

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

Título

Caracterização quantitativa de fluxos de Ca^{2+} durante a contração de células cardíacas isoladas

Autor

JOSÉ LUIS PUGLISI *ck*

Orientador

PROF. DR. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI *ck*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por <u>JOSÉ LUIS PUGLISI</u>	
Aprovada pela Comissão	
Julgada em <u>15</u> / <u>09</u> / <u>97</u>	 Orientador

Campinas, Setembro 1997
S.P. - Brasil

P964c

32096/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	P964c
V.	Ex.
TOMBO BC/	32096
PROC.	281197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/11/97
N.º CPD	

CM-00102552-B

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

P964c Puglisi, José Luis
 Caracterização quantitativa de fluxos de Ca^{2+} durante a
 contração de células cardíacas isoladas / José Luis
 Puglisi. --Campinas, SP: [s.n.], 1997.

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

 1. Eletrofisiologia. 2. Cálcio. 3. Cardiologia. 4.
 Temperatura - Efeito fisiológico. 5. Modelamento
 matemático. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Em memória de meu Pai

"... Daqueles que temos perdido, que por azar o destino levou, a melhor parte permanece conosco. O tempo passado é nosso, e nada encontra-se em lugar mais seguro como o que foi. Na esperança do futuro, não valorizamos o que já possuímos, como se aquilo que virá, supondo que realmente aconteça, não tivesse que tornar-se imediatamente passado. Bem mesquinhamente estima a utilidade das coisas aquele que só se contenta com as presentes, também as futuras e as passadas podem nos alegrar, estas com as lembranças, as outras com a esperança. O futuro porém encontra-se em suspense e pode não acontecer, enquanto que o passado não pode deixar de ter sido.

Que loucura é essa de desprezar a única coisa que realmente nos pertence? Devemos nos rejubilar dos bens que já desfrutamos."

Sêneca (Cartas morais a Lucilo)

Dedico este trabalho a meu pai Pedro
e a minha mãe Enriqueta

Agradecimentos

Agradeço ao Prof Dr. José Wilson Magalhães Bassani, pelo seu apoio, e sua constante supervisão. Por ter ido além da tarefa de orientador e se convertido em um modelo a ser seguido.

Agradeço ao Prof. Dr. Donald M. Bers por ter me recebido na Loyola University Chicago onde desenvolvi a parte experimental desta tese e pelo suporte econômico durante minha estadia nos Estados Unidos.

A Dra. Eileen McCall, pelo seu permanente apoio e continua alegria nestes anos, sem a qual esta tese não poderia ter sido possível.

A Dra. Rosana A. Bassani, pela interação quotidiana, trocando idéias e fazendo sugestões.

Ao Dr. Marcelo Gurjão de Godoy pela sua amizade e companheirismo. Ao Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa pela sua ajuda invalorable durante a escrita desta tese. Ao Prof. Dr. Sérgio Santos Muhlen pela sua amizade e sugestões para esta tese. Aos amigos do Laboratorio : Sandro, Katherine, Paulo, Fabiana e Gilson. Aos demais professores, colegas e amigos do Departamento de Engenharia Biomedica. Aos colegas e amigos do Department of Physiology da Loyola University Chicago : Dr. Jörg Hueser, Dr. Kenneth Ginsburg, Dr. Tomas Shannon, Dr. Weilong Yuan, Dra. Li Li, Dr. Duraisami Balaguru, e Dr. Lars Maier, pela enriquecedora experiência de trabalhar juntos.

A minha família pelo seu continuo apoio através de todos este anos

Agradeço ao Governo do Brasil por possibilitar a realização do Curso de Pós-Graduação neste país, e ao CNPq pelo auxilio financeiro durante minha estada neste país pelo qual eu sou profundamente grato.

RESUMO

Foram avaliados os fluxos de cálcio que ocorrem durante o acoplamento excitação - contração no miócito isolado de coelho. O influxo de cálcio através dos canais de cálcio durante o potencial de ação foi medido usando a técnica de fixação de voltagem. A contribuição da troca Na/Ca para a entrada de cálcio foi calculada usando um modelo matemático. A participação relativa dos mecanismos de extrusão de cálcio (ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático, troca Na/Ca da membrana plasmática, bomba de cálcio do sarcolema e uniporter mitocondrial de cálcio) foram quantificadas usando contraturas de cafeína. Finalmente o efeito da temperatura sobre os mecanismos de transporte de cálcio foi analisado repetindo as medições a 25 e 35°C.

Os resultados mostram que, no miócito ventricular de coelho, a maior parte do influxo de cálcio provem dos canais de cálcio, enquanto que a troca Na/Ca fornece aproximadamente 25% do fluxo total de entrada.

Durante o relaxamento o retículo sarcoplasmático recapta cerca de 70% do cálcio, a troca Na/Ca extrai aproximadamente 25% e o restante é transportado pela bomba de cálcio do sarcolema e a mitocôndria. A temperatura acelera todos estes processos de transporte porém não afeta as suas contribuições relativas.

ABSTRACT

Ca fluxes during Excitation-Contraction Coupling were analyzed in rabbit ventricular myocytes. Ca influx through Ca channels during an action potential was measured using the voltage-clamp technique. The contribution of Na/Ca exchange to Ca influx was calculated using a mathematical model. The relative participation of the mechanisms by which Ca is extruded (Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase, Na/Ca exchange, Sarcolemmal Ca-ATPase and mitochondrial Ca uptake) were quantified using caffeine contractures. Finally the effect of temperature on these transport mechanisms was determined by repeating the measurements at 25 and 35°C.

The results show that, in rabbit ventricular myocytes, most of the Ca influx occurs via the Ca channels, whilst influx via Na/Ca exchange supplies approximately 25%. During relaxation SR reuptake accounts for about 70% and Na/Ca exchange for approximately 25% of the total amount of Ca removed, with the remainder transported via the Sarcolemmal Ca pump and the mitochondria. Although temperature accelerates all of these processes, their relative contributions to cellular Ca flux are not greatly altered.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	
Conceitos Básicos	1
Eventos do Acoplamento Excitação - Contração	5
Canais de Cálcio na Membrana	6
O Retículo Sarcoplasmático	7
A Troca Na/Ca	8
A bomba de Ca^{2+} do Sarcolema	9
As mitocôndrias	10
Capítulo 2 - Objetivos	13
Capítulo 3 - Material e Métodos	
Animais	15
Soluções	15
Isolamento de células	18
Medição de encurtamento celular	18
Medição de cálcio por fluorescência	19
Metodologia para obtenção dos transientes de cálcio	23
Medição do Potencial de Ação e da corrente de cálcio	25
Capítulo 4 - Resultados	
Entrada de cálcio no citosol	30
Entrada de cálcio através dos canais de cálcio	30
Entrada de cálcio através da troca Na/Ca	38
Remoção de cálcio do citosol	40
Encurtamento celular e transientes de cálcio	40
Curso temporal do relaxamento	42
Cálculo do fluxo de cálcio	43
Comparação entre espécies	45

Capítulo 5 - Discussão

Entrada de cálcio na célula	48
Entrada de cálcio através dos canais	49
Entrada de cálcio através da troca Na/Ca	57
Mecanismos de extrusão de cálcio	58
Inotropismo Hipotérmico	58
Sensibilidade à temperatura dos transportadores de cálcio	59
Contribuição relativa ao processo de relaxamento	59

Capítulo 6 - Bibliografia	62
---------------------------------	----

Capítulo 1

Introdução

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.

Albert Einstein.

Conceitos Básicos

A principal função do sistema cardiovascular é suprir oxigênio, nutrientes, vitaminas e hormônios para todas as células do organismo, e remover resíduos metabólicos, mantendo fluxo e pressão do fluido circulante (o sangue) adequados. O principal "motor" do sistema cardiovascular é o coração, órgão muscular localizado na cavidade torácica, no mediastino.

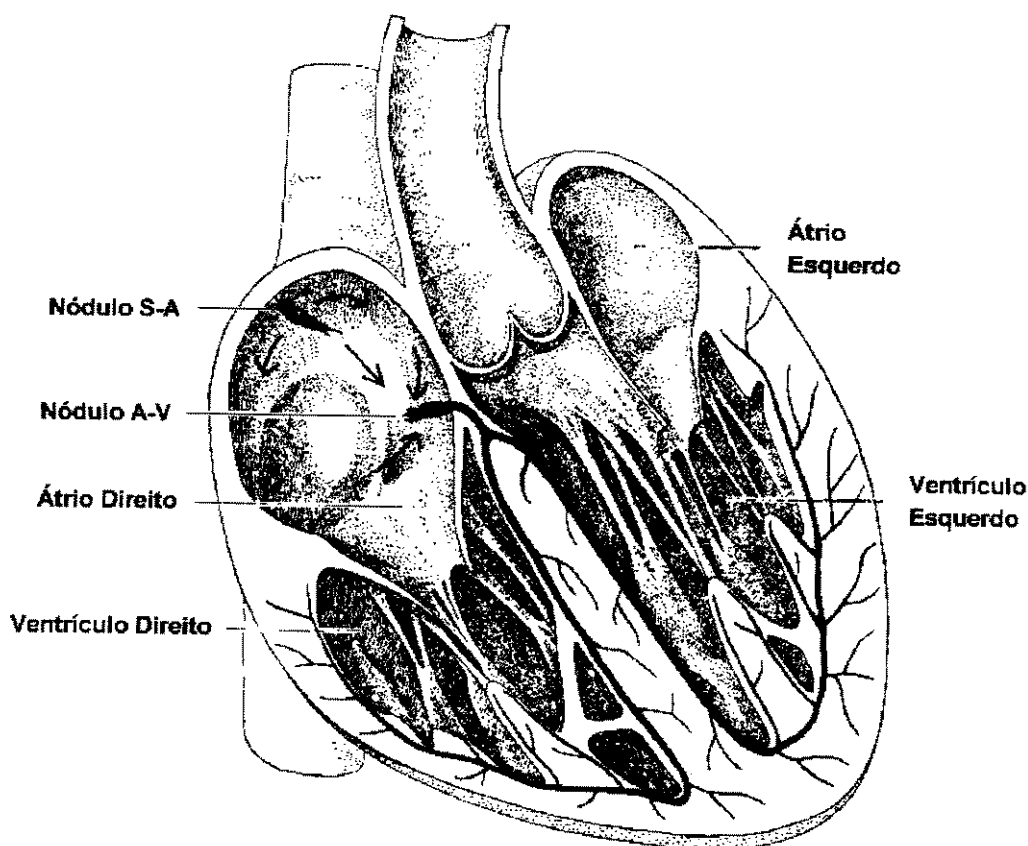


Fig 1.1. Diagrama esquemático do coração. Re-desenhado de Burton (1972)

O coração humano é dividido longitudinalmente em duas partes, direita e esquerda, cada uma delas constituída de duas câmaras, um átrio e um ventrículo (Fig. 1.1). As paredes dos átrios e dos ventrículos são compostas por camadas de músculo que são mantidas firmemente unidas e circundam completamente as cavidades cheias de sangue. Assim, quando as paredes de uma câmara se contraem, elas se aproximam, à

semelhança do fechamento de um punho, e desta maneira exercem pressão sobre o sangue nelas contidas. A propriedade de desenvolver contração é chamada de contratilidade. A contração (atividade mecânica) é desencadeada pela atividade elétrica das células cardíacas. Como toda célula excitável, a cardíaca possui a capacidade de mudar transitoriamente a diferença de potencial transmembrana (E_m) quando excitada por um estímulo adequado (excitabilidade). Esta resposta elétrica da célula é conhecida como potencial de ação (PA). No caso da célula cardíaca além da excitabilidade ela possui automatismo ou seja a capacidade de apresentar atividade elétrica espontânea. Apesar de todas as células poderem, em princípio, desenvolver atividade espontânea, existe uma divisão de tarefas ou especialização. Há células encarregadas de gerar a atividade elétrica inicial sincronizadora (as células marcapasso), localizadas na junção da veia cava superior com o átrio direito e outras encarregadas de gerar a contração (as células atriais e ventriculares). Para que o sinal elétrico se propague desde os átrios até o resto do coração de modo a gerar uma contração síncrona, existem também células especializadas na condução (as células do sistema His-Purkinje). A atividade elétrica é transmitida de uma célula para outra através de regiões de baixa resistividade (discos intercalares). De modo geral a condução segue a *teoria dos circuitos locais* (Sperelakis & Banks, 1993). Isto confere às células cardíacas a propriedade de condutibilidade. A atividade elétrica origina-se no nódulo sino atrial (S-A) e espalha-se pelos átrios até atingir o nódulo átrio ventricular (A-V), onde sofre um atraso antes de se propagar aos ventrículos através do feixe de His. O atraso sofrido no nódulo A-V permite que os átrios se contraíam antes dos ventrículos e com isso o sangue dos átrios possa fornecer um enchimento complementar aos ventrículos de maneira que, ao se contraírem, ejetem uma quantidade adequada de sangue (Guyton, 1988)

Na microscopia óptica, a célula muscular cardíaca apresenta zonas claras e escuras. Essas zonas se repetem ao longo de toda a célula. As regiões mais claras foram denominadas bandas I (isotrópicas) e as bandas adjacentes mais escuras, bandas A (anisotrópicas). Dividindo uma banda I em duas partes simétricas, observa-se uma linha escura denominada de linha Z (Fig. 1.2). As linhas Z delimitam as estruturas contráteis básicas do miócito cardíaco, os sarcômeros.

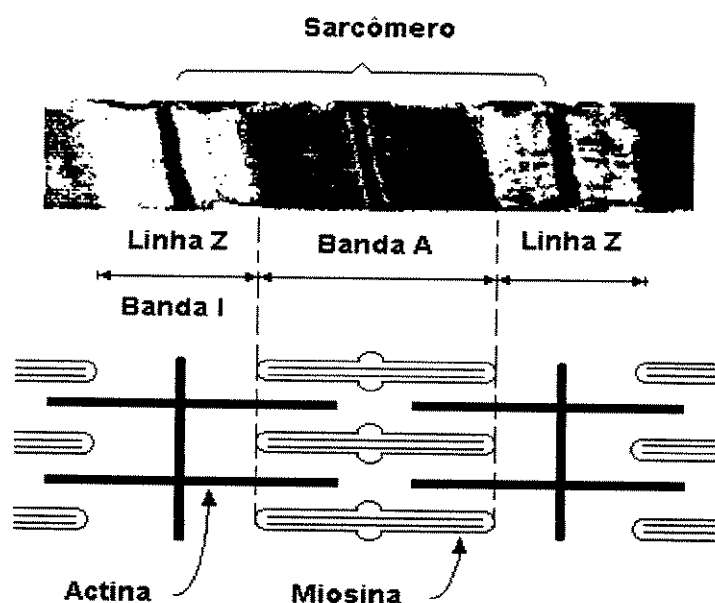


Fig 1.2 Estrutura do sarcômero. Microfotografia eletrônica e diagrama dos filamentos. Re-desenhado a partir de Sperelakis e Banks (1993).

Inserindo-se na linha Z e dirigindo-se para a região central do sarcômero, localizam-se os filamentos finos. Esses filamentos são agregados protéicos constituídos principalmente de actina. Na zona central, entremeados nos filamentos finos, encontram-se os filamentos grossos, também agregados protéicos, nos quais a principal proteína é a miosina. Os filamentos finos e grossos podem deslizar entre si por um sistema intrincado de ligações protéicas (pontes cruzadas), que desempenha um papel essencial na contração. A energia necessária para que se dê o deslizamento dos filamentos provém da hidrólise de ATP (trisfosfato de adenosina), ao nível das pontes cruzadas. Quando a concentração intracelular do íon cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) aumenta a nível dos miofilamentos, a interação actina-miosina é favorecida, e a partir da quebra de ATP, o encurtamento dos sarcômeros e, por conseguinte, da célula, é efetuado. O conjunto de eventos, desde a ocorrência do PA até o desenvolvimento da contração, é denominado genericamente de acoplamento excitação-contração (AEC).

Eventos do AEC

A figura 1.3 ilustra os principais componentes envolvidos no processo de AEC no músculo cardíaco de mamíferos.

