2+} via $I_{\text{Ca,L}}$ poderia, então, evocar CICR na região imediatamente subjacente ao SL, que é o local onde se encontra a porção juncional do RS em células cardíacas nas quais o sistema de túbulos T ainda não se desenvolveu (Page *et al.*, 1974). O Ca^{2+} liberado pelo RS superficial se difundiria para regiões mais internas da célula, onde poderia evocar CICR da porção corbular (não juncional) do RS, como ocorre em miócitos atriais, nos quais não há túbulos T (Hüser *et al.*, 1996). Esta proposta recebe apoio das observações de Haddock *et al.* (1999), que, por meio de microscopia confocal de rastreamento, observaram heterogeneidade espacial do transiente de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de coelhos imaturos. Estes autores relataram que o transiente de Ca^{2+} inicia-se na porção superficial destas células, propagando-se, a seguir, para regiões mais profundas.

5.9 CONCLUSÃO

Em resumo, neste trabalho, encontramos que, durante despolarização de miócitos ventriculares de ratos imaturos por formas de onda semelhantes ao PA, o aumento em $[Ca^{2+}]_i$ causado pelo influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L foi muito maior do que o em células de animais adultos, apesar da amplitude de pico de $I_{Ca,L}$ ter sido consideravelmente maior nas últimas. Isto parece dever-se a diferenças ontogenéticas na duração do PA, na área de membrana, no volume celular e na concentração miocárdica de sítios de ligação passiva de Ca^{2+} . Os presentes resultados mostram que o maior influxo de Ca^{2+} por estes canais pode ter um forte impacto sobre o acoplamento excitação-contração no ventrículo imaturo.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA

1. AGATA, N., TANAKA, H., SHIGENOBU, K. Possible action of cyclopiazonic acid on myocardial sarcoplasmic reticulum: inotropic effects on neonatal and adult rat heart. Br. J. Pharmacol. **108**: 571-572, 1983.
2. AIDLEY, D. J. The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press, 1998.
3. ARREOLA, J. DIRKSEN, R. T., SHIEH, R., WILLIFORD, D. J. and SHEU, S. Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients under action potential clamp in guinea pig ventricular myocytes. Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 30) **261**: C393-C397, 1991.
4. ARTMAN, M. Developmental changes in myocardial contractile responses to inotropic agents. Cardiovasc. Res. **26**: 3-13, 1992.
5. BALAGURU, D., HADDOCK, P.S., PUGLISI, J.L., BERS, D.M., COETZEE, W.A., and ARTMAN, M. Role of the sarcoplasmic reticulum in contraction and relaxation of immature rabbit ventricular myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. **29**: 2747-2757, 1997.
6. BASSANI, R. A., BASSANI, J. W. M. & BERS, D. M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. J. Physiol. **453**: 591-608, 1992.
7. BASSANI, J.W.M. BASSANI, R. A., BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac myocytes: species-dependent differences in cellular mechanisms. J. Physiol. **476**: 279-293, 1994a.
8. BASSANI, R. A., BASSANI, J. W. M., BERS, D. M. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. J. Physiol. **476**: 295-308, 1994b.
9. BASSANI, R. A., SHANNON, T. R., BERS, D. M. Passive Ca^{2+} binding in ventricular myocardium of neonatal and adult rats. Cell Calcium. **23(6)**: 433-442, 1998.

10. BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M. $[Ca]_i$ transients in ventricular myocytes from developing rats. Biophys.J. **78**(1): 2208-2219, 2000.
11. BASSANI, R.A., FERRAZ, S.A., BASSANI, J.W.M. Estimation of Ca^{2+} recirculating fraction in rat ventricle: influence of the methodological approach. Revista de Engenharia Biomédica **17**(2): 63-67, 2001.
12. BASSANI, R.A., ALTAMIRANO, J., BERS, D.M. Action potential duration (APD) and SR Ca loading in ventricular myocytes. Biophys. J. **82**: 2916-2938, 2002.
13. BASSANI, R. A. and BASSANI, J. W. M. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. Am. J. Physiol (Heart Circ. Physiol.) **282**: H2406-H2413, 2002.
14. BEAN, BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu. Rev. Physiol. **51**: 367–384, 1989.
15. BERLIN J. R., BASSANI, J. W. M. & BERS D. M. Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes. Biophys. J. **67**: 1775-1787, 1994.
16. BERNE, R.M., LEVY, M.N. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
17. BERS, D. M. & BRIDGE, J. H. B. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum Ca-pump: ryanodine and voltage sensitivity. Circ. Res. **65**: 334-342, 1989.
18. BERS, D.M., BASSANI, J.W.M. and BASSANI, R.A. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. Ann. N.Y. Acad. Sci. **779**: 430 – 442, 1996.