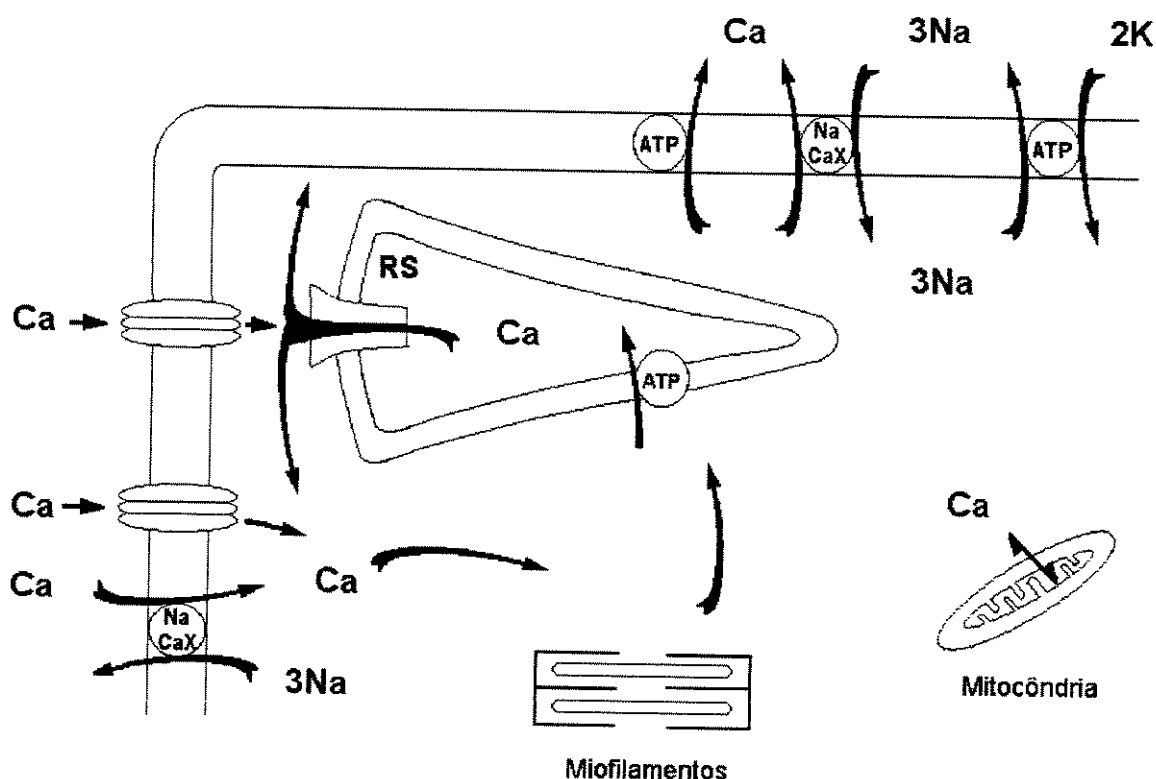


Figura 1.3 Diagrama esquemático dos componentes do AEC. O Ca^{2+} entra através dos canais e da troca Na/Ca . Ca^{2+} entrando pelos canais dispara a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} no Retículo Sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} é removido do citoplasma pela Ca-ATPase do RS e do sarcolema e pela troca Na/Ca (Re-desenhado a partir de Bers, 1991).

O Ca^{2+} entra na célula através de canais voltagem-dependentes, que são ativados durante um PA. Este influxo de Ca^{2+} também pode contar com uma contribuição secundária da troca Na/Ca . A entrada de Ca^{2+} ativa diretamente os miofilamentos, mas também produz o fenômeno de liberação de cálcio induzida pelo cálcio (Fabiato, 1983) no retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} liberado pelo RS (principal fonte de Ca^{2+} para a contração nos mamíferos) difunde-se para os miofilamentos, produzindo a interação da actina com a miosina, o que gera a contração. Para que o relaxamento aconteça, a

concentração do cálcio no citosol deve ser reduzida até os níveis de repouso (Bers, 1991). Esta remoção é efetuada pelo trabalho conjunto da recaptação de Ca^{2+} pela ATPase de cálcio do RS, da troca Na/Ca, da bomba de cálcio de sarcolema (SL-Ca-ATPase) e pelas mitocôndrias, estes dois últimos chamados de mecanismos lentos (Bassani *et al.*, 1994). A variação transitória de Ca^{2+} (transiente de cálcio) é responsável pela geração e controle da amplitude e duração da contração na célula cardíaca. A geração deste transiente de Ca^{2+} e sua cinética é o resultado do trabalho conjunto dos diferentes mecanismos de transporte de Ca^{2+} celular que serão resumidamente descritos a seguir.

Canais de Cálcio na Membrana

Os canais iônicos são proteínas presentes na membrana que permitem a passagem seletiva de um determinado íon em resposta a um estímulo elétrico, mecânico ou químico. Existe mais de um tipo de canal de Ca^{2+} (Glossmann & Striessnig, 1990): Canais do tipo-L, caracterizados por uma alta condutância (~ 25 pS em 110 mM Ba) tempo de abertura longo, sensibilidade a 1,4 - dihidropiridinas (DHPs) e ativação a potenciais relativamente "altos" (mais positivos do que o potencial de membrana de repouso, E_r). Canais tipo-T, possuem uma baixa condutância (~ 8 pS), aberturas breves do canal, insensibilidade a DHPs e ativação a potenciais mais negativos que E_r . Estes dois tipos de canais (L e T) estão presentes na fibra cardíaca (Pelzer *et al.*, 1990).

Os canais do tipo T são mais frequentes nas células atriais e nas fibras de Purkinje (Bean, 1985, Hirano *et al.*, 1989) sendo que seu papel funcional não é totalmente conhecido até agora. Acredita-se que possam estar envolvidos na função automática de células marcapasso. Canais do tipo L são mais abundantes nos ventrículos. Esses canais são sensíveis às DHPs, cuja maioria atua como antagonista de Ca^{2+} (e.g. nifedipina, nisoldipina, nitrendipina) (Bers, 1991).

A corrente através dos canais de Ca^{2+} tipo-L atinge o pico rapidamente (~ 5 ms) para depois reduzir-se (inativação) com um curso temporal mais lento (Pelzer *et al.*, 1990). Os processos de ativação e inativação podem ser modulados por vários fatores. A

ativação dos canais depende primariamente do potencial da membrana. Já a inativação inclui forte dependência do tempo e de $[Ca^{2+}]_i$ (Lee *et al.*, 1985). Esta característica faz com que a entrada de Ca^{2+} através dos canais seja modulada pelo próprio Ca^{2+} que entra pelo canal e o liberado pelo RS, provendo um sistema de retroalimentação negativa necessária, supostamente, para manter os níveis de cálcio nos limites fisiológicos (Sipido *et al.*, 1995, Grantham e Cannel, 1996).

O Retículo Sarcoplasmático (RS)

O RS é uma organela onde o Ca^{2+} é armazenado durante o relaxamento e diástole para ser liberado oportunamente a partir da entrada de Ca^{2+} através dos canais de membrana (o chamado “gatilho de cálcio”). Aparentemente, pode-se distinguir três regiões com diferenciações anatômicas e funcionais na estrutura desta organela. Uma se estende paralelamente aos sarcômeros (retículo longitudinal), com grande quantidade de bombas de Ca^{2+} que captam ativamente o íon do citosol para dentro do RS. Outra localiza-se próxima aos túbulos T (cisterna terminal). Finalmente há a parte da cisterna que está acoplada aos túbulos T (retículo juncional), que possui os chamados “pés” (“feet”) ou canais de liberação de cálcio (Fig. 1.4). Este último é conhecido também como o receptor de rianodina (RyR) devido à alta afinidade que apresenta por este alcalóide. Os canais de rianodina são maximamente ativados em resposta ao gatilho de cálcio que provem do sarcolema. A proximidade física do receptor de rianodina com os canais de cálcio privilegia o Ca^{2+} que flui através dos canais no processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . Durante e após a liberação, o RS atua recaptando Ca^{2+} e promovendo redução de $[Ca^{2+}]_i$. Dentro do RS encontra-se uma proteína de baixa afinidade e grande capacidade de ligação com o cálcio: a calsequestrina. Esta tem a função básica de aumentar a capacidade de armazenamento de Ca^{2+} (Bers, 1991).

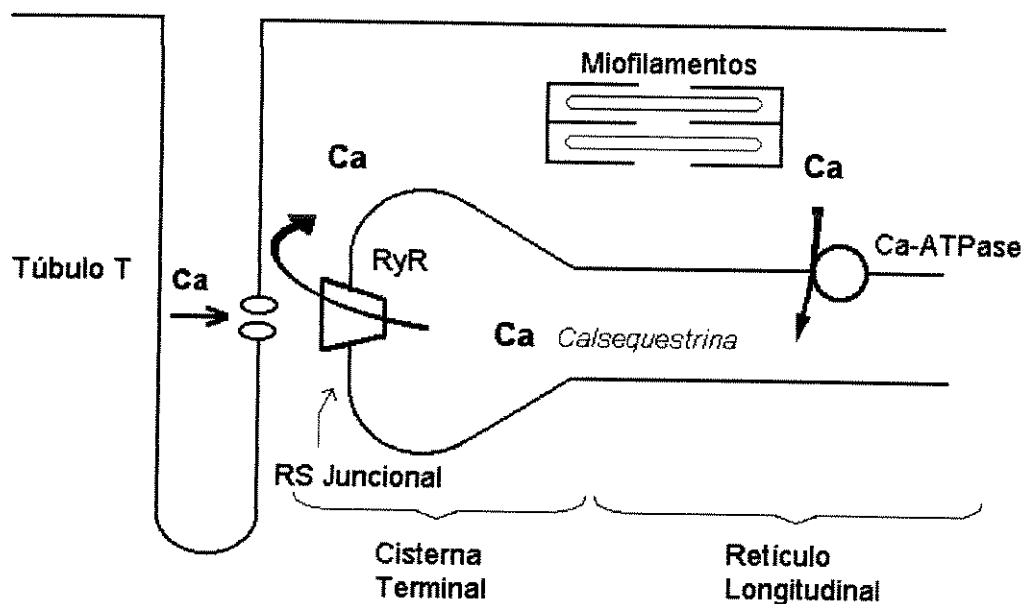


Figura 1.4 Diagrama esquemático do Retículo Sarcoplasmático (RS). O cálcio é transportado do citosol para dentro do RS pela ATPase de Ca^{2+} e é liberado na cisterna terminal através dos receptores de rianodina (RyR). Re-desenhado de Speralakis e Banks (1993).

A troca Na/Ca

Este é um mecanismo de contra-transporte que translada Ca^{2+} através da membrana, usando como fonte energética o gradiente de Na^+ (Mullins, 1977). Três íons de Na^+ entram na célula para cada íon de Ca^{2+} que é transportado para fora. Neste sentido, a troca Na/Ca é um mecanismo eletrogênico. O descobrimento deste mecanismo começou com as observações de aumento da força de contração da fibra cardíaca quando o cálcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) era aumentado ou quando o sódio era diminuído no meio extracelular ($[\text{Na}^+]_o$). Inicialmente pensou-se em um mecanismo pelo qual ambos os íons competiriam para cruzar a membrana, até que Reuter e Seitz (1968), propuseram a idéia de um mecanismo de contra-transporte no qual a entrada de Na^+ na célula estava acoplada com a saída de Ca^{2+} . A energia necessária para a transporte de Ca^{2+} provem do gradiente eletro-químico do íon Na^+ . O fluxo de cálcio pela troca Na/Ca depende, então, dos gradientes de concentração de Na^+ , e de Ca^{2+} e do potencial de membrana (Matsuoka e Hilgemann, 1992). Sob o ponto de vista termodinâmico, assumindo que 3

As mitocôndrias

Assim como a bomba de cálcio do sarcolema, as mitocôndrias fazem parte do que se denomina “sistemas lentos de transporte” (Bassani *et al.*, 1994). Mitocôndrias isoladas podem acumular quantidades grandes de cálcio, o que motivou alguns autores especular que estas organelas poderiam estar envolvidas na remoção de Ca^{2+} citoplasmático durante o relaxamento (Lehninger, 1974, Carafoli, 1975). Porém, em experimentos feitos em células intactas com o RS e a troca Na/Ca inibidos o relaxamento é da ordem de 40 s, o que é incompatível com o ciclo cardíaco normal. Bassani *et al.*, (1992) concluíram que a participação das mitocôndrias no relaxamento de uma contração fisiológica normal seria restrita a 1-2% do total do fluxo de Ca^{2+} . Isto faz supor que a sua contribuição não é apreciável em condições fisiológicas normais. Sabe-se que as mitocôndrias podem armazenar Ca^{2+} durante condições patológicas, tais como isquemia, quando o nível de Ca^{2+} citosólico é alto (Shanne *et al.*, 1979), funcionando como um mecanismo de proteção celular pois a sobrecarga de Ca^{2+} mantém o consumo de ATP alto. No entanto, se o Ca^{2+} não voltar aos valores normais, o acúmulo de Ca^{2+} nas mitocôndrias pode comprometer a produção de ATP, criando-se um ciclo vicioso que pode comprometer a sobrevivência da célula (Bers, 1991).

Vemos então que $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é regulada por distintos mecanismos. A participação de cada um deles difere na quantidade de cálcio transportado e na velocidade de transporte (Bassani *et al.*, 1992, 1994). Em condições normais e em estado estacionário, a quantidade de Ca^{2+} que entra na célula durante o PA deve ser igual à quantidade transportada para fora da célula durante o relaxamento. Do contrário, haveria depleção ou acúmulo do íon no citosol, o que poderia comprometer seriamente o desempenho contrátil da célula, ou mesmo, produzir dano irreversível.

A busca do entendimento e da quantificação dos mecanismos de transporte de Ca^{2+} no músculo cardíaco tem sido intensa, em especial no nosso laboratório. Vários trabalhos têm caracterizado o processo de relaxamento celular (Bers e Bridge, 1989, Bassani *et al.*, 1992, 1994,) e alguns aspectos do transporte de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para dentro das células do coração (Delbridge, *et al.*, 1996). No presente trabalho procuramos preencher algumas lacunas existentes na literatura quanto ao conhecimento destes mecanismos.

Reestudamos o transporte e a participação relativa dos transportadores, já detalhadamente descritas para diferentes espécies (Bassani *et al.*, 1992, 1994) a temperatura ambiente (23°C), quantificando os transportes em uma temperatura próxima da fisiológica (35°C) e analisando a participação relativa dos transportadores. Outro aspecto de destaque neste trabalho foi a abordagem quantitativa criteriosa para medição do influxo de Ca^{2+} durante a ativação do miócito cardíaco. Neste particular, procuramos reunir abordagens já utilizadas por outros pesquisadores em um único experimento. Calculamos a quantidade de íons Ca^{2+} que entra na célula durante um PA, usando um gabarito de PA como sinal de comando para fixação de tensão ("voltage clamp"), procurando bloquear correntes contaminantes (em especial a corrente de cloreto) e efetuando os experimentos a 35°C. Os resultados obtidos puderam fornecer ainda novas idéias para avanço do conhecimento do mecanismo de AEC, além de dados quantitativos que poderão servir de referência e de parâmetros para melhorar modelos matemáticos já em desenvolvimento.

Capítulo 2

Objetivos

A intuição, não testada e não comprovada,
é uma garantia insuficiente da verdade

Bertrand Russel, "Mysticism and Logic"

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o influxo de cálcio durante um potencial de ação procurando controlar o maior número possível de variáveis e aproximando na medida do possível a condição fisiológica. Além disso avaliamos o efluxo de cálcio durante uma contração normal. A contribuição proporcional de cada mecanismo de transporte de cálcio foi comparada a 25°C e 35°C para avaliar o efeito da temperatura na participação relativa de cada um deles.

Capítulo 3

Material e Métodos

Devemos estar alertas contra a tentação poderosa de procurar as evidências que estão a favor de nossos desejos, e desconsiderar as que lhes fazem oposição. Todo preceito de bom senso exige exatamente o oposto.

Michael Faraday

Animais

Foram utilizados coelhos, furões e gatos provenientes do biotério da Loyola University of Chicago - Department of Physiology. Os animais foram alojados em gaiolas recebendo água e ração "ad libitum" e não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

Soluções

Soluções Externas

Nesta seção todos os valores das concentrações estão apresentados em mM.

Normal Tyrode (NT)

140 cloreto de sódio (NaCl), 6 cloreto de potássio (KCl), 2 cloreto de cálcio (CaCl_2), 1 cloreto de magnésio (MgCl_2), 10 glicose, 5 N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etano sulfônico (Hepes). O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de sódio (NaOH) à temperatura ambiente (23°C) e à temperatura de 37°C.

Normal Tyrode com 10 mM cafeína (CaffNT)

140 cloreto de sódio (NaCl), 6 cloreto de potássio (KCl), 2 cloreto de cálcio (CaCl_2), 1 cloreto de magnésio (MgCl_2), 10 glicose, 5 Hepes, 10 cafeína. O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de sódio (NaOH) à temperatura ambiente e à temperatura de 37°C. Esta solução foi utilizada para produzir uma contratura no miócito.

Tyrode sem Na e sem Ca (0Na0Ca)

140 cloreto de lítio (LiCl), 6 cloreto de potássio (KCl), 1 cloreto de magnésio (MgCl_2), 10 glicose, 5 Hepes. O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de potássio (KOH) a temperatura ambiente e à temperatura de 37°C. Esta solução foi utilizada para inibir a participação da troca Na/Ca e/ou depletar o conteúdo intracelular de Na^+ no miócito.

Tyrode sem Na e sem Ca com 10 mM cafeína (Caff00)

140 cloreto de lítio (LiCl), 6 cloreto de potássio (KCl), 1 cloreto de magnésio (MgCl₂), 10 glicose, 5 Hepes, 10 Cafeína. O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de sódio (KOH) à temperatura ambiente e à temperatura de 37°C. Esta solução foi utilizada para produzir contratura inibindo a participação da troca Na/Ca.

Tyrode sem Na e 2mM Ca (0Na2Ca)

140 cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl), 6 cloreto de cério (CsCl₂), 1 cloreto de magnésio (MgCl₂), 2 cloreto de cálcio (CaCl₂), 10 glicose, 10 Hepes. O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de tetraetilamônio (TEA-OH) à temperatura ambiente e à temperatura de 37°C.

Nesta solução o íon sódio foi substituído por TEA, que também é um bloqueador de canais de potássio, e potássio foi substituído por cério. Esta solução foi utilizada para a medição das correntes de cálcio sem a contaminação das correntes de sódio ou de potássio. Para bloquear a corrente de cloreto foi adicionado 0.2 mM de 4,4'-diisotiocianetostilbene - 2,2'-ácido disulfônico (DIDS).

Tyrode sem potássio e 10mM cafeína (CaffNT)

140 cloreto de sódio (NaCl), 6 cloreto de cério (CsCl₂), 2 cloreto de cálcio (CaCl₂), 1 cloreto de magnésio (MgCl₂), 10 glicose, 5 Hepes, 10 cafeína. O pH foi ajustado para 7.4 com hidróxido de sódio (NaOH) à temperatura ambiente e à temperatura de 37°C.

Solução para determinar R_{min}

10 cloreto de sódio (NaCl), 130 cloreto de potássio (KCl), 1 cloreto de magnésio (MgCl₂), 5 ácido etilenoglicol-bis N, N, N', N' - tetraacético (EGTA), 5 Hepes. O pH foi ajustado para 7.2 com hidróxido de sódio (NaOH) à temperatura ambiente.

Solução para determinar R_{max}

10 cloreto de sódio (NaCl), 130 cloreto de potássio (KCl), 1 cloreto de magnésio (MgCl₂), 2 cloreto de cálcio (CaCl₂). O pH foi ajustado para 7.2 com hidróxido de sódio (NaOH) à temperatura ambiente.

As trocas das soluções foram feitas através de válvulas solenóides (LFAA 1201618H, Lee, Co. CT, USA) localizadas próximo ao *set-up* experimental. A temperatura foi mantida com um banho aquecido, e monitorada com um termopar localizado diretamente na câmara de perfusão. Trabalhou-se em 25 e 35°C porque são valores próximos à temperatura ambiente e à temperatura corporal, respectivamente. Além disso, estes valores dos parâmetros medidos nos permitem calcular diretamente o Q₁₀ (aparente) dos mecanismos estudados.

Soluções de pipeta

Solução para medir PA

30 cloreto de potássio (KCl), 110 aspartato de potássio, 8 cloreto de sódio (NaCl), 5 Hepes. O pH foi ajustado para 7.2 (~ pH intracelular) com hidróxido de potássio (KOH) à temperatura ambiente.

Solução para medir correntes de Ca²⁺

80 sulfato de cério (CsSO₄), 55 cloreto de cério (CsCl), 10 cloreto de magnésio (MgCl₂), 10 Hepes, 0.1 EGTA. O pH foi ajustado para 7.2 com hidróxido de cério (CsOH) à temperatura ambiente.

Isolamento de células

Foram usadas principalmente, células de coelho, porém em certos casos para efeitos de comparação entre espécies trabalhou-se também com células de gato e de furão. As células foram isoladas segundo descrito por Bassani *et al.* (1992). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (70 mg/kg iv para o coelho e ip para o furão; 50 mg/kg para o gato). O coração extraído foi colocado em um sistema de Langendorff onde foi perfundido com solução de Tyrode, sem Ca^{2+} , por 6 min a 37°C (fluxo de 20 ml min⁻¹). Em seguida mudou-se de perfusão para a mesma solução contendo 1mg ml⁻¹ de collagenase Tipo B (Boehringer Mannheim) e 0,16 mg ml⁻¹ pronase (Boehringer Mannheim). A perfusão continuou até o coração ficar flácido (~20 - 40 min). A seguir o tecido ventricular foi dissociado e filtrado. As células em suspensão foram lavadas repetidas vezes com um aumento gradual de Ca^{2+} até chegar a 2 mM. Finalmente, as células foram colocadas em câmaras de superfusão de acrílico nas quais o fundo era formado por uma lamínula tratada com laminina (Gibco, Grand Island, NY, EEUU) para aumentar a adesão celular

Medição de encurtamento celular

Diante da dificuldade de se conectar uma célula isolada a um transdutor de força, optou-se por filmar a célula e processar o sinal de vídeo medindo-se o encurtamento ao invés da força. Quando observada através do microscópio, a borda da célula contrasta com o fundo branco da preparação. O princípio desta técnica consiste na detecção deste ponto de maior contraste em uma linha do sinal de vídeo e gerar uma voltagem proporcional ao deslocamento deste ponto. Neste trabalho usou-se um instrumento para detecção de borda de vídeo (DBV, Crescent Electronics, Sandy, Utah, EUA) conectado a um microcomputador através de uma interface (TL-1, Axon Instruments Inc., California, EUA). O programa AXOTAPE 2.0 (Axon Instruments Inc.) foi usado para processar o sinal, mostrando-o na tela do computador, permitindo também fazer medições tais como duração do encurtamento, tempo para atingir o pico e valor máximo de encurtamento. A calibração dos valores de encurtamento foi realizada com uma grade-padrão com marcas

a cada 10 μm . O sinal de vídeo era gravado em fita para, caso necessário, se efetuar análise "off line". A disposição dos equipamentos foi a seguinte (Fig. 3.1):

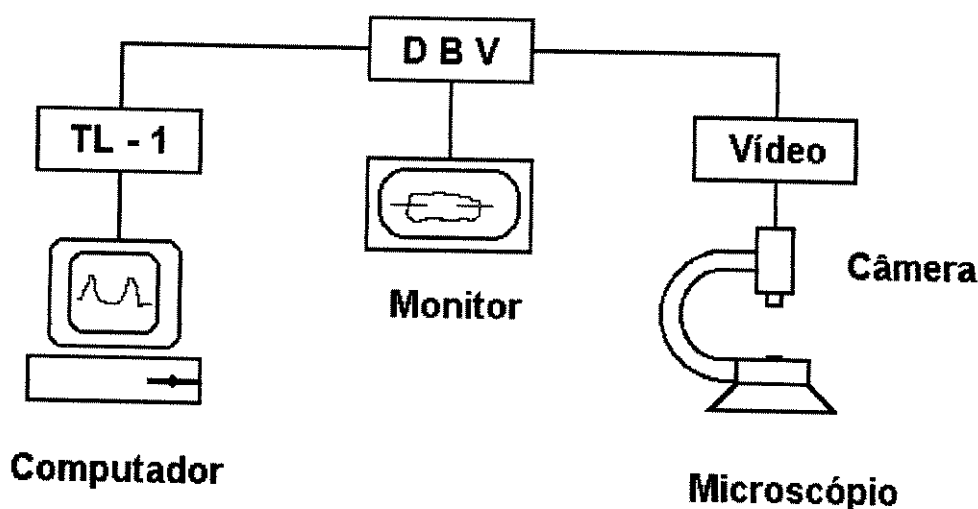


Figura 3.1 A célula é filmada por meio de uma câmera de vídeo. A imagem passa pelo detector de borda de vídeo (DBV) onde o encurtamento é transformado em um sinal de voltagem que é enviado ao microcomputador. Na tela do monitor, a célula é observada, e na tela do microcomputador o encurtamento é monitorado.

Medição de cálcio por fluorescência

Descrição do protocolo e setup experimental

As células foram carregadas com o indicador fluorescente de cálcio (indo-1) segundo o descrito por Bassani *et al.* (1995a). As células foram incubadas com a forma ester acetoximetílica do indicador (indo-1 AM) por 15 min à temperatura ambiente. Nesta forma o indicador se difunde para dentro da célula devido à sua lipossolubilidade. Uma vez no meio intracelular, o composto é deesterificado e na forma ácida (que não é permeante), permanece retido na célula. Em seguida as células foram perfundidas por 40 minutos para a lavagem do indicador que estava fora da célula e para a permitir a deesterificação do composto.

A disposição geral dos equipamentos está ilustrada na figura 3.2. Excitava-se a preparação no comprimento de onda de 365 nm (selecionado a partir do iluminador UV por um monocromador) e captava-se em 405 (λ_1) e 485 (λ_2) nm (filtros de interferência 5 e 6 na figura 3.2) por dois tubos fotomultiplicadores (PMT, Photon Technology Inc.-PTI, California, EUA). O sinal das PMTs passava ao microcomputador onde era processado pelo programa OSCAR 2.0 da PTI.

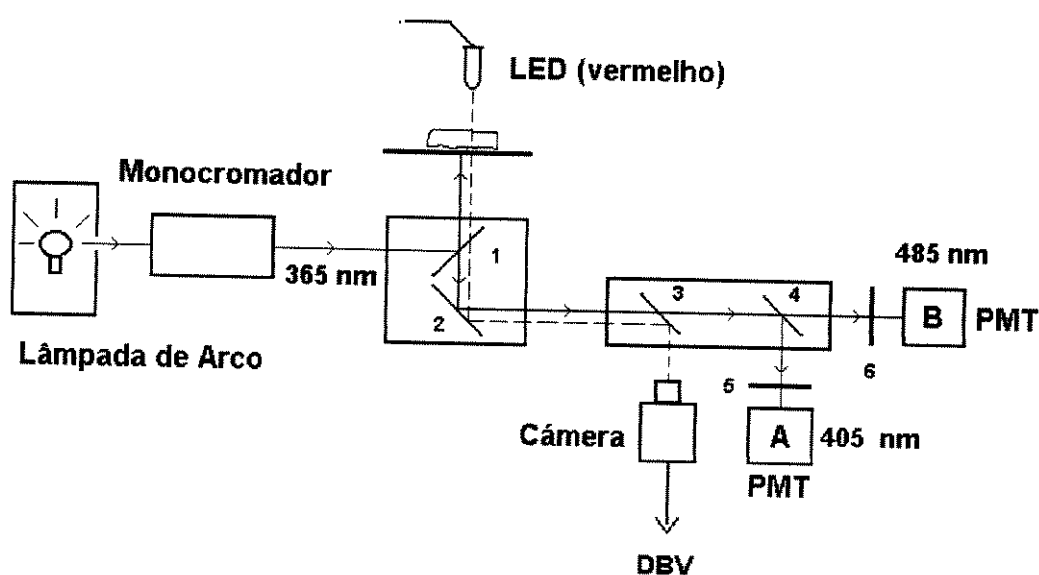


Figura 3.2 Esquema geral da disposição dos equipamentos para medição de fluorescência. Uma lâmpada de arco de 75 W fornece a luz UV. Essa luz passa por um monocromador que seleciona o comprimento de onda de 365 nm. Um espelho dicróico (1) com frequência de corte nos 380 nm reflete a luz para a célula carregada com Indo-1. A fluorescência emitida pela célula acima dos 380 nm passa pelo espelho dicróico e se reflete no prisma (2) para as PMTs. Um outro espelho dicróico (4) com frequência de corte em 455 nm reflete os comprimentos abaixo de 455 nm para a PMT A e deixa passar os comprimentos acima de 455 nm para a PMT B. Na entrada de cada PMT filtros de interferência (5 e 6) selecionam os comprimentos de onda 405 ± 10 nm e 485 ± 10 nm emitidos pela célula. Para poder visualizar a célula, esta era iluminada com um LED (light emitting diode) vermelho (660 nm). Um filtro com corte em 600 nm (3) desvia a luz para uma câmera sensível a esse comprimento de onda, a imagem assim obtida é alimentada ao detector de borda de vídeo descrito previamente. Este sistema permite a medição simultânea de $[Ca^{2+}]_i$ e encurtamento celular.

Cálculo da concentração intracelular de cálcio

A razão dos sinais das PMTs foi convertida em valores de $[Ca^{2+}]_i$ usando a equação proposta por Grynkiewicz *et al.*, (1985):

$$[Ca]_i = K_d \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \quad (3.1)$$

Onde K_d é a constante de dissociação do indo-1, β é a razão das leituras de fluorescência no comprimento de onda λ_2 para o valor máximo e o valor mínimo de Ca^{2+} , R_{min} é o valor da razão das fluorescências para Ca^{2+} nulo, R_{max} a razão que se obtém quando todo o indo-1 encontra-se saturado de Ca^{2+} , e R é o valor da razão (λ_1/λ_2) das leituras das fluorescências.

Correção pela auto fluorescência

Um dos problemas da excitação UV é que ela induz aparecimento de fluorescência de alguns compostos intracelulares (auto-fluorescência) tais como a NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo, reduzida). Essa auto-fluorescência interfere com a medição a ser feita, sendo necessária uma correção dos valores obtidos antes de aplicar a equação para o cálculo do Ca^{2+} intracelular. O caso ideal seria medir a auto-fluorescência da célula a ser utilizada antes de carregá-la com indo-1. Na prática, isto é muito difícil, dado que se necessita identificar a posição das células antes e depois do carregamento com indo-1. Para contornar este problema, medimos a auto-fluorescência de 10 células e suas respectivas dimensões (largura x comprimento) antes de começar o experimento. Uma vez terminado o protocolo experimental, os valores de fluorescência seriam corrigidos levando-se em consideração o tamanho de célula e os respectivos valores de auto-fluorescência (Fig. 3.3). Em nossa experiência a correlação entre o tamanho e auto-fluorescência não foi significativa ($r^2 = 0.09$, $p > 0.05$). Optamos então por usar o valor médio das medições.

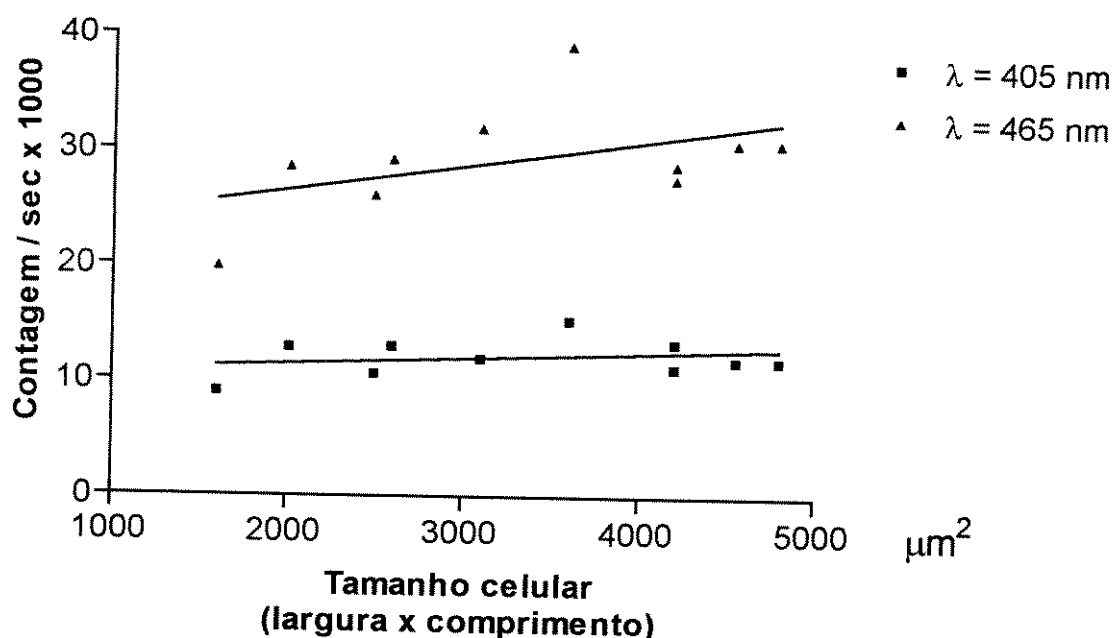


Figura 3.3 Valor da auto fluorescência em função da tamanho celular (largura x comprimento). O valor da correlação r^2 foi 0.09 optou-se por usar o valor médio das 10 células.

Calibração

Determinação de $R_{\min}$ e $R_{\max}$

Para cálculo de $[Ca^{2+}]_i$ a partir de R , é preciso conhecer os valores de $R_{\min}$ e $R_{\max}$ obtidos *in vivo*. A presença de proteínas celulares pode alterar os valores de fluorescência com relação aos medidos *in vitro* (Hove-Madsen & Bers, 1992; Bassani *et al.*, 1995a). Deste modo foi necessário obter os valores de $R_{\max}$ e $R_{\min}$ *in vivo* (Bassani *et al.*, 1994a). Após carregar as células com indo-1 a solução de perfusão (solução NT) foi trocada por uma solução sem Ca (solução $R_{\min}$). Durante 20 min as células foram tratadas com 3 μ M de p-trifluoro-metoxicarbonil ciano fenil hidrazina (FCCP, Sigma) e 10 mM 2-desoxiglicose para produzir inibição metabólica evitando assim a contratura da célula. Posteriormente se acrescentava à solução 10 μ M de BrA- 23187 (Calbiochem, La Jolla, California, EUA) um ionóforo de Ca^{2+} não fluorescente que permitia o equilíbrio do $[Ca^{2+}]$ da solução externa com o interior da célula. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda λ_1 (405 nm) e λ_2 (485nm). Obtendo-se os valores de $R_{\min}$ (sem correção da auto-fluorescência), mudava-se para outra solução contendo 2 mM $CaCl_2$ (Solução $R_{\max}$) e mediam-se os valores de $R_{\max}$ (também sem correção da auto-

fluorescência). Para corrigir essas leituras, levou-se em consideração que a combinação de FCCP, 2-deoxiglicose e BrA-23187 poderia afetar os componentes intracelulares responsáveis pela autofluorescência, especialmente do NADH. O protocolo foi repetido na ausência do indo-1 para obtenção dos valores da auto-fluorescência nas mesmas condições intracelulares em que foram obtidas as medições de $R_{\min}$ e $R_{\max}$. Feita a correção, os valores encontrados foram $R_{\min} = 0.214 \pm 0.009$ e $R_{\max} = 0.732 \pm 0.172$ (n=7)

Determinação de Kd e β

O valor de Kd foi obtido *in vitro* nas duas temperaturas de trabalho (25 e 35°C). Bers *et al.* (1989) mostraram que a temperatura afeta a afinidade do Indo-1 pelo Ca^{2+} porém não muda os valores de $R_{\min}$ e $R_{\max}$. Soluções com concentrações padrões de Ca^{2+} de 10 nM a 10 mM foram usadas para obtenção de uma curva de calibração *in vitro*. Obteve-se $\beta = 4.7$ e $K_d = 441 \pm 9$ nM e 395 ± 13 nM para 25 e 35°C respectivamente. A rigor o parâmetro Kd deveria ser obtido *in vivo*, uma vez que tem sido mostrado que Kd é afetado pela presença de proteínas (Hove Madsen e Bers, 1993), no obstante as dificuldades experimentais são extremadamente grandes (Bassani *et al.*, 1995).