19. BERS, D. M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. 122v. (Developments in Cardiovascular Medicine).
20. BOERTH, S. R., ZIMMER, D. B. & ARTMAN, M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na⁺ - Ca²⁺ exchanger peak near birth in developing rabbit and rat hearts. Circ. Res. **74**: 354-359, 1994.
21. BONNET V & LÉOTY C. An estimate of the participation of the sarcoplasmic reticulum in intracellular Ca²⁺ regulation in adult and newborn ferret hearts. Comp. Biochem. Physiol. **115A**: 341-348, 1996.
22. BOUCHARD, R. A., CLARK, R. B., GILES, W. R. Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes: Action potential voltage-clamp measurements. Circ. Res. **76**: 790-801, 1995.
23. BRILLANTES, A.M.B., BEZPROZVANNAYA, S. MARKS, A. Developmental and tissue-specific regulation of rabbit skeletal and cardiac muscle calcium channels involved in excitation-contraction coupling. Circ. Res. **75**: 503-510, 1994.
24. BROWN, A.M., LEE, K.S. and POWELL, T. Sodium current in single rat heart muscle cells. J. Physiol. **318**: 479-500, 1981.
25. CHEN, F., DING, S., LEE, B.S. and WETZEL, G.T. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and cell contraction in developing rabbit heart. J. Mol. Cell. Cardiol. **32**: 745-755, 2000.
26. COHEN, N.M., and LEDERER, W.J. Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. J. Physiol. **406**: 115-146, 1988.

27. CRUMB, J.R., W.J., PIGOTT, J.D. and CLARKSON, C. W. Comparison of I_{to} in young and adult human atrial myocytes: evidence for developmental changes. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 37) **268**: H1335-H1342, 1995.
28. DELBRIDGE, L. M. D., BASSANI, J. W. M., BERS, D. M. Steady-state twitch Ca^{2+} fluxes and cytosolic Ca^{2+} buffering in rabbit ventricular myocytes. Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 39) **270**: C192-C199, 1996.
29. DELBRIDGE, L.M., SATOH, H., YUAN, W., BASSANI, J.W.M., QI, M., GINSBURG, K. S., SAMAREL, A. M. and BERS, D.M. Cardiac myocyte volume, Ca^{2+} fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. Am. J. Physiol. (Heart. Circ. Physiol. 41) **272**: H2425–H2435, 1997.
30. ESCANDE, D., LOIASANGE, D. PLANCHE, C. and CORABOEUF, E. Aged-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 18) **249**: H843-H850, 1985.
31. FABIATO, A. Calcium release in skinned cardiac cells: variations with species, tissues, and development. Fed. Proc. **41**(7): 2238-2244, 1982.
32. FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 14) **245**: C1-C14, 1983.
33. FERMINI, B. and SCHANNE, O. F. Determinants of action potential duration in neonatal rat ventriculecells. Cardiovasc. Res. **25**: 235-243, 1991.
34. FERRAZ, S.A., BASSANI, J.W.M. and BASSANI, R.A. Rest-dependence of twitch amplitude and sarcoplasmic reticulum calcium content in the developing rat myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol. **33**: 711-722, 2001.

35. GARCIA, E.A.C. Biofísica. Sarvier, 2000.
36. GOMBOSOVÁ, I., BOKNÍK, P. KIRCHHEFER, U., KNAPP, J., LÜSS, H., MÜLLER, F.U., MÜLLER, T., VAHLENSIEK, U. SCHMITZ, W., BODOR, G.S. and NEUMANN, J. Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 43) **274**: H2123-H2132, 1998.
37. GOMES, P.A., BASSANI, R.A. and BASSANI, J.W.M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. IEEE Trans Biomed. Eng. **48**(6): 630-636, 2001.
38. GOMEZ, J.P., POTREAU, D., BRANKA, J.E. and RAYMOND, G. Developmental changes in Ca^{2+} currents from newborn rat cardiomyocytes in primary culture. Pflügers Arch. **428**: 241-249, 1994.
39. HADDOCK, P.S., COETZEE, W.A., ARTMAN, M. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current and contractions measured under Cl^- - free condition in developing rabbit hearts. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 42) **273**: H837-846, 1997.
40. HADDOCK, P.S., ARTMAN, M., COETZEE, W. A. Influence of postnatal changes in action potential duration on Na-Ca exchange in rabbit ventricular myocytes. Pflügers Arch. **435**: 789-795, 1998.
41. HADDOCK, P.S., COETZEE, W.A., CHO, E., PORTER, L., KATOH, H., BERS, D.M., JAFRI, M.S. and ARTMAN, M. Subcellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. Circ. Res. **85**: 415-427, 1999.

42. HANSON, G. L., SCHILLING, W. P. and MICHAEL, L. H. Sodium-potassium pump and sodium-calcium exchange in adult and neonatal canine cardiac sarcolemma. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 33). **264**: H320–H326, 1993.
43. HATEM SN, SWEETEN T, VETTER V & MORAD M. Evidence for presence of Ca²⁺ channel-gated Ca²⁺ stores in neonatal human atrial myocytes. Am. J. Physiol (Heart Circ. Physiol. 37) **268**: H1195-H1201, 1995.
44. HILLE, B. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associate, Inc., 1992.
45. HIRAKOW, R., GOTOH, T. and WATANABE, T. Quantitative studies on the ultrastructural differentiation and growth of mammalian cardiac muscle cells. I. The atria and ventricles of the rat. Acta anat. **108**: 144-152, 1980.
46. HÖHL CM, LIVINGSTON B, HENSLEY J & ALTSCHULD RA. Calcium handling by sarcoplasmic reticulum of neonatal swine cardiac myocytes. Am. J. Physiol (Heart Circ. Physiol. 42) **273**: H192-H199, 1997.
47. HÜSER, J., LIPSIUS, S.L. and BLATTER, L.A. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. J. Physiol. **494**: 641–651, 1996.
48. JANVIER, N.C., BOYETT, M.R. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. Cardiovasc. Res. **32**: 69-84, 1996.
49. JOSEPHSON, I.R., SANCHEZ-CHAPULA, J. and BROWN, A.M. Early outward current in rat single ventricular cells. Circ. Res. **54**: 157-162, 1984.
50. KATO, Y., MASUMIYA, H., AGATA, N. TANAKA, H. and SHIGENOBU, K. Developmental changes in action potential and membrane currents in fetal, neonatal and adult guinea-pig ventricular myocytes. Mol. Cell Cardiol. **28**: 1515-1522, 1996.

51. KATSUBE, Y., YOKOSHIKI, H., NGUYEN, L., YAMAMOTO, M. and SPERELAKIS, N. L-type Ca^{2+} currents in ventricular myocytes from neonatal and adult rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. **76**: 873-881, 1998.
52. KILBORN, M.J. and FEDIDA, D. A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. J. Physiol. **430**: 37-60, 1990.
53. LANGER, G.A., BRADY, A.J., TAN, S.T. and SERENA, D.S. Correlation of the glycoside response, the force staircase, and the action potential configuration in the neonatal rat heart. Circ. Res. **36**: 744-751, 1975.
54. LANGER, G.A. and PESKOFF, A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. Biophys. J., **70**: 1169 – 1182, 1996.
55. LIU, S.J., WYETH, R.P., MELCHERT, R.B. and KENNEDY, R.H. Aging-associated changes in whole cell K^+ and L-type Ca^{2+} currents in rat ventricular myocytes. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.) **279**: H889-H900, 2000.
56. LOMPRÉ, A.M., LAMBERT, F., LAKATTA, E.G. and SCHWARTZ, K. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. Circ. Res. **69**: 1380-1388, 1991.
57. MAGYAR, C.E., WANG, J., AZUMA, K.K. and MCDONOUGH, A.A. Reciprocal regulation of cardiac Na-K-ATPase and Na/Ca exchanger: hypertension, thyroid hormone, development. Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 38) **269**: C675-C682, 1995.
58. MAGISTRETTI, J. and ALONSO, A. Sustained sodium current in entorhinal cortex layer II principal neurons: A whole-cell and single-channel study. J. Gen. Physiol. **114**: 491-509, 1999.