Metodologia para a obtenção dos transientes de cálcio

Contraturas de cafeína

Seguiu-se metodologia descrita anteriormente (Bassani *et al.*, 1992; Puglisi *et al.*, 1996). As células foram equilibradas em solução NT por 10 min a 35°C e estimuladas por campo elétrico (0.5 Hz, amplitude 1.2 limiar). Uma vez atingido o equilíbrio, uma contração (encurtamento e transiente de Ca^{2+}) foi registrada. A seguir, a estimulação foi interrompida e a solução do banho trocada para a solução CaffNT. A presença de cafeína (10mM) induz a liberação de Ca^{2+} pelo RS e impede a recaptação do Ca^{2+} por esta organela, resultando em uma contratura que decai apenas lentamente durante a exposição à cafeína. Para cada contratura foram registrados o encurtamento celular e o

transiente de Ca^{2+} . Ao final do relaxamento, as células foram novamente perfundidas com a solução NT por ~1 min antes de reiniciar a estimulação elétrica. Um período de 5 min foi observado para a recuperação da célula. Uma vez reestabelecido o estado de regime, a estimulação foi interrompida novamente e aplicada a solução 0Na0Ca, por 15 s, antes de aplicar a solução Caff00. Em seguida produzia-se novamente uma contratura na célula registrando-se também o encurtamento e o transiente de Ca^{2+} . Após o relaxamento, a célula foi lavada em NT por ~1 min e o mesmo tempo de recuperação (5 min) foi aguardado. Uma vez obtidas as duas contraturas de cafeína e a contração em NT, a temperatura do banho foi mudada e todo o protocolo foi repetido.

Método analítico para cálculo dos fluxos de cálcio no relaxamento

Durante uma contração normal do miócito cardíaco todos os sistemas de remoção de Ca^{2+} estão operantes. Durante a contratura produzida pela aplicação de CaffNT, assumimos que o principal mecanismo de remoção de Ca^{2+} é a troca Na/Ca. Por outro lado, na contratura produzida pela solução de Caff00, a troca Na/Ca fica inoperante, sendo o relaxamento resultante da extrusão de Ca^{2+} pela bomba de Ca^{2+} do sarcolema e pela captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias. Para o cálculo dos fluxos de Ca^{2+} devido a cada sistema, seguiu-se a metodologia descrita por Bassani *et al.* (1994a). Neste caso assumimos que o Ca^{2+} rapidamente atinge o equilíbrio com os *buffers* de Ca^{2+} passivos dentro da célula, resultando como Ca^{2+} total:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}$$

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

$$+ B_{\text{max1}} / (1 + (K_1 / [\text{Ca}^{2+}]_i)) + B_{\text{max2}} / (1 + (K_2 / [\text{Ca}^{2+}]_i)) + [\text{indo-1}]_i / (1 + (K_{\text{indo}} / [\text{Ca}^{2+}]_i)) \quad (3.2)$$

onde B_{max1} , B_{max2} , K_1 , K_2 são constantes empíricas de ligação passiva de Ca^{2+} a *buffers* intracelulares obtidas por Hove-Madsen & Bers (1993). O último termo representa o $[\text{Ca}^{2+}]$ ligado ao indo-1 intracelular, assumindo $[\text{indo-1}]_i = 50 \mu\text{M}$ e $K_{\text{indo}} = 250 \text{ nM}$ (Bassani *et al.*, 1994a). A partir deste ponto podemos calcular as concentrações de Ca^{2+}

total em função de Ca^{2+} livre. Diferenciando a expressão para o Ca^{2+} total, o fluxo total de Ca^{2+} fica dado por:

$$d [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} / dt = J_{\text{RS}} + J_{\text{NaCa}} + J_{\text{lentos}} + L \quad (3.3)$$

onde o fluxo total é constituído por fluxos devido ao RS, à troca NaCa, e aos mecanismos lentos (bomba de Ca^{2+} do sarcolema e mitocôndrias) além de uma perda L (leak) constante, assumida independente dos outros sistemas.

J_{RS} , J_{NaCa} e J_{lentos} podem ser representados como um mecanismo Ca^{2+} -dependente da seguinte forma:

$$J = V_{\text{max}} / 1 + (K_m / [\text{Ca}^{2+}]_i)^n \quad (3.4)$$

O decaimento do transiente de Ca^{2+} durante a contratura em Caff00 é devido aos mecanismos lentos. Ajustando essa curva para J_{lentos} obtivemos os valores de V_{max} (velocidade máxima), K_m (constante de Michaelis-Menten) e n (coeficiente de Hill) para J_{lentos} . Em seguida esses valores foram usados para cálculo de J_{NaCa} com o decaimento do transiente obtido durante a contratura em CaffNT. Esta última será devido a contribuição de $J_{\text{NaCa}} + J_{\text{lentos}}$. Como já foi calculado J_{lentos} , somente nos resta como incógnita J_{NaCa} , e podemos assim obter os valores de V_{max} , K_m e n para a troca NaCa. Por último, no decaimento do transiente temos os tres mecanismos atuando simultaneamente ($J_{\text{RS}} + J_{\text{NaCa}} + J_{\text{lentos}}$) porém já conhecemos J_{NaCa} do passo anterior e J_{lentos} a partir do primeiro cálculo, restando somente J_{RS} . Uma vez obtidos os parâmetros V_{max} , K_m e n para todos os mecanismos podemos calcular a contribuição de cada um deles para o fluxo total durante um transiente de Ca^{2+} .

Medição de potenciais de ação e correntes de cálcio

Generalidades

O potencial de ação e as correntes de Ca^{2+} foram medidos usando as técnicas de fixação de corrente ("current clamp") e fixação da voltagem ("voltage clamp"), respectivamente, na variante "*whole cell patch*" perfurado por anfotericina (Yuan *et al.*, 1996). O amplificador utilizado foi o Axopatch 1-C conectado a um microcomputador através da interface modelo TL-1 (Axon Instruments Inc., USA). Os dados foram processados utilizando-se o programa pClamp6 (Axon Instruments Inc., USA). Para a medição dos PAs foi também utilizado um estimulador elétrico externo (Grass mod S40, USA). A figura 3.4 ilustra a disposição dos equipamentos.

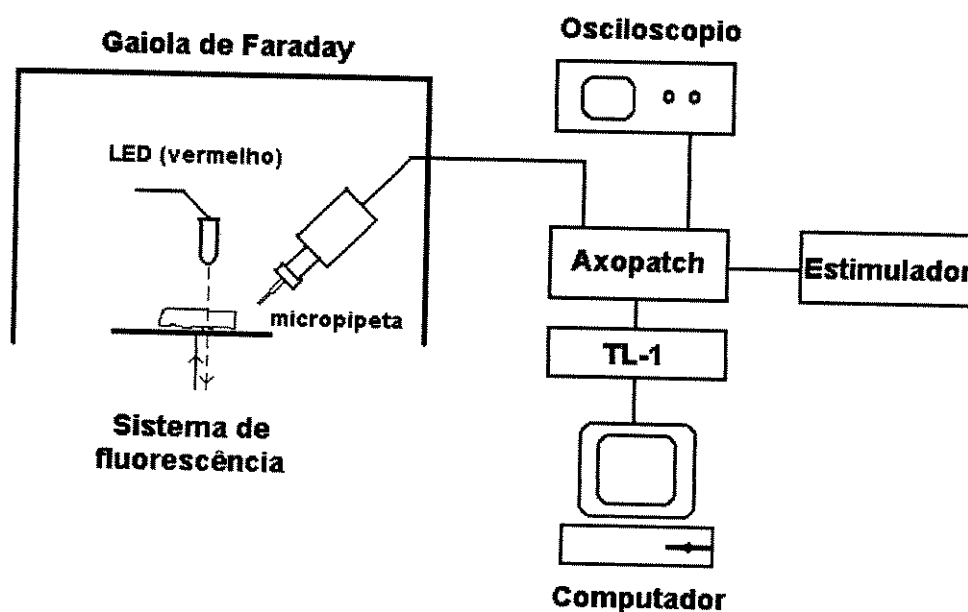


Figura 3.4 Diagrama esquemático do set-up para patch-clamp. O pré-amplificador da micropipeta foi conectado a um micromanipulador para aproximação a célula. O estimulador externo é utilizado no protocolo de "current clamp". Este set-up se complementa com a medição de fluorescência e detecção de borda de vídeo (não mostrados), sendo possível medir simultaneamente corrente, transiente de $[\text{Ca}^{2+}]$ e encurtamento celular

Medição do PA

Protocolo Experimental

Os experimentos foram feitos com base na metodologia descrita em Yuan *et al.* (1996). Utilizou-se *patch* perfurado por anfotericina (200µg/ml). Uma vez obtido acesso ao meio intracelular, estimulou-se a célula por meio de um estimulador externo com pulsos supra-limíares de 5 ms de duração, 0.5 Hz, até disparar um PA. Uma vez em estado de regime, PAs foram adquiridos e armazenados em computador. Em seguida mudava-se para a uma solução semelhante porém a outra temperatura, e obtinham-se PAs na mesma célula porém a diferente temperatura. Foram promediados os PAs de 7 células e com base nestes valores gerou-se uma forma de onda-padrão (gabarito).

Medição das correntes de Ca usando o PA como gabarito de voltagem

("Action Potential Clamp - AP clamp")

Uma vez obtidos os gabaritos dos PAs nas diferentes temperaturas, estes foram utilizados como tensão de comando para os protocolos de AP-clamp (Doerr *et al.*, 1990, Arreola *et al.*, 1991). Para garantir que estávamos medindo unicamente a corrente de $[Ca^{2+}]$, sódio e potássio foram substituídos por lítio e cério, respectivamente, sendo feitas as medições em uma solução de Tyrode sem Na e sem K com 2mM Ca (Solução 0Na2Ca). Nesta solução as células poderiam entrar em uma contratura irreversível devido ao influxo de Ca^{2+} pela troca Na/Ca no modo reverso. Para evitar este problema, foi necessário inicialmente depletar o sódio intracelular. Isto foi conseguido pela perfusão das células com solução de Tyrode sem Na^+ nem Ca^{2+} (Solução 0Na0Ca) por um período de 20 min. (Bassani *et al.*, 1992). Nesta condição foi possível trocar a solução do banho para a solução 0Na2Ca sem o perigo da ocorrência de contratura, e nesta solução foi efetuado o *patch-clamping* (Fig. 3.5).

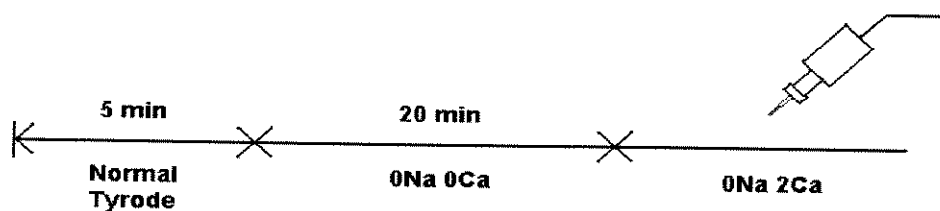


Figura 3.5 Diagrama das trocas das soluções prévias ao clampeamento. Por 5 min as células foram perfundidas em Tyrode normal e depois pela solução 0Na0Ca por 20 min (durante esse tempo a bomba de Na/K depleta o Na intracelular) finalmente as células foram perfundidas com 0Na2Ca e então realizada a operação de patch-clamping.

Uma curva I-V foi levantada antes da aplicação do AP-clamp para verificar se estávamos medindo realmente a I_{Ca} (corrente de Ca^{2+} via canais voltagem-dependentes, tipo L). Se não houvesse indícios de contaminação em nossas medições, os PAs eram aplicados para obtenção de I_{Ca} . Em seguida a perfusão do banho foi mudada para a mesma solução porém à outra temperatura e todo o processo (Curva I-V e PA-clamp) foi repetido. Antes de cada protocolo um pulso de cafeína foi aplicado para depletar o RS de Ca^{2+} , o que garantiu que todos os experimentos começassem com o RS depletado (Fig. 3.6).

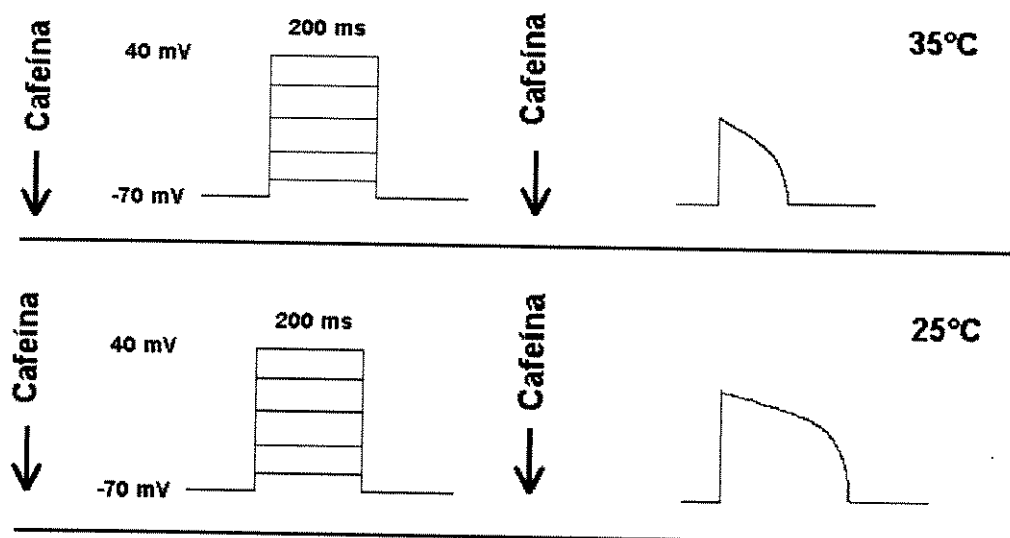


Figura 3.6 Protocolo usado na obtenção das correntes de $[Ca^{2+}]$. Aplicava-se um pulso de cafeína para esvaziar o RS, a seguir despolarizava-se a célula com pulsos quadrados de 200 ms de duração a partir de um potencial de -70 mV para obtenção da curva I-V. Esvaziava-se novamente o RS e aplicava-se a forma de onda do PA para obtenção da corrente de $[Ca^{2+}]$. Mudava-se a temperatura do banho e repetia-se o mesmo protocolo. Solução do banho era Tyrode 0Na 2Ca.

Capítulo 4

Resultados

Nós também sabemos o quanto a verdade é muitas vezes cruel, e nos perguntamos se a ilusão não é mais consoladora.

Henri Poincaré

Entrada de cálcio no citosol

Entrada de cálcio através dos canais de cálcio usando AP clamp

Medição do PA

A duração do PA é afetada pela temperatura. A fig. 4.1 ilustra PAs obtidos em miócitos de coelho nas temperaturas de 25 e 35°C. Observa-se uma diminuição na duração do PA com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C, assim como uma hiperpolarização diastólica da célula. Esta diminuição na duração do PA já havia sido descrita em miócitos de coelho, rato (Shattock e Bers, 1987) e cobaia (Kiyosue et al, 1993).

A tabela 4.1 ilustra os valores de potencial de repouso, amplitude máxima do PA e tempo para atingir 50% da amplitude máxima durante a repolarização (APD₅₀) obtidos para as diferentes temperaturas. A 25°C, o potencial de repouso foi de -72 ± 1.6 mV, indo para -81 ± 1.7 (n=7, p<0.01) quando o banho foi aquecido. A diferença nas amplitudes máximas (131 ± 1.2 mV a 25°C e 127 ± 2.5 mV a 35°C) não foi significativa. APD₅₀ diminuiu significativamente de 114 ± 13 para 74 ± 14 ms (n=7, p<0.01), o que resulta em um Q₁₀ aparente de 1.57 ± 0.12 , contrastando com os resultados de Kiyosue et al. (1993) que relataram um Q₁₀ de 2.5 ± 0.4 em cobaia, usando como parâmetro o APD₉₅. Esta diferença pode ser devido às espécies utilizadas e/ou causada pelo uso de diferentes parâmetros (.APD₅₀ vs APD₉₅.). Uma vez obtidos os PAs de 7 células, calculou-se um PA médio para ser usado como gabarito. Em uma outra série experimental o gabarito foi usado como sinal de comando em um protocolo de "*voltage clamp*" para obtenção das correntes de cálcio geradas durante um PA.