59. MAHONY, L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. Cardiovasc. Res. **31**: E61-E67, 1996.
60. MASUDA, H. and SPERELAKIS, N. Inward rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.) **265**: H1107-H1111, 1993.
61. MOUNTCASTLE, V.B. Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 2v.
62. NEGRETTI, N., O'NEILL, S. C. & EISNER, D. A. The relative contribution of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. Cardiovasc. Res. **27**: 1826-1830, 1993.
63. OLIVETTI, G., ANVERSA, P. and LOUD, A. V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. Circ. Res. **46**: 503-512, 1980.
64. PAGE, E., EARLEY, J. and POWER, B. Normal growth of ultrastructures in rat left ventricular myocardial cells. Circ. Res. **35**(2) suppl II:12-6, 1974.
65. PAGE, E. and BUECKER, J.L. Development of dyadic junctional complexes between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma in rabbit left ventricular myocardial cells. Morphometric analysis. Circ. Res. **48**: 519-522, 1981.
66. PIGNIER, C. and POTREAU, D. Characterization of nifedipine-resistant calcium current in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.) **279**: H2259-H2268, 2000.

67. PUGLISI, J. L., YUAN, W., BASSANI, J. W. M., BERS, D. M. Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channel in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. Circ. Res. **85**: e7-e16, 1999.
68. SAH, R., RAMIREZ, R.J., KAPRIELIAN, R. and BACKX, P.H. Alterations in action potential profile enhance excitation-contraction coupling in rat cardiac myocytes. J. Physiol. **533**: 201-214, 2001.
69. SAKMANN, B. and NEHER, E. Single-channel recording. Plenum Press, 1983.
70. SATOH, H., DELBRIDGE, L.M.D., BLATTER, L.A. and BERS, D.M. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. Biophys. J. **70**: 1494-1504, 1996.
71. SOLARO, R.J., LEE, J.A., KENTISH, J.C. and ALLEN, D.G. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. Circ.Res. **63**: 779-787, 1988.
72. VETTER, G. T., CHEN, F. and KLITZNER, T. $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange and cell contraction in isolated neonatal and adult rabbit cardiac myocytes. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 37) **268**: H1723-H1733, 1995.
73. VORNANEN, M., SHEPHERD, N. and ISENBERG, G. Tension-voltage relations of single myocytes reflect Ca release triggered by Na/Ca exchange at 35 °C but not 23 °C. Am. J. Physiol (Cell Physiol) **267**: C623-C632, 1994.
74. VORNANEN, M. Contribution of sarcolemmal calcium current to total cellular calcium in postnatally developing rat heart. Cardiovasc. Res. **32**: 400-410, 1996.

75. WAHLER, G.M., DOLLENGER, S.J., SMITH, J.M. and FLEMAL, K.L. Time course of postnatal changes in rat heart action potential and in transient outward current is different. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 36), **267**: H1157-H1166, 1994.
76. WANG, L., FENG, Z., KONDO, C.S., SHELDON, R.S., DUFF, H.J. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. Circ. Res. **79**:79-85, 1996.
77. WANG, L., DUFF, H.J. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. Circ. Res. **81**: 120-127, 1997.
78. WETZEL, G.T., CHEN, F. and KLITZNER, T.S. L- and T-type calcium channels in acutely isolated neonatal and adult cardiac myocytes. Pediatr. Res. **30**: 89-94, 1991.
79. WETZEL, G.T., CHEN, F. and KLITZNER, T.S. Na⁺/Ca²⁺ exchange and cell contraction in isolated neonatal and adult rabbit cardiac myocyte. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 37) **268**: H1723-H1733, 1995.
80. WIBO, M., BRAVO, G. and GODFRAIND, T. Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. Circ. Res. **68**: 662-673, 1991.
81. YUAN, W., GINSBURG, K. S. and BERS, D. M. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. J. Physiol. **493.3**: 733-746, 1996.

APÊNDICE

Dados primários

1. Capacitâncias

Grupo de 0 a 3 dias (n=10)					
Registro	τ_c	ΔE_m	I_o	I_∞	C_m (pF)
99804316	0,745	5	182,26	11,38	28,97
99804321	1,072	5	152,25	10,64	35,10
99804328	1,181	5	159,44	12,22	40,79
99804217	1,700	5	145,42	1,19	49,85
20020664	0,700	5	182,26	10,76	27,10
20020673	0,740	5	178,40	14,78	28,80
20020694	0,645	5	178,50	1,22	23,20
20020705	0,803	5	155,11	10,40	26,70
20020728	1,099	5	144,89	1,20	32,10
20020686	0,754	5	158,99	12,34	26,00