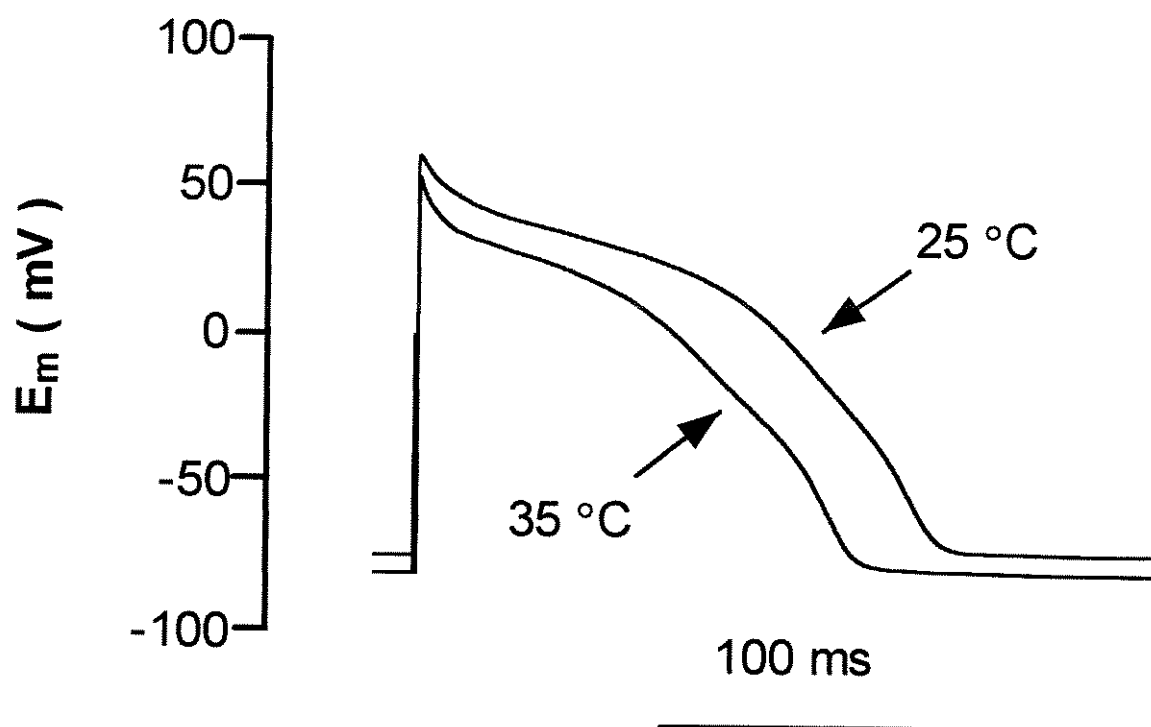


Figura 4.1 Potenciais de ação medidos em miócito ventricular isolado de coelho perfundido a diferentes temperaturas (25 e 35°C).

Tabela 4.1 Efeito da temperatura sobre o potencial de repouso, amplitude e APD50.
(n=7, * p<0.01)

	25 °C	35 °C
Potencial de Repouso (mV)	-72±1.6	-81±1.7 *
Amplitude máxima (mV)	131±1.2	127±2.5
APD ₅₀ (ms)	114±13	74±14 *

Medição da corrente de cálcio

Na figura 4.2A, estão ilustrados registros de correntes a 25 e 35°C durante um pulso quadrado para 0 mV, partindo de um potencial de -70 mV, nas condições controle e após adição de 0,2 mM de DIDS na solução do banho. O aparecimento de contaminação por corrente de cloreto sensível a Ca^{2+} ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) obrigou a utilização deste bloqueador de corrente de cloreto. Na figura 4.2 B, ilustra-se a corrente DIDS-sensível obtida como diferença dos dois registros. Esta corrente é maior a 35°C, possui um pico por volta de 20 ms e uma duração de 50 ms. A figura 4.2 C ilustra a relação I-V para I_{Ca} depois do bloqueio da $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. O pico da corrente de cálcio é atingido no potencial de 10 mV e não se altera com a temperatura. A partir deste gráfico, obteve-se um Q_{10} aparente de 1.77 ± 0.19 ($n=8$) para o valor máximo de I_{Ca} . Valores semelhantes (1.63 ± 0.07 e 2.3 ± 0.6) foram relatados por Klockner et al., (1990) e Kiyosue et al., (1993), respectivamente, em miócitos de cobaia. Na figura 4.2 C, ilustra-se a dependência da corrente $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ com a voltagem, obtida para uma célula. O pico é atingido em 0 mV.

É sabido que, ao se aumentar a temperatura, a amplitude da corrente de cálcio é aumentada e os processos de ativação e inativação se aceleram. Na figura 4.3 A, estão apresentados os registros normalizados de I_{Ca} nas duas temperaturas. O tempo para atingir o pico diminuiu de 5.90 ± 0.45 para 2.90 ± 0.37 ms quando a temperatura foi aumentada. Nestas condições o Q_{10} aparente foi de 2.2 ± 0.24 . Cavalié et al. (1985) relataram um valor similar (2.52 ± 0.13) para a ativação da I_{Ca} em células ventriculares de cobaia. A fase de inativação foi ajustada por uma exponencial dupla com τ rápido = 12.16 ± 1.88 ms a 25°C e 4.20 ± 0.80 ms a 35°C, e τ lento = 51.00 ± 5.90 ms a 25°C e 20.14 ± 2.8 ms a 35°C (Fig. 4.3 C). A influência da temperatura foi similar para ambas as constantes de tempo.

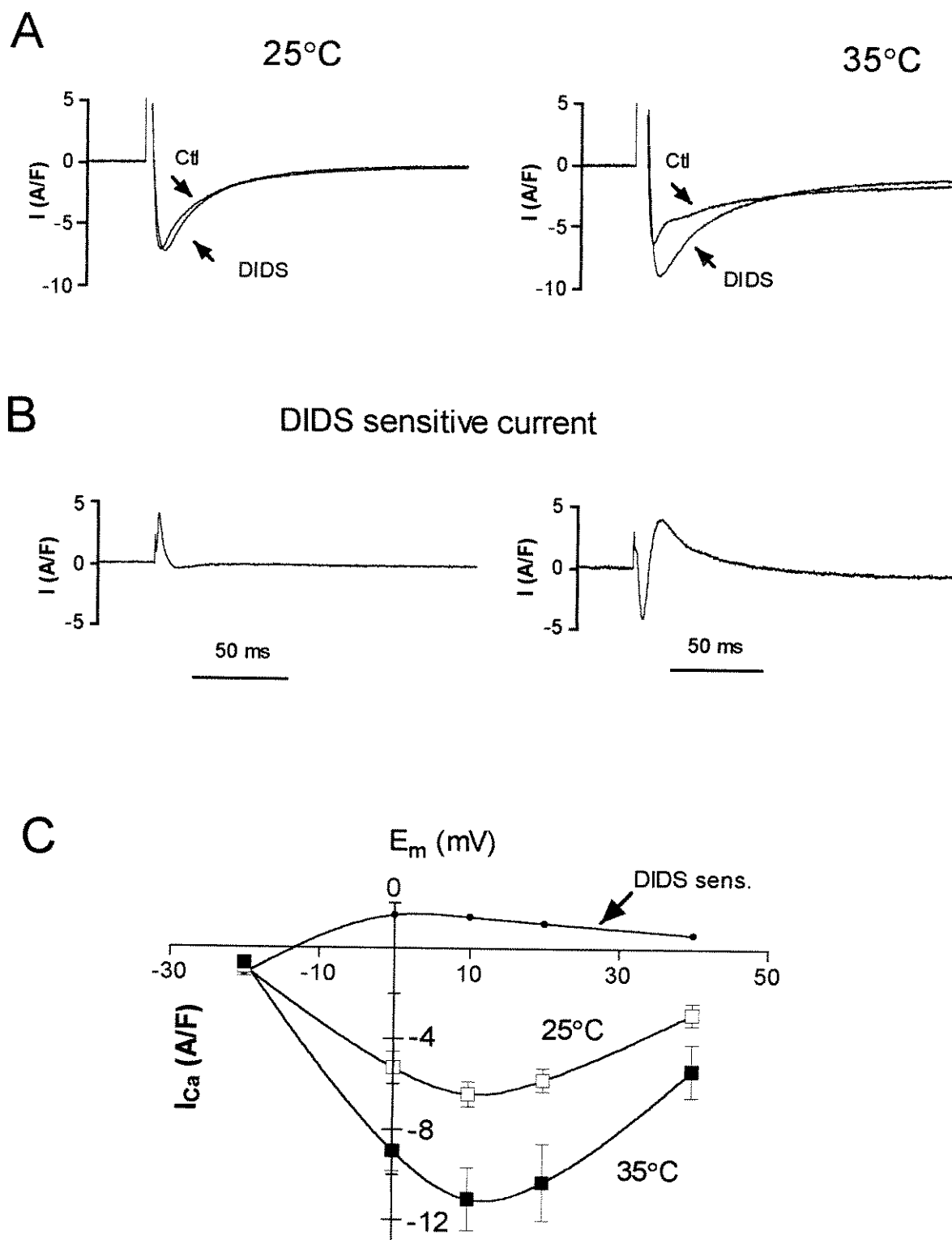


Figura 4.2 Painel Superior : Corrente obtida por depolarização para 0mV durante um pulso quadrado de 200 ms a partir de -70 mV nas condições controle e após adição de 0.2 mM DIDS na solução do banho. Painel central : Corrente sensível ao DIDS ($I_{Cl(Ca)}$) obtida mediante a diferença das correntes anteriores. Painel inferior : Relação Corrente - Voltagem (I-V) nas duas temperaturas para a corrente de cálcio (I_{Ca}) depois de eliminada a contaminação de cloreto.

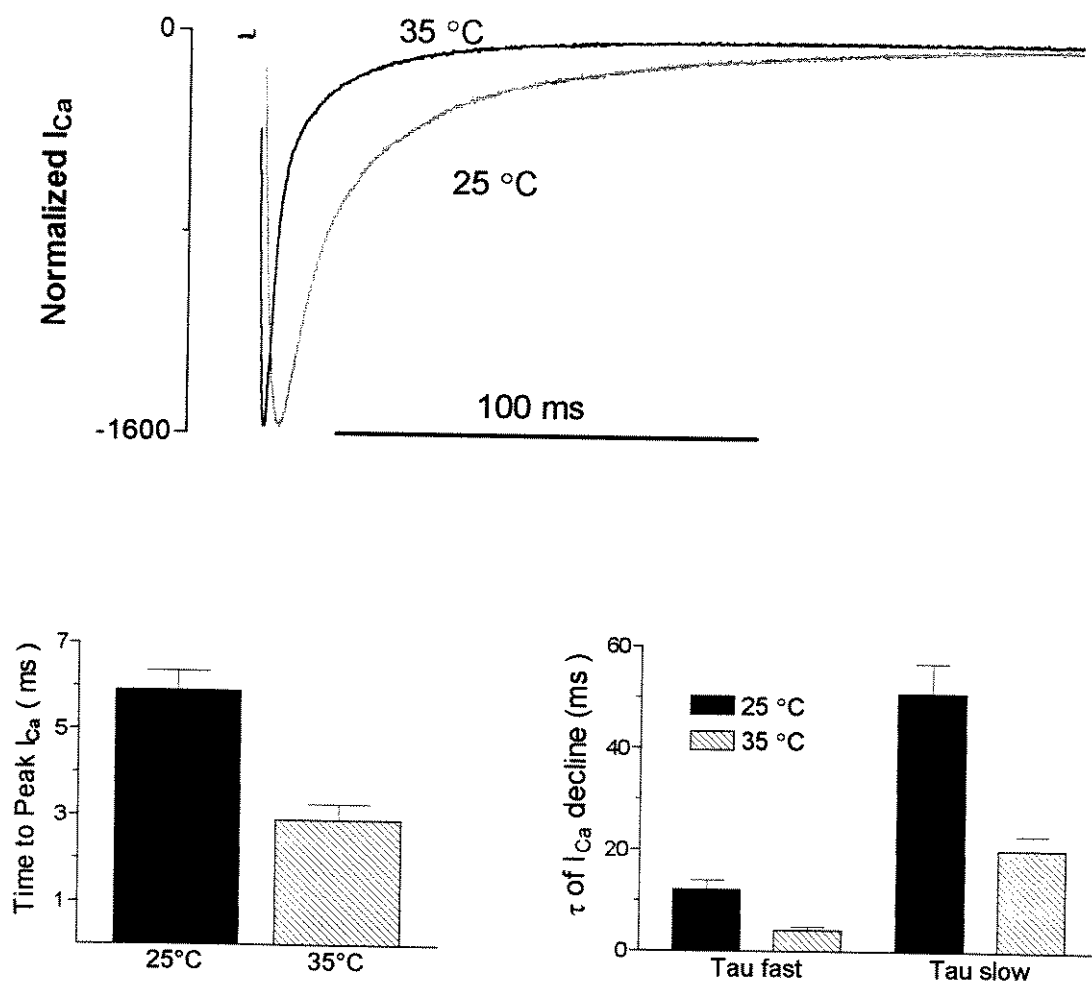


Figura 4.3 Painel superior : I_{Ca} normalizada nas duas temperaturas. Observa-se um aumento na ativação a 35°C, assim como um decaimento mais rápido. Painel inferior esquerdo : Tempo para atingir o pico, 5.90 ± 0.45 ms para 25°C e 2.90 ± 0.37 ms para 35°C. Painel inferior direito : A inativação foi ajustada a uma exponencial dupla. τ rápido = 12.16 ± 1.88 a 25°C e 4.20 ± 0.80 a 35°C, e τ lento = 51.00 ± 5.90 a 25°C e 20.14 ± 2.8 a 35°C.

Na figura 4.4 ,estão ilustrados os registros das correntes obtidas na mesma célula nas duas temperaturas utilizando o AP clamp com o gabarito respectivo a cada temperatura. O curso temporal das correntes difere daqueles obtidos pela aplicação de pulsos quadrados, apresentando um componente sustentado durante o platô do PA (veja figuras 4.3 e 4.4). Este componente é afetado pela temperatura, sendo a sua inativação mais rápida a 35°C. Este fato já foi observado por Arreola *et al.* (1991), que usou, porém, a mesma forma de onda de PA para as duas temperaturas. Sipido *et al.* (1995), trabalhando com miócitos de cobaias à temperatura ambiente e usando pulsos quadrados, observaram que a inativação da corrente de cálcio coincidia com a queda do transiente de cálcio. Com a variação do conteúdo de cálcio no SR, a inativação da I_{Ca} variava de forma semelhante, o que reforça a idéia de que a liberação de cálcio do SR modula I_{Ca} . O pico máximo da I_{Ca} a 35°C coincide com os obtidos em experimentos feitos com pulsos quadrados (Cavalié *et al.*, 1993) e pode ser devido a um aumento da condutância dos canais com o aumento da temperatura (Klockner *et al.*, 1990).

Na Fig. 4.5 estão ilustrados os valores das integrais das correntes de cálcio normalizadas pela capacitância da célula, nas duas temperaturas. Não foi detectada diferença significativa na quantidade de cálcio que entra por meio de canais (durante o PA) nas duas temperaturas estudadas (0.169 ± 0.001 pC/pF a 25°C e 0.180 ± 0.006 pC/pF a 35°C, $n=8$, $p>0.05$). Convertendo os valores de pC/pF para quantidade de íons de cálcio obtivemos aproximadamente 10^8 íons, o que corresponde a 170 atomoles. A temperatura não afeta significativamente a quantidade resultante de íons que entra na célula, no entanto os cursos temporais das integrais de I_{Ca} se mostram diferentes (figura 4.5 B). O valor das integrais no final do PA são semelhantes nas duas temperaturas, contudo o valor de regime permanente é atingido mais rapidamente a 35°C.

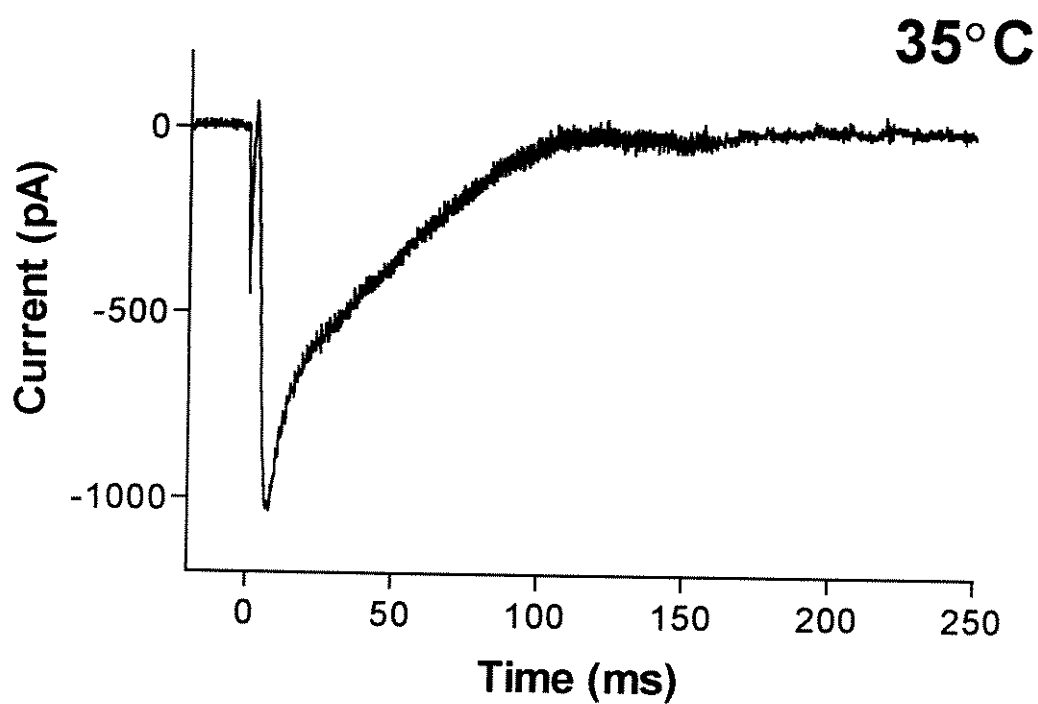
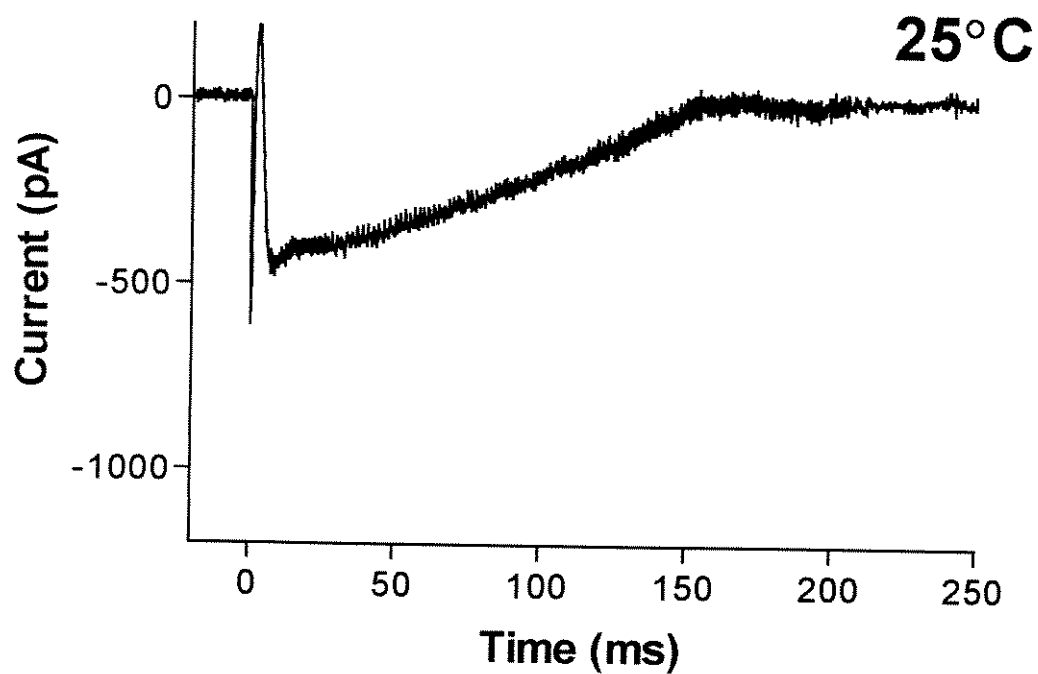


Figura 4.4 Correntes de cálcio obtidas em miócito de coelho a 25°C (painel superior) e a 35°C (painel inferior).