Grupo de 6 a 8 dias (n=11)					
Registro	τ_c	ΔE_m	I_o	I_∞	C_m (pF)
99804177	0,432	5	507,79	15,84	45,29
99804356	0,879	5	216,83	16,16	41,19
99804364	2,100	5	114,79	22,94	60,25
99804376	1,307	5	151,64	2,55	40,31
20020611	0,223	5	753,4800	40,193	35,50
20020622	0,909	5	162,4673	0,0026	29,54
20020746	0,405	5	410,9961	1,1608	33,38
20020786	0,221	5	722,3450	-1,1199	31,88
20020803	0,96	5	161,0154	0,4268	31,00
20020812	0,245	5	665,1270	6,4688	32,91
20020826	0,721	5	214,7717	0,0313	30,97

Grupo de 15 a 21 dias (n=11)					
Registro	τ_c	ΔE_m	I_o	I_∞	C_m (pF)
99804050	1,99	5	108,21	15,27	50,14
99804060	1,78	5	131,83	14,68	52,81
99804071	1,76	5	145,87	39,88	70,67
99804145	0,837	5	251,174	7,89	43,41
99804156	0,383	5	394,411	26,14	32,36
20020895	0,503	5	368,3764	0,0476	37,06
20020913	0,294	5	748,595	-12,1094	43,32
20020930	0,605	5	364,2974	-6,903	43,26
20020947	0,709	5	310,9432	-1,2062	43,92
20020956	0,775	5	226,2922	0,7593	35,19
20020972	0,926	5	246,6246	0,4114	45,75

Grupo adulto (n=16)					
Registro	τ_c	ΔE_m	I_o	I_∞	C_m (pF)
99803916	0,990	5	490,00	20,00	101,15
99804196	1,658	5	329,35	87,39	148,66
99804242	0,76	5	921,60	61,08	150,03
99804253	1,95	5	133,82	46,95	80,40
99804297	2,44	5	230,89	94,89	191,29
20020004	2,661	5	272,7335	-0,9005	144,67
20020022	3,01	5	89,928	-1,745	53,11
20020039	1,222	5	758,124	-6,161	183,79
20020072	0,8839	5	757,471	29,557	139,34
99804379	1,491	5	380,7371	-0,3151	113,44
20020379	2,198	5	244,282	1,493	108,05
20020389	1,702	5	356,89	-1,93	120,80
99803530	1,537	5	322,87	9,01	102,13
99803540	1,865	5	220,1	1,22	82,54
99803588	1,721	5	234,9	11,40	85,00
99803627	1,838	5	156,41	33,45	73,14

2. PA

Grupo de 0 a 3 dias							
	Controle				Cd ²⁺		
Registro	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)	Amplitude do PA (mV)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)
99804316	69,56	0,11	604,20	-62,32	7,90	277,40	-25,39
99804321	105,87	18,23	241,60	-66,98	8,21	182,40	-29,93
99804328	75,94	-----	421,80	-71,73	8,28	182,40	-31,20
99804217	73,58	18,80	185,60	-67,17	morreu	morreu	morreu

Grupo de 6 a 8 dias							
	Controle				Cd ²⁺		
Registro	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)	Amplitude do PA (mV)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)
99804177	100,94	29,73	268,80	-74,05	morreu	morreu	morreu
99804356	102,33	30,09	171,00	-75,45	3,08	26,60	-84,10
99804364	114,53	30,97	171,60	-81,16	morreu	morreu	morreu
99804376	68,67	11,83	399,00	-66,91	6,77	68,40	-24,26

Grupo de 15 a 21 dias								
	Controle				Cd ²⁺			
Registro	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)
99804050	154,59	39,95	168,94	-86,32	147,28	69,50	58,00	-89,43
99804060	102,68	47,32	107,21	-76,17	122,36	63,58	18,50	-84,48
99804071	131,39	89,11	115,18	-80,52	124,45	75,71	18,50	-83,08
99804145	120,86	39,39	34,00	-85,49	109,98	-	38,00	-88,10
99804156	109,99	48,21	78,00	-73,47	98,52	-	69,50	-74,62

Grupo adulto								
	Controle				Cd ²⁺			
Registro	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)	Amplitude do PA (mV)	dV / dt (mV/ms)	APD ₇₅ (ms)	Potencial de repouso (mV)
99803801	90,27	20,21	32,00	-82,09	morreu	morreu	morreu	morreu
99803885	100,43	96,57	38,00	-83,78	morreu	morreu	morreu	morreu
99803916	91,40	59,64	21,00	-76,45	morreu	morreu	morreu	morreu
99804196	90,94	54,82	32,00	-75,82	morreu	morreu	morreu	morreu
99804242	120,74	100,00	54,00	-99,86	114,16	103,10	30,00	-100,56
99804283	88,01	33,04	34,50	-79,55	80,80	100,62	26,00	-82,22
99804297	108,08	88,39	42,50	-74,70	103,62	58,00	28,50	-81,73