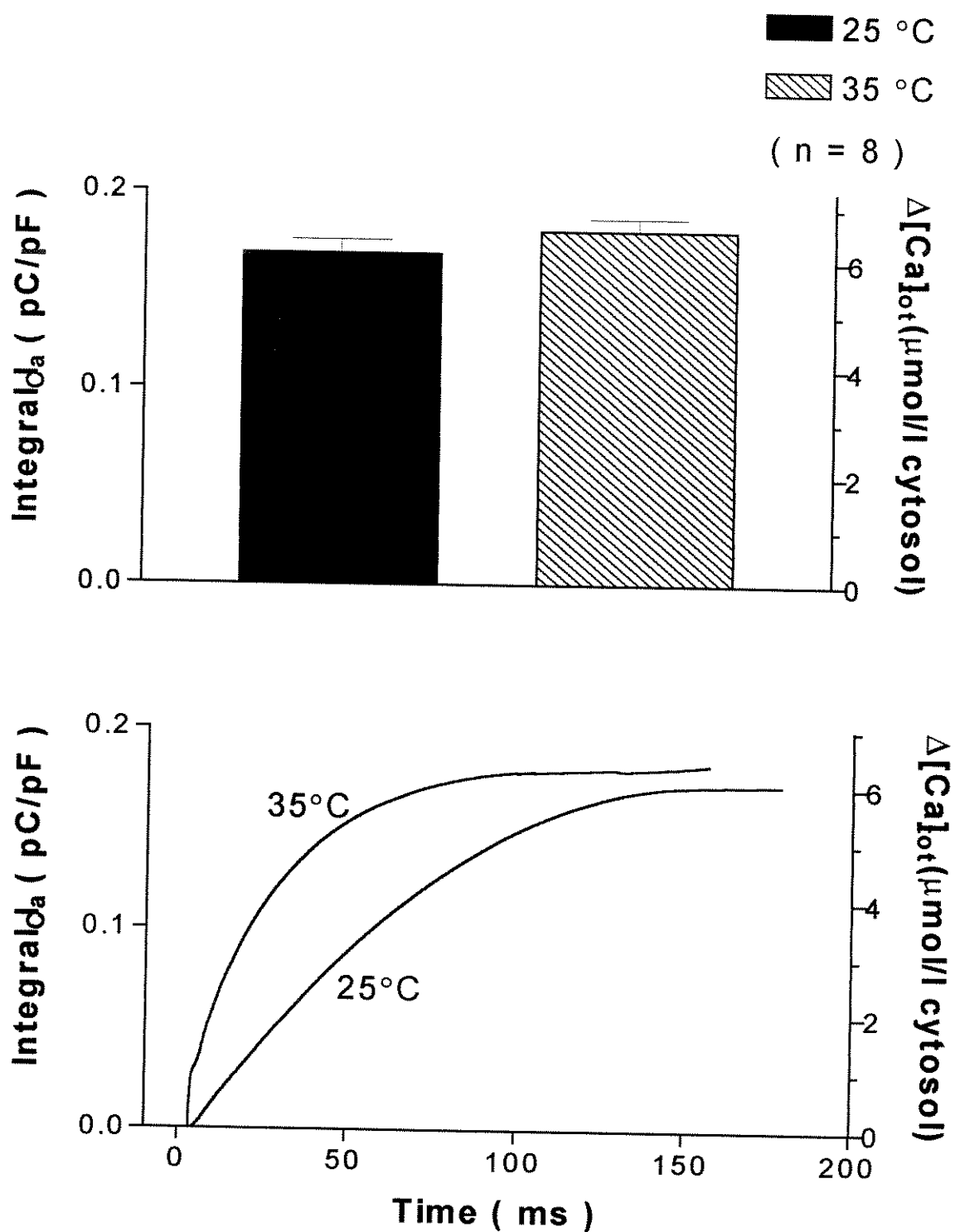


Figura 4.5 Painel superior : Integral das correntes de cálcio durante a totalidade do PA: 0.169 ± 0.010 pA/pF a 25°C e 0.180 ± 0.06 pA/pF a 35°C ($p > 0.05$). Painel inferior : Evolução temporal da integral da I_{Ca} na mesma célula nas duas temperaturas.

Entrada de cálcio através da troca Na/Ca

Um outro mecanismo para entrada de cálcio nas células cardíacas é a troca Na/Ca atuando no seu modo reverso de operação (Bers, 1991). Berlin *et al.* (1987) e Leblanc e Hume (1990) levantaram a possibilidade de que a entrada de cálcio através deste mecanismo seria suficiente para disparar a liberação de cálcio do RS. Dentro destas perspectivas, fomos motivados a quantificar a contribuição da troca Na/Ca. Diante da dificuldade de medir a corrente da troca Na/Ca (I_{NaCaX}) livre de contaminação (não existe um inibidor seletivo da troca Na/Ca, Bers *et al.*, 1996), optou-se pela simulação matemática da corrente (I_{NaCaX}) utilizando dados experimentais por nós obtidos. A equação utilizada para a simulação foi a descrita por Matsuoka e Hilgemann (1992), conforme apresentada no modelo proposto por Luo e Rudy (1994). Esta equação utiliza como parâmetros de entrada o PA e o transiente de cálcio. A figura 4.6 ilustra o resultado das simulações.

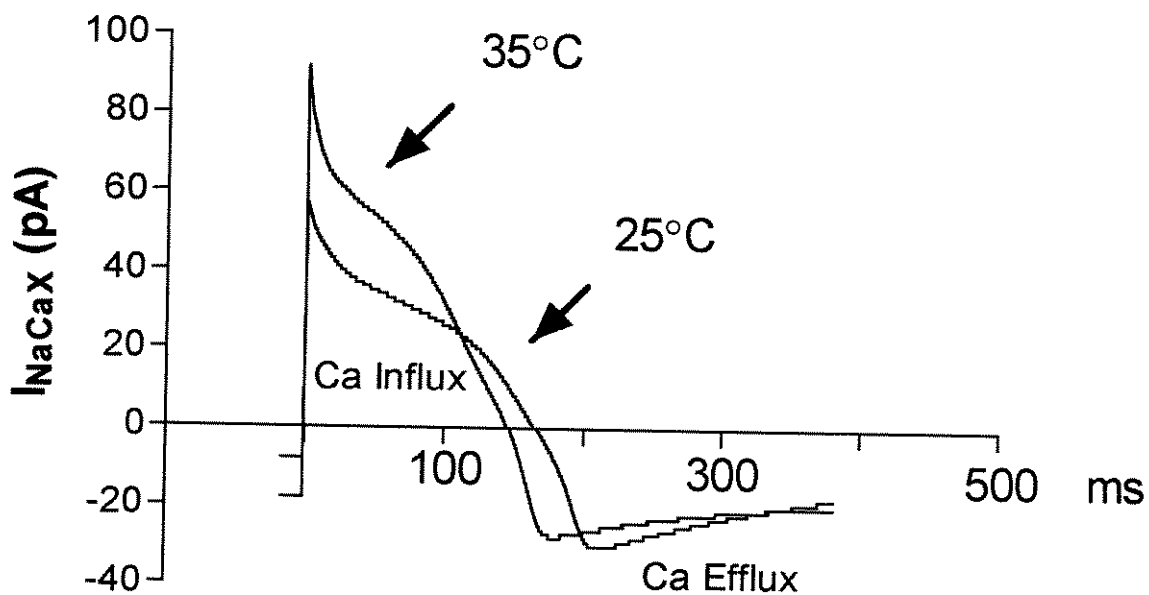


Figura 4.6 Simulação das correntes de troca Na/Ca para duas temperaturas. Utilizou-se a equação de Luo e Rudy (1994). Os valores máximos das correntes foram 57.26 pA a 25°C e 92.46 pA a 35°C. Considerou-se [Na] extracelular 140 mM, e intracelular 10 mM. O valor de Q_{10} utilizado foi 1.87 (Puglisi *et al.* 1996).

De modo semelhante ao que acontece para a I_{Ca} , existe um aumento do pico da corrente I_{NaCaX} (92.46 pA a 35°C e 57.26 pA a 25°C) a 35°C. A extrusão de cálcio (I_{NaCaX} negativa) se inicia mais prematuramente a 35°C (147 ms, comparado com 167 ms a 25°C). Integrando essas correntes durante um PA, podemos obter a quantidade de cálcio que entra pela troca Na/Ca. Na figura 4.7, apresentamos o resultado da integração comparado com a quantidade de cálcio que entra através dos canais de cálcio. Os valores máximos da quantidade de cálcio que entra via I_{NaCaX} a é de 64.45 atomol e 48.98 atomol a 35°C e a 25°C, respectivamente. Estes valores, quando comparados ao cálcio que entra através dos canais (187.2 atomol e 175.4 atomol a 25°C e 35°C, respectivamente), revelam uma relação de aproximadamente um terço (34% a 35°C, 28% a 25°C). Curiosamente, a quantidade de cálcio que entra pela troca Na/Ca aumenta em valor absoluto quando a célula é aquecida, porém a sua relação com a quantidade de cálcio que entra pelos canais não varia significativamente. A comparação feita aqui deve ser tomada com cautela tendo em vista que resultados obtidos de simulações para a troca Na/Ca estão sendo comparados a dados experimentais (I_{Ca}).

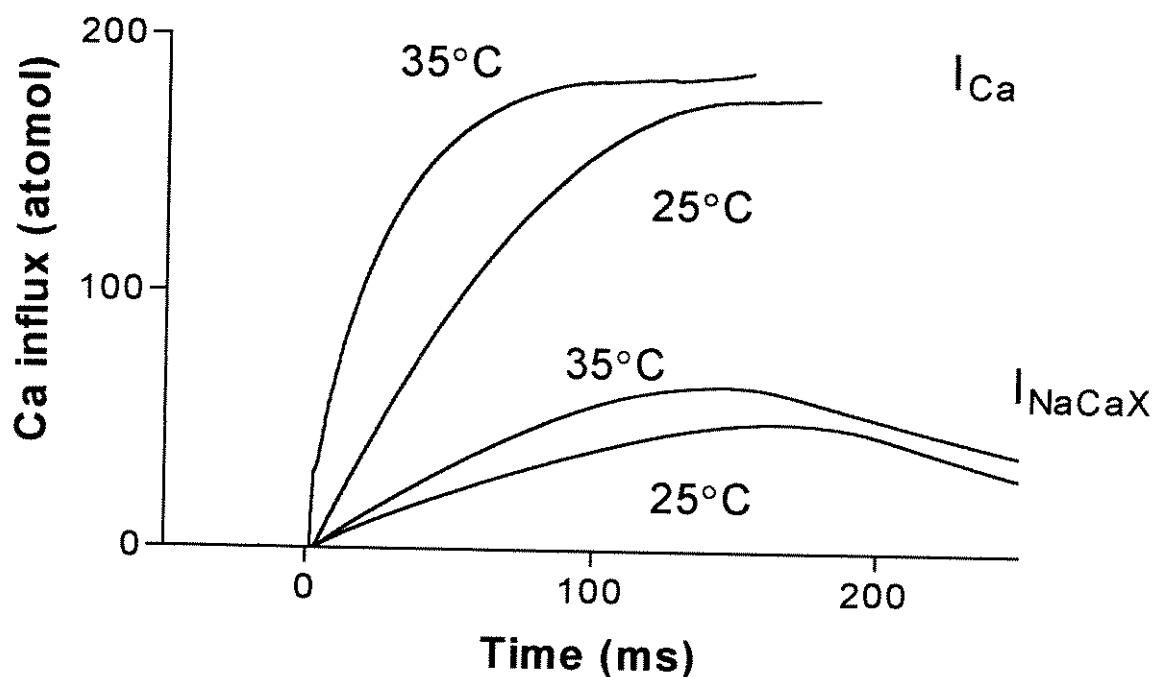


Figura 4.7 Quantidade de cálcio em atomol ($1 \text{ atomol} = 10^{-18} \text{ mol}$) que entra no miócito do coelho durante um PA através da troca Na/Ca e dos canais de cálcio em duas temperaturas. Os valores máximos foram: canais: 187 atomol a 35°C e 175.4 atomol a 25°C; troca Na/Ca: 64.45 atomol a 35°C e 48.98 atomol a 25°C. Uma vez atingido o pico da corrente, a troca Na/Ca começa a extrair cálcio da célula durante a fase final do PA.

Remoção de cálcio do citosol

A remoção de cálcio do citosol é realizada pela recaptação do íon para o RS pela ATPase de cálcio do RS e extrusão *via* troca Na/Ca (mecanismos rápidos), pela extrusão *via* ATPase de cálcio do sarcolema e pela captação mitocondrial de cálcio. Os dois últimos, considerados como mecanismos lentos de redução do cálcio citosólico (Bassani et al, 1992, 1994a).

Encurtamento celular e transientes de cálcio

A figura 4.8 ilustra registros de encurtamento celular e transientes de cálcio obtidos a 25 e 35°C em miócito de coelho. O aumento da temperatura produz uma diminuição no pico e na duração do encurtamento e do transiente de cálcio, tanto para a contração normal quanto para ambas contraturas de cafeína em NTCaff e em Caff00. A contratura em NTCaff é maior que a contração normal devido à inibição da recaptação de Ca^{2+} pelo RS, e também porque somente a metade do conteúdo do RS é liberado na contração normal (Bassani *et al.*, 1995b). As contraturas de cafeína em Caff00 são maiores do que as contraturas de cafeína em NTCaff devido ao fato da troca Na/Ca estar inibida e, portanto, não atuar limitando o transiente de cálcio, como acontece na presença do Na. A 35°C todas as contrações são significativamente menores e mais rápidas do que as correspondentes a 25°C (Tabela 4.2). O relaxamento mais rápido era esperado porque todos os mecanismos responsáveis pela extrusão de cálcio devem estar mais ativos a temperaturas mais elevadas. A amplitude da contração a 35°C é menor, apesar do aumento na corrente de entrada (Cavalié et al, 1985) e do aumento na sensibilidade dos miofilamentos (Harrison e Bers, 1989). Isto indicaria que os processos de remoção de cálcio têm um papel predominante na redução da amplitude da contração a 35°C. O maior transiente de cálcio durante a contratura de cafeína em NTCaff indicaria um maior conteúdo de cálcio no RS a 25°C, em concordância com os resultados dos experimentos de contratura por esfriamento rápido (rapid cooling contractures - RCC) realizados para avaliar o conteúdo do RS (Shattock e Bers, 1987).

Tabela 4.2 Amplitudes máximas e tempos de relaxamento para atingir 50% do pico ($t_{1/2}$) durante encurtamentos e transientes de cálcio. Amplitude do encurtamento expressa como porcentagem do comprimento da célula em repouso. Amplitude dos transientes de cálcio expressa em nanomolar. $t_{1/2}$ em ms exceto para Caff00 onde é expresso em s. Valores tabelados como média $\pm$ epm, $n=8$, * $p<0.05$.

	<i>Coelho</i>		<i>Coelho [Ca]</i>		<i>Furão</i>		<i>Gato</i>	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°
	Encurtamento		Transiente de Ca		Encurtamento		Encurtamento	
$t_{1/2}$								
Twitch	130 $\pm$ 12	50 $\pm$ 1.7*	252 $\pm$ 12	117 $\pm$ 7*	188 $\pm$ 12	78 $\pm$ 4.4*	262 $\pm$ 33	99 $\pm$ 6.5*
NTCaff	489 $\pm$ 34	277 $\pm$ 21*	951 $\pm$ 55	561 $\pm$ 83*	696 $\pm$ 97	308 $\pm$ 42*	631 $\pm$ 79	371 $\pm$ 53*
Caff00	6.7 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.2*	9.6 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.6*	2.9 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2*	12.2 $\pm$ 1.5	5.8 $\pm$ 0.9*
Amplitude								
Twitch	13.1 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 0.8*	454 $\pm$ 40	248 $\pm$ 23*	4.9 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.6*	6.0 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 1*
NTCaff	28.8 $\pm$ 3.9	22.1 $\pm$ 3.7*	719 $\pm$ 49	452 $\pm$ 37*	32.6 $\pm$ 2.9	24.6 $\pm$ 1.9*	30.2 $\pm$ 2.9	28.5 $\pm$ 1.9
Caff00	38.6 $\pm$ 4.6	26.1 $\pm$ 4.1*	877 $\pm$ 65	603 $\pm$ 62*	38.5 $\pm$ 3.8	26.3 $\pm$ 2.8*	44.8 $\pm$ 2.9	38.9 $\pm$ 2.2

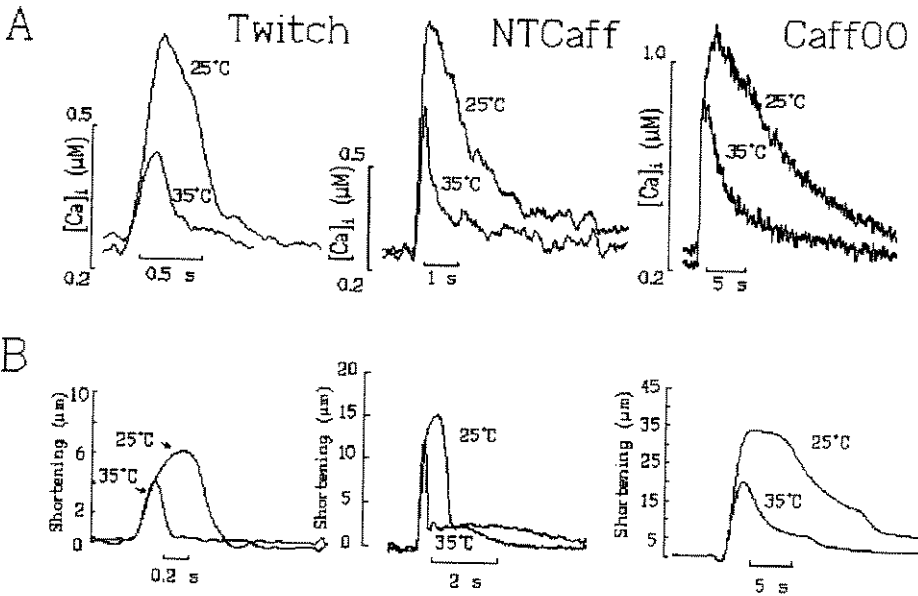


Figura 4.8: Transientes de cálcio (painel superior) e encurtamento celular (painel inferior) obtidos em miócitos de coelho a 25 e 35°C. Twitch: contração normal, NTCaff : contractura de cafeína em Tyrode normal e Caff00: contractura de cafeína em Tyrode sem Na e sem Ca. As escalas de concentração de cálcio, encurtamento e tempo são diferentes em cada caso. Os transientes de cálcio e as contrações apresentaram amplitude e duração estatisticamente menores a 35°C, comparados a 25°C (Ver tabela 4.2). Reproduzido de Puglisi *et al.*, 1996.

Curso temporal do relaxamento

Visando focalizar a atenção no processo de relaxamento, curvas de relaxamento e decaimento do transiente de cálcio, apresenta-se na figura 4.9 estas curvas normalizadas nas duas temperaturas estudadas. O padrão de decaimento para a contração normal, para a contratura em NTCaff e para a contratura em Caff00, é o mesmo a 25 e a 35°C, sempre mais rápido na maior temperatura. Os valores do tempo para decaimento para 50% do valor de pico ($t_{1/2}$) são apresentados na tabela 4.2. O valor de $t_{1/2}$ de relaxamento diminui significativamente, indo de 130 ms a 25°C para 50 ms a 35°C (Q_{10} aparente de 2.6, ver tabela 4.3). Os valores de $t_{1/2}$ de decaimento do transiente de cálcio foram maiores (252 ms a 25°C e 117 ms a 35°C, Q_{10} de 2.2) do que os de relaxamento mecânico. Os valores obtidos a 25°C são consistentes com resultados disponíveis na literatura, obtidos a 22°C (Bassani et al., 1992, 1994a). Apesar dos valores de $t_{1/2}$ de relaxamento e de declínio do transiente de cálcio diferirem, a relação dos valores de $t_{1/2}$ da contração normal para as contraturas de cafeína se manteve nas duas temperaturas. No coelho, os valores de Q_{10} aparente para o relaxamento não foram diferentes dos valores de Q_{10} obtidos a partir dos transientes de cálcio (veja Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Q_{10} aparentes calculados para o coelho, furão e gato. Valores tabelados como média $\pm$ EPM, $n=8$.

Q_{10}	<i>Coelho</i> (<i>encurtamento</i>)	<i>Coelho</i> (<i>[Ca]i</i>)	<i>Furão</i> (<i>encurtamento</i>)	<i>Gato</i> (<i>encurtamento</i>)
Contração	2.60 $\pm$ 0.23	2.21 $\pm$ 0.12	2.45 $\pm$ 0.19	2.61 $\pm$ 0.22
NTCaff	1.87 $\pm$ 0.25	2.05 $\pm$ 0.18	2.47 $\pm$ 0.38	1.87 $\pm$ 0.23
Caff00	3.36 $\pm$ 0.25	2.60 $\pm$ 0.33	1.76 $\pm$ 0.18	2.32 $\pm$ 0.32

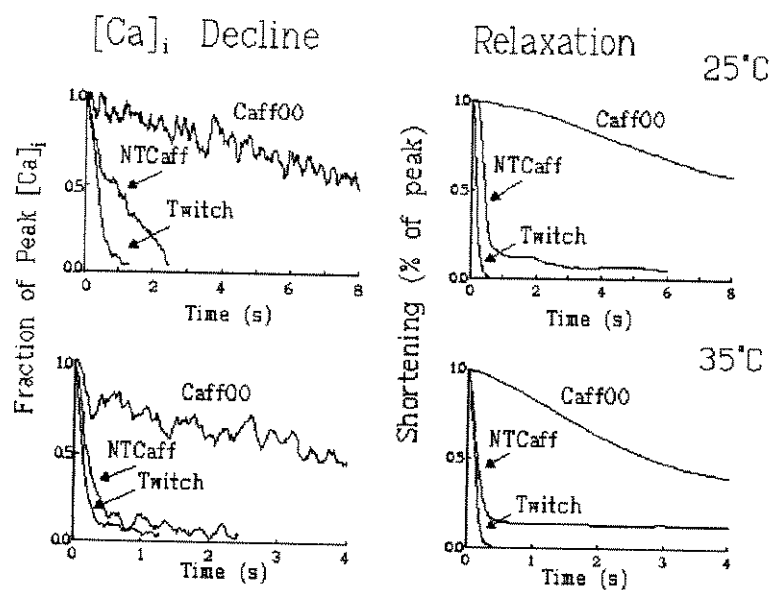


Figura 4.9 Registros normalizados de queda de contrações eletricamente estimuladas e contraturas evocadas por cafeína em NTCaff e Caff00. Paine à direita, encurtamento celular . Paine à esquerda, transientes de cálcio. Reproduzido de Puglisi *et al.* 1996.

Cálculo do fluxo de cálcio

A tabela 4.4 ilustra os valores de Km, Vmax e n obtidos para os diversos mecanismos de transporte de cálcio nas duas temperaturas estudadas.

	25 °C			35 °C		
	V _{máx}	K _m	n	V _{máx}	K _m	n
Retículo	73	0.41	4.5	189	0.44	5.3
Troca Na/Ca	30	0.44	3.8	47	0.42	4.1
Mec. Lentos	3.1	0.42	4.5	7.3	0.42	4.5

Tabela 4.4. Valores de V_{máx} (μmol/kg), K_m (μM) e n para os diferentes mecanismos nas duas temperaturas.

A partir dos valores apresentados na tabela 4.4 foi possível quantificar o fluxo de cálcio através de cada mecanismo de transporte, durante uma contração normal, nas duas temperaturas (Figura 4.10). A contribuição relativa de cada mecanismo não se alterou sensivelmente com a temperatura, apesar de ser evidente um aumento das taxas de transporte (observar que na fig.4.10 as escalas de tempo são diferentes). Durante uma contração normal a 25°C , o RS, a troca Na/Ca e os mecanismos lentos, transportaram respectivamente 70, 27 e 3% do total de cálcio transportado. Estes números não foram substancialmente alterados a 35°C (74, 23 e 3%, respectivamente para o RS, troca Na/Ca e mecanismos lentos). Os dados obtidos a 25 e a 35°C estão de acordo com resultados obtidos a 22 - 30°C por outros autores (Bassani et al, 1992, 1994a, Bers e Bridge, 1989, Hryshko et al, 1989).

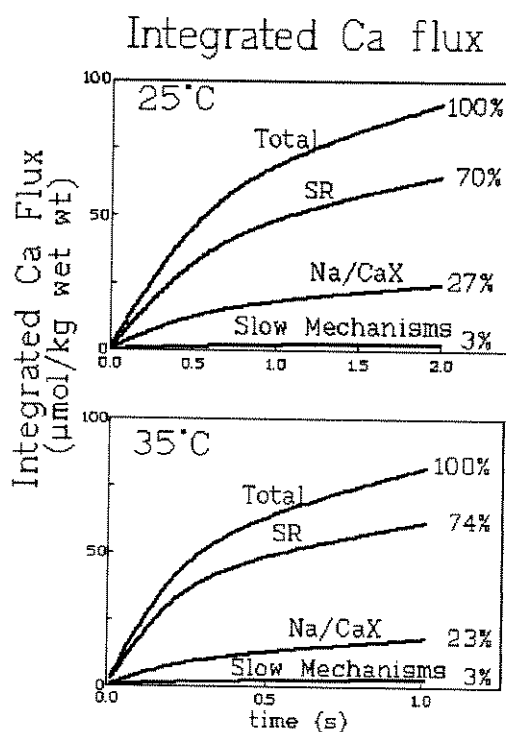


Figura 4.10 Integral dos fluxos de cálcio durante uma contração normal nas duas temperaturas. Assumiu-se que o cálcio citoplasmático total ($[Ca]_{total}$) fosse igual a $[Ca]_i + 232 / \{1 + (455/[Ca]_i)\} + [indo]_i / \{1 + K_{in} / [Ca]_i\}$, onde o último termo representa o Ca ligado ao indicador de cálcio intracelular e 232 e 455 são constantes empíricas que descrevem a atividade dos buffers passivos intracelulares nos miócitos isolados de coelho (Hove-Madsen e Bers, 1993). O $[Ca]_i$ é convertido em $[Ca]_{total}$ e depois diferenciado para se obter o fluxo total. $J_{total} = J_{RS} + J_{NaCa} + J_{lentos}$ onde cada fluxo é representado por uma equação do tipo $J = V_{max} / \{1 + (K_m/[Ca]_i)^n\}$. Redesenhado de Puglisi et al. 1996.

Comparação entre espécies

Experimentos similares de medição de encurtamento foram feitos em células de furão e gato nas duas temperaturas. Os valores de $t_{1/2}$ para o relaxamento nas três espécies são apresentados na tabela 4.2. Os registros do encurtamento para a contração normal, contratura induzida por NTCaff e contratura induzida por Caff00 são apresentados na figura 4.11. Os valores de $t_{1/2}$ em NTCaff foram semelhantes para as três espécies. Por outro lado, na contratura em Caff00, o furão apresenta, a 25°C, $t_{1/2}$ significativamente menor do que os valores obtidos nas outras duas espécies ($t_{1/2} = 2.9$ s contra 6.7 s para o coelho e 12.2 s do gato). A diferença de cinética de transporte de cálcio *via* SL-Ca-ATPase encontrada no furão e no coelho já foi descrita por Bassani *et al.* (1994b; 1995b), usando transientes de cálcio.

Curiosamente, como é ilustrado na figura 4.11 B (painel superior), a amplitude da contração normal do miócito do gato aumentou significativamente quando a solução foi aquecida (de $6.0 \pm 1.2\%$ do comprimento de repouso a 25°C para $10.8 \pm 1.1\%$ a 35°C, $p < 0.01$, $n=8$), tendo sido, contudo mantida a redução de $t_{1/2}$. As contraturas induzidas por NTCaff e Caff00 apresentaram o mesmo comportamento daquelas obtidas em miócito de coelho ou de furão (menores e mais rápidas a 35°C).

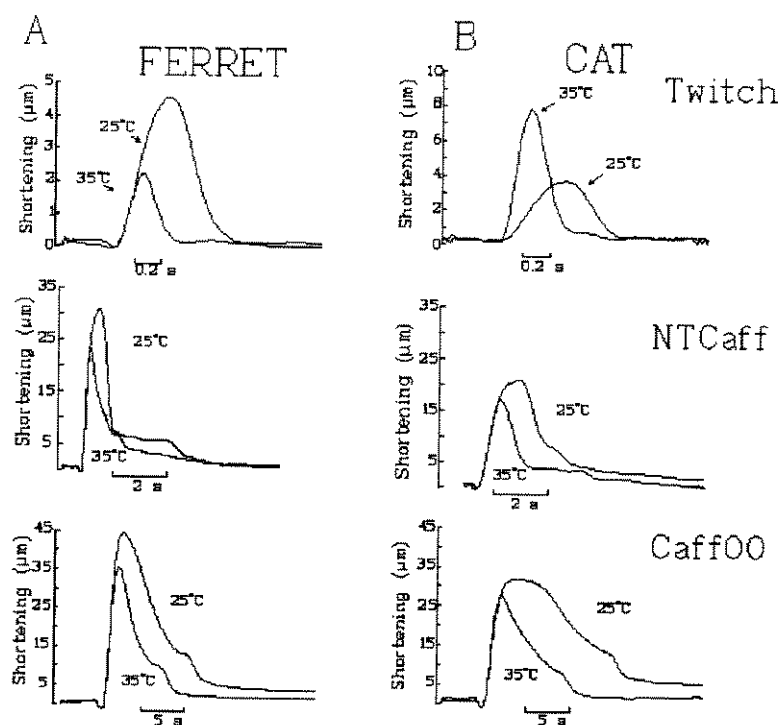


Figura 4.11 Registros de encurtamento celular para (A) furão e (B) gato. Painei superior : contração normal, painei central : contratura induzida por NTCaff e painei inferior : contractura induzida por Caff00. As escalas são diferentes em cada caso. Reproduzido de Puglisi *et al.*, 1996.

Capítulo 5

Discussão

É um erro capital teorizar antes de ter os dados.
Insensivelmente, começa-se a distorcer os fatos
para adaptá-los às teorias, em vez de fazer com que
as teorias se adaptem aos fatos

Sherlock Holmes em "A scandal in Bohemia"

Neste trabalho: a) foi medida a quantidade de Ca^{2+} que entra através dos canais de Ca^{2+} da membrana em miócitos ventriculares de coelho durante um PA; b) estimou-se a quantidade de Ca^{2+} que entra através de troca Na/Ca, usando o modelo proposto por Luo e Rudy (1994) ; e, c) quantificou-se a contribuição relativa dos mecanismos de redução de $[\text{Ca}]_i$ (RS, troca Na/Ca e mecanismos lentos) durante o relaxamento. Todas as medições e cálculos foram feitos a 25 e 35°C, para estudar a influência da temperatura nos mecanismos de transporte de Ca^{2+} . Estes valores de temperatura foram escolhidos por serem um próximo à temperatura ambiente (22~23°C) e à temperatura corporal (37°C). Isto permitiu a comparação de nossos resultados com aqueles da literatura e possibilitou o cálculo direto do Q_{10} aparente dos sistemas estudados. Além dos valores absolutos das quantidades de Ca^{2+} transportadas pelos diversos sistemas, também foi avaliada a proporção com que cada um contribui para o fluxo total de Ca^{2+} a 25 e 35°C, visando verificar se a participação relativa de cada mecanismo é modificada com mudanças de temperatura.

Entrada de cálcio na célula

A entrada de Ca^{2+} começa quando o PA produz a abertura dos canais de Ca^{2+} . Alterações no PA podem ter influência direta sobre o influxo de Ca^{2+} através deste mecanismo. Daí a importância de avaliar as alterações produzidas no PA pela temperatura. Neste caso, foi observado um encurtamento do PA e hiperpolarização diastólica da célula quando a temperatura foi de 25 para 35°C. Esta diminuição na duração do PA já havia sido descrita em miócitos de coelho e rato (Shattock e Bers, 1987) e de cobaia (Kiyosue *et al.*, 1993). Este fenômeno continua a persistir quando o RS é inibido pela aplicação de rianodina (Shattock e Bers, 1987) e tem sido atribuído a vários fatores: aumento na inativação dos canais de Ca^{2+} (Cavalie *et al.*, 1985), aumento da inativação da corrente de sódio (Isenberg *et al.*, 1975) e/ou aumento nas correntes de potássio (Kiyosue *et al.*, 1993). A hiperpolarização pode, em parte, ser explicada pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz na qual E_m é diretamente proporcional à temperatura, o que justificaria uma mudança de aproximadamente de 3 mV (mas não de cerca de 10 mV, como observado, vide fig. 4.1) na faixa de temperaturas estudada. Além

disso, um aumento das correntes de potássio a 35°C poderia também ter contribuído para a hiperpolarização da membrana. Estas mudanças no PA não são desprezíveis e devem ser levadas em consideração quando se estuda o efeito da temperatura nas correntes de Ca^{2+} usando a técnica de "AP clamp".