3. Curva I-V

Grupo de 0 a 3 dias									
Controle (pA)									
Registro	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV
20020664	-36,1	-93,9	-169,3	-227,8	-331,5	-206,0	-165,9	-84,4	-56,0
20020673	-17,7	-76,0	-128,6	-154,7	-230,3	-153,3	-118,5	-85,6	-30,8
20020694	-25,3	-169,7	-277,9	-337,9	-345,0	-336,6	-284,8	-175,8	-91,6
20020705	-36,7	-151,0	-211,4	-295,2	293,4	-298,0	-207,9	-158,1	-98,8
20020728	-14,4	-38,8	-152,8	-306,0	-396,3	-317,3	-156,5	-53,5	-9,2
20020686	-41,1	-185,1	-134,9	-268,0	-275,7	-261,8	-231,0	-180,9	-125,8

Grupo de 0 a 3 dias									
Cd ²⁺ (pA)									
Registro	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV
20020671	-18,2	-24,1	-21,1	-6,2	-19,5	15,2	-17,6	-14,9	-17,6
20020680	-9,8	-16,1	-25,6	-13,0	-22,2	-10,9	-14,7	-23,9	-12,7
20020702	-10,2	-12,5	-16,2	-18,2	-18,1	-15,8	-19,3	-17,2	-7,9
20020711	-15,0	-14,2	-21,1	-17,9	-14,7	-20,8	-17,4	-20,8	-21,4
20020732	-14,4	-10,9	-18,3	-18,0	-25,0	-28,6	-21,2	-25,0	-18,0
20020691	-20,0	-17,4	-17,9	-17,4	-17,4	-11,7	-14,6	-12,2	-14,6

Grupo de 0 a 3 dias									
Cd ²⁺ sensível (pA)									
Registro	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV
664-671	-17,90	-69,80	-148,20	-221,60	-312,00	-221,20	-148,30	-69,50	-38,40
673-680	-7,89	-59,90	-103,00	-141,70	-208,15	-142,40	-103,80	-61,70	-18,10
694-702	-15,10	-157,20	-261,70	-319,70	-326,90	-320,80	-265,50	-158,60	-83,70
705-711	-21,70	-136,80	-190,30	-277,30	308,10	-277,20	-190,50	-137,30	-77,40
728-732	0,00	-27,90	-134,50	-288,00	-371,30	-288,70	-135,30	-28,50	8,79
686-691	-21,10	-167,70	-117,00	-250,60	-258,30	-250,10	-216,40	-168,70	-111,20

Grupo de 0 a 3 dias									
Cd ²⁺ sensível (pA / pF)									
Registro	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV
664-671	-0,7	-2,6	-5,5	-8,2	-11,5	-8,2	-5,5	-2,6	-1,4
673-680	-0,3	-2,1	-3,6	-4,9	-7,2	-4,9	-3,6	-2,1	-0,6
694-702	-0,7	-6,8	-11,3	-13,8	-14,1	-13,8	-11,4	-6,8	-3,6
705-711	-0,8	-5,1	-7,1	-10,4	11,5	-10,4	-7,1	-5,1	-2,9
728-732	0,0	-0,9	-4,2	-9,0	-11,6	-9,0	-4,2	-0,9	0,3
686-691	-0,8	-6,5	-4,5	-9,6	-9,9	-9,6	-8,3	-6,5	-4,3

Grupo de 6 a 8 dias – Vtest = 0 mV					
Registro	Controle (pA)	Cd ²⁺ (pA)	Controle – Cd ²⁺ (pA)	Controle – Cd ²⁺ (NORM.) (pA/pF)	Registro da cap.
20020610	-474,60	-28,47	-446,13	-12,57	611-613
20020619	-463,47	-23,90	-439,57	-14,88	622-623
20020742	-443,62	-43,02	-400,60	-12,00	746-748
20020781	-414,20	-37,47	-376,73	-11,82	786-789
20020797	-367,84	-36,05	-331,79	-10,70	803-806
20020809	-384,65	-34,37	-350,29	-10,64	812-814
20020823	-426,69	-42,30	-384,39	-12,41	826-828

Grupo de 15 a 21 dias - Vtest = 0 mV					
Registro	Controle (pA)	Cd ²⁺ (pA)	Controle – Cd ²⁺ (pA)	Controle – Cd ²⁺ (NORM.) (pA/pF)	Registro da cap.
20020912	-569,82	-55,21	-514,61	-11,88	913-915
20020922	-564,05	-54,81	-509,25	-11,77	930-936
20020946	-460,45	-48,07	-412,38	-9,39	947-950
20020964	-440,31	-37,99	-402,32	-11,43	956-963
20020971	-587,08	-58,82	-528,26	-11,55	972-976

Grupo adulto												
Controle (pA)												
Registro	-50 mV	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV	60 mV
99804389	-79,5	-111,8	-155,2	-380,4	-823,4	-1075,5	-925,9	-439,0	-347,2	-158,9	-54,4	-56,2
99804530	-81,7	-108,3	-143,0	-349,3	-790,5	-977,4	-875,2	-555,6	-287,0	-127,7	-67,4	-22,5
99804540	-61,9	-105,7	-155,2	-350,0	-810,5	-1065,6	-906,3	-575,3	-301,3	-142,8	-39,6	-23,9
99804588	-72,3	-96,9	-128,4	-342,6	-816,9	-1043,0	-907,8	-589,1	-289,9	-130,9	-11,9	-19,6
99804627	-70,2	-103,1	-131,6	-305,7	-758,4	-986,6	-844,7	-545,6	-280,1	-101,7	-25,6	-11,7

Grupo adulto												
Cd ²⁺ (pA)												
Registro	-50 mV	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV	60 mV
99803390	-29,15	-62,82	-76,10	-111,14	-79,73	-91,81	-102,68	84,56	-107,51	-91,81	-78,52	-103,89
99803538	-33,70	-61,28	-67,40	-90,89	-77,62	-34,72	-86,81	-54,13	-57,19	-63,32	-90,89	-68,43
99803545	-9,90	-55,30	-74,29	-73,46	-46,22	-54,48	-60,25	-37,14	-55,30	-73,46	-64,38	-72,63
99803589	-21,25	-46,75	-47,60	-67,15	-56,95	-38,25	-67,15	-54,40	-45,05	-62,05	-36,55	-68,00
99803632	-21,94	-56,32	-55,58	-46,81	-43,15	-40,96	-53,39	-42,42	-49,73	-37,30	-49,00	-57,78

Grupo adulto												
Cd ²⁺ sensível (pA)												
Registros	-50 mV	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV	60 mV
389-390	-50,33	-48,98	-79,05	-269,22	-743,64	-983,71	-823,23	-523,58	-239,65	-67,11	24,13	47,66
530-538	-48,00	-46,98	-75,57	-258,38	-712,85	-942,64	-788,43	-501,45	-229,79	-64,34	23,49	45,96
540-545	-52,00	-50,35	-80,89	-276,51	-764,32	-1.011,11	-846,03	-538,16	-245,97	-69,33	24,76	48,70
588-589	-51,00	-50,15	-80,75	-275,40	-759,90	-1.004,70	-840,65	-534,65	-244,80	-68,85	24,65	48,45
627-632	-48,27	-46,81	-76,06	-258,90	-715,27	-945,65	-791,34	-503,18	-230,38	-64,36	23,40	46,08

Grupo adulto												
Cd ²⁺ sensível (pA/pF)												
Registros	-50 mV	-40 mV	-30 mV	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV	60 mV
389-390	-0,42	-0,41	-0,65	-2,23	-6,16	-8,15	-6,82	-4,34	-1,98	-0,56	0,20	0,39
530-538	-0,47	-0,46	-0,74	-2,53	-6,98	-9,23	-7,72	-4,91	-2,25	-0,63	0,23	0,45
540-545	-0,63	-0,61	-0,98	-3,35	-9,26	-12,25	-10,25	-6,52	-2,98	-0,84	0,30	0,59
588-589	-0,60	-0,59	-0,95	-3,24	-8,94	-11,82	-9,89	-6,29	-2,88	-0,81	0,29	0,57
627-632	-0,66	-0,64	-1,04	-3,54	-9,78	-12,93	-10,82	-6,88	-3,15	-0,88	0,32	0,63

4. Influxo de Ca^{2+} normalizada pela capacitância

Grupo de 6 a 8 dias			
Registros	$\int I_{\text{Ca}} \cdot dt$ (pC)	C_m (pF)	$\int I_{\text{Ca}} / C_m$ (pC/pF)
611-613	9,12	35,50	0,26
622-623	12,22	29,54	0,41
746-748	12,76	33,38	0,38
786-789	11,08	31,88	0,35
803-806	12,66	31,00	0,41
812-814	9,98	32,91	0,30
826-828	9,09	30,97	0,29

Grupo de 15 a 21 dias			
Registros	$\int I_{\text{Ca}} \cdot dt$ (pC)	C_m (pF)	$\int I_{\text{Ca}} / C_m$ (pC/pF)
895-906	5,67	37,06	0,15
913-915	6,23	43,32	0,14
930-936	6,65	43,26	0,15
947-950	6,29	43,92	0,14
956-963	4,98	35,19	0,14
972-976	6,55	45,75	0,14

Grupo adulto			
Registros	$\int I_{\text{Ca}} \cdot dt$ (pC)	C_m (pF)	$\int I_{\text{Ca}} / C_m$ (pC/pF)
004-006	22,86	144,67	0,16
020-022	9,88	53,11	0,19
038-039	12,93	183,79	0,07
070-072	17,08	139,34	0,12
362-379	25,94	113,44	0,23
376-379	21,02	108,05	0,19

6. Estimativa do V_C , $\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ e $\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$

Grupo de 6 a 8 dias							
Registros	Método A			Método B			Método C
	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	Volume celular (pL)
611-613	6,50	10,39	74,02	6,28	10,74	76,78	9,11
622-623	5,41	16,74	126,52	4,67	19,39	150,41	7,51
746-748	6,11	15,46	115,47	4,91	19,22	148,84	7,50
786-789	5,83	14,06	103,63	4,24	19,36	150,12	7,23
803-806	5,67	16,52	124,64	6,39	14,67	108,76	9,26
812-814	6,02	12,27	88,91	4,92	15,02	111,67	7,92
826-828	5,67	11,87	85,71	6,28	10,71	76,51	9,11

Grupo de 15 a 21 dias						
Registros	Método C			Método B		
	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)
895-906	13,66	3,07	13,80	11,78	3,56	16,05
913-915	13,42	3,44	15,49	12,03	3,83	17,31
930-936	13,53	3,64	16,40	12,60	3,91	17,64
947-950	13,81	3,37	15,18	12,39	3,76	16,97
956-963	14,24	2,59	11,60	13,75	2,68	12,01
972-976	13,30	3,65	16,45	11,01	4,41	19,96

Adulto							
Registros	Método C			Método B			Método D
	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	Volume celular (pL)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Total}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	$\Delta[\text{Ca}]_{\text{Livre}}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	Volume celular (pL)
004-006	29,60	6,16	22,96	30,63	5,95	22,16	23,04
020-022	34,16	2,31	8,44	35,34	2,23	8,15	15,90
038-039	37,95	2,72	9,96	65,45	1,58	5,74	26,09
070-072	28,46	4,78	17,72	24,54	5,55	20,63	22,62
362-379	27,32	7,57	28,42	28,27	7,31	27,43	20,60
376-379	26,57	6,31	23,54	32,07	5,23	19,40	20,18

6.1 Dimensões das células (corrente) para o cálculo do V_C pelo método B e C

Grupo de 6 a 8 dias				
Registro	Dimensões		A	b
	L (μm)	ω (μm)	$\omega / 6$	$\omega / 2$
20020611	60	20	3	10
20020622	55	18	3	9
20020746	52	19	3	10
20020786	56	17	3	9
20020803	61	20	3	10
20020812	58	18	3	9
20020826	60	20	3	10

ω = largura da célula

Grupo de 15 a 21 dias				
Registro	Dimensões		A	b
	l (μm)	ω (μm)	$\omega / 6$	$\omega / 2$
20020895	72	25	4	13
20020913	68	26	4	13
20020930	66	27	5	14
20020947	70	26	4	13
20020956	67	28	5	14
20020972	73	24	4	12

Adulto				
Registro	Dimensões		A	b
	l (μm)	ω (μm)	ω / 6	ω / 2
<i>20020004</i>	130	30,00	5	15
<i>20020020</i>	150	30,00	5	15
<i>20020038</i>	100	50,00	8	25
<i>20020070</i>	150	25,00	4	13
<i>20020362</i>	120	30,00	5	15
<i>20020376</i>	100	35,00	6	18