Entrada de cálcio através de canais (AP clamp)

Para medir adequadamente a corrente de Ca^{2+} através dos canais L, eliminamos Na e K das soluções do banho e da micropipeta. Antes de cada medição, aplicava-se um pulso de cafeína para esvaziar o RS de Ca^{2+} , assegurando-se desta maneira que as medições fossem feitas começando sempre com a mesma carga do RS. Contudo, o surgimento de uma corrente de contaminação carregada pelo íon cloreto (aparecimento de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) nos obrigou a utilizar o bloqueador DIDS. Esta corrente, sensível ao DIDS, já foi descrita em diversos tipos celulares: células ventriculares de cão (Zygmunt, 1994), células atriais e ventriculares de coelho (Zygmunt & Gibbons, 1992, Hiraoka & Sawano, 1989) e células de Purkinje de coelho (Sipido *et al.*, 1993). Uma de suas características é a ativação Ca^{2+} -dependente. Deste modo, não está presente em experimentos nos quais o Ca^{2+} intracelular é tamponado ou o RS está depletado por aplicação de cafeína (Kawano *et al.*, 1995, Zygmunt & Gibbons, 1991) e aumenta na presença de isoproterenol (Kawano *et al.*, 1995). Outra característica da corrente de cloreto é a sua presença principalmente a 35°C.

Uma vez eliminada a contaminação por $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, o uso de pulsos quadrados serviu para levantar a curva I-V da corrente I_{Ca} e avaliar o tempo de pico e a inativação em ambas temperaturas. A 35°C, I_{Ca} apresenta maior amplitude ($Q_{10} = 1.77 \pm 0.19$), menor tempo de pico (2.90 ± 0.37 ms) e inativação mais rápida (τ rápido = 4.20 ± 0.80 ms, τ lento = 20.14 ± 2.8 ms). Uma vez garantido (pelos valores dos parâmetros medidos, curva I-V e forma dos registros das correntes) que a corrente medida era I_{Ca} , pôde-se passar à aplicação da técnica de AP clamp. O uso desta técnica surgiu da necessidade de se obter um registro de corrente em uma condição mais próxima da fisiológica. Embora I_{Ca} tenha sido estudada, em profundidade com pulsos quadrados (Cavalié *et al.*, 1985, Barcenas-Ruiz e Wier, 1987, Hirano *et al.*, 1989), não se pode negar que o comportamento desta corrente é diferente daquele obtido pela aplicação de uma forma

de onda variável como a do PA no protocolo de *voltage clamp* (Arreola *et al.*, 1991). A corrente de Ca^{2+} assim obtida a 25°C apresenta um padrão complexo: após atingido o pico, ela se inativa apenas parcialmente durante o platô do PA.

A inativação de I_{Ca} sofre marcante influência da liberação de Ca^{2+} do RS (Pelzer *et al.*, 1990), uma vez que a quantidade de Ca^{2+} liberada do RS pode ser várias vezes superior à quantidade que entra por meio de canais (Sipido *et al.*, 1995). A liberação de Ca^{2+} do RS induzida pela entrada de Ca^{2+} produz um aumento transitório bastante pronunciado da concentração de Ca^{2+} nas proximidades da boca do canal, o que produziria um efeito inibitório nos canais. Tem sido proposta, como mecanismo para esta inibição, a redução da probabilidade de abertura dos canais, que serviria como mecanismo de realimentação negativa da célula para evitar uma sobrecarga de Ca^{2+} (Grantham e Cannel, 1996).

Reforçando a idéia de uma inibição de I_{Ca} induzida pelo Ca^{2+} , Sipido *et al.*, 1995 mostraram que o curso temporal da corrente coincide com o decaimento do transiente de Ca^{2+} apenas após os primeiros 20-50 ms. Nestes instantes iniciais do transiente de Ca^{2+} a concentração do íon na boca do canal estaria muito maior que a $[\text{Ca}]_i$ medida no citosol com o indicador fluorescente. A existência destes gradientes de concentração de Ca^{2+} dentro da célula já foi prevista também em cálculos teóricos (Stern, 1992). Outra possibilidade seria a existência de uma relação não-linear entre I_{Ca} e $[\text{Ca}]_i$, tal como a existente entre a corrente de Ba^{2+} através de canais de Ca^{2+} tipo L (Romain *et al.*, 1992), ou ainda que o transiente de Ca^{2+} seria subestimado devido cinética do indicador fluorescente.

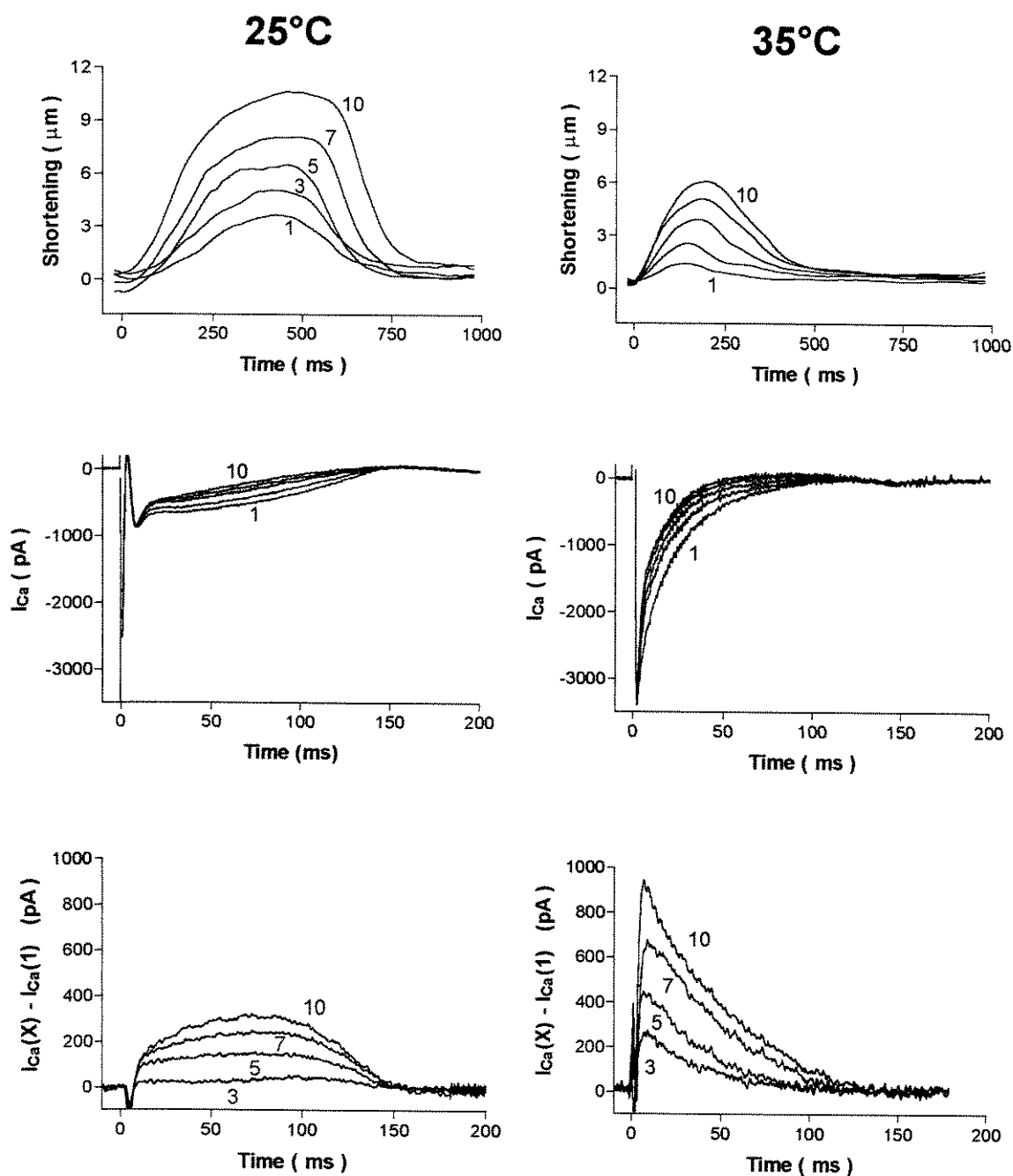


Figura 5.1 Registros consecutivos de encurtamento celular (Painel superior), corrente de Ca^{2+} durante o PA (painel do meio) e a diferença das correntes consecutivas (Painel inferior) no miócito de coelho nas duas temperaturas.

Ao aumentar a temperatura, o pico da corrente de Ca^{2+} durante o AP clamp, aumenta, fato previsto pelos resultados anteriormente obtidos usando pulsos quadrados em duas temperaturas (Cavalié *et al.*, 1985). A inativação durante o platô é mais pronunciada a 35°C, fenômeno observado também por Arreola *et al.*, (1991), usando, porém, a mesma forma de onda para o PA nas duas temperaturas. A inativação pode ser

avaliada usando os registros consecutivos das correntes de Ca^{2+} durante o PA após a depleção do RS com um pulso de cafeína. No painel superior da figura 5.1, pode-se observar que a resposta de encurtamento após esvaziamento do RS é menor, aumentando à medida que o RS vai sendo carregado. Este comportamento pode ser observado nas duas temperaturas (25 e 35°C). O efeito do enchimento progressivo do RS pode também ser notado nos registros das correntes (painel central). O primeiro registro de corrente foi feito quando o RS estava depletado de Ca^{2+} e, portanto, a inativação causada pela liberação de Ca^{2+} do RS não estava presente. Nos traçados subsequentes, o efeito desta inativação se apresenta cada vez maior até atingir um valor de regime.

O fato da primeira corrente encontrar o RS vazio e as obtidas em pulsos subsequentes incluírem o efeito crescente da inativação nos permite avaliar este processo de inativação, subtraindo as sucessivas correntes da primeira. Estas diferenças ($I_{\text{Ca}}(x) - I_{\text{Ca}}(1)$, vide fig. 5.1) são representativas do grau de inativação que o Ca^{2+} do RS exerce sobre a I_{Ca} (figura 5.1 painel inferior). O pico das curvas das diferenças indica o ponto de maior inativação induzida pelo Ca^{2+} , ocorrendo mais prematuramente a 35°C (~10 ms) do que a 25°C (~80 ms).

Se a inativação pode ser considerada como diretamente dependente do aumento da concentração de Ca^{2+} no espaço subsarcolemático (Sipido *et al.*, 1995), então o pico da inativação estaria indicando a ocorrência deste aumento de concentração nas proximidades da boca do canal. Neste caso, poderíamos esperar que a corrente de cloreto Ca^{2+} -dependente ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) tivesse um pico na mesma faixa de tempo de ocorrência do máximo de inativação, como observado nos nossos resultados (figura 4.2, painel central). O curso temporal das curvas $I_{\text{Ca}}(x) - I_{\text{Ca}}(1)$ nos indicaria ainda que o “tempo de trânsito” (tempo nas proximidades da boca do canal) do Ca^{2+} liberado pelo RS é menor a 35 do que a 25°C. Na temperatura mais baixa, acreditamos que a menor taxa de recaptação de Ca^{2+} pelo RS ($Q_{10} \sim 2.5$) deixaria, por um período maior, a concentração de Ca^{2+} aumentada no espaço subsarcolemático.

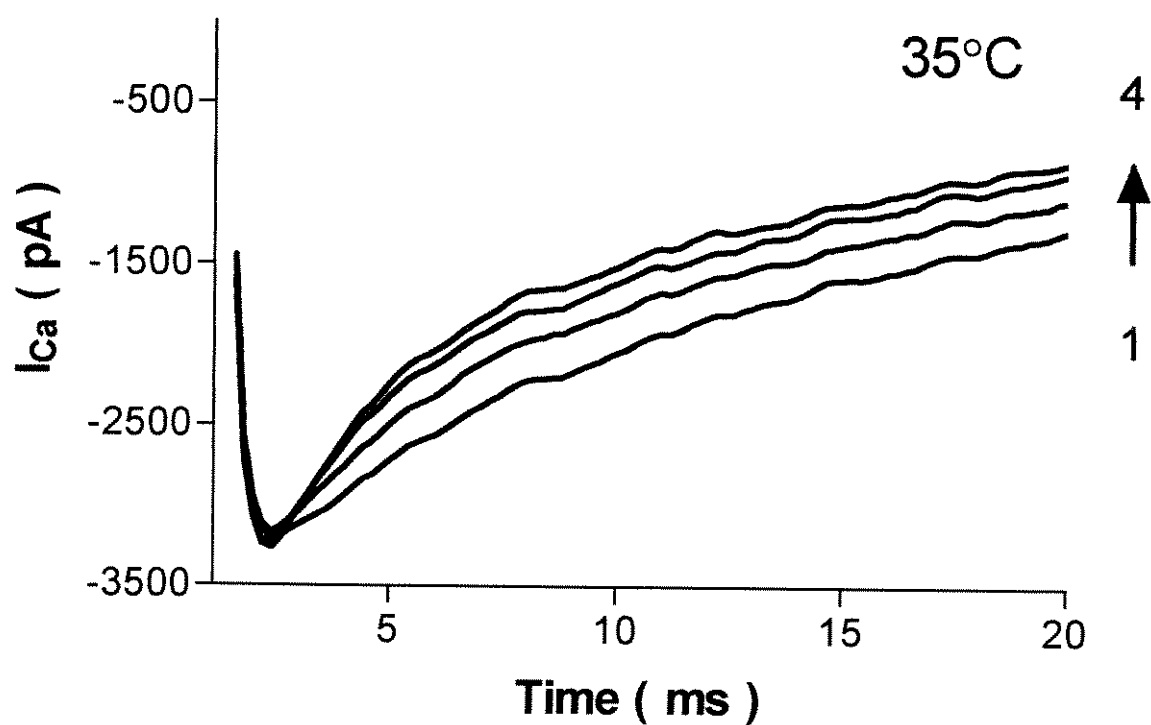
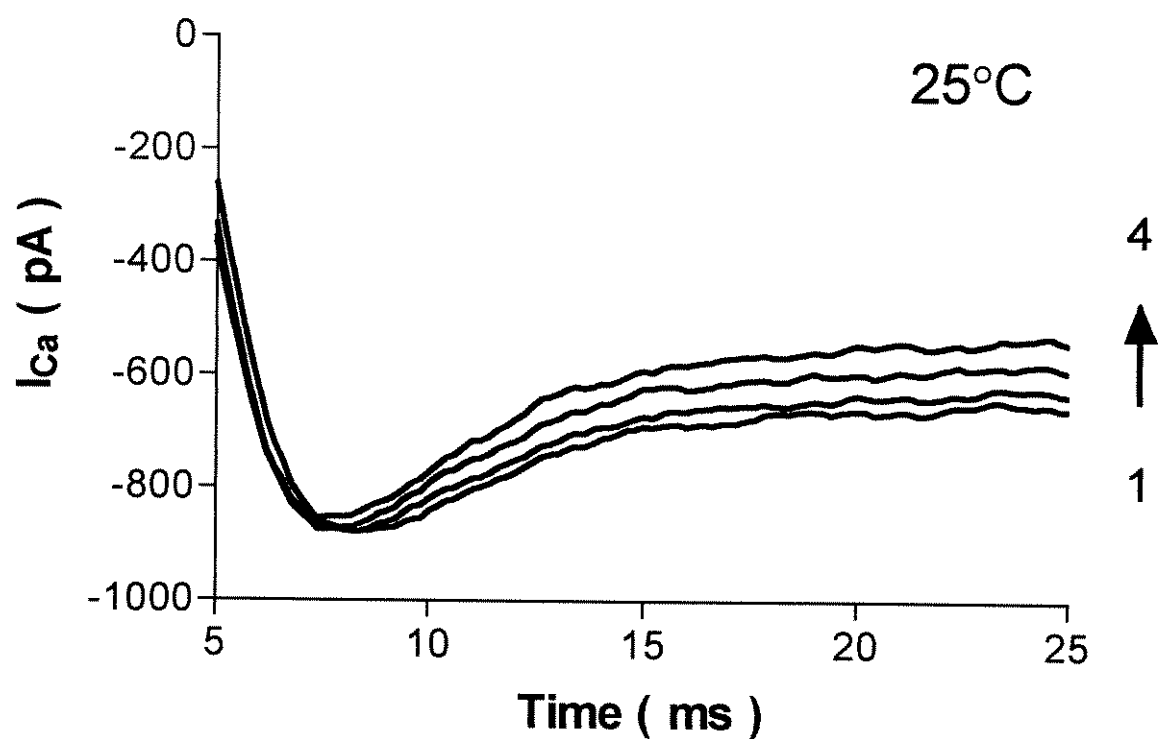


Figura 5.2 Detalhe da evolução temporal das quatro primeiras correntes após o pulso de cafeína a 25 e 35°C. Observa-se que inativação induzida pelo Ca^{2+} já é efetiva após o pico da corrente.

Observando o comportamento da inativação das correntes I_{Ca} sucessivas (Fig. 5.2), poderíamos inferir que a liberação de Ca^{2+} pelo RS começa após o pico da corrente nas duas temperaturas. Parece razoável então que, para calcular a quantidade de Ca^{2+} que atua como gatilho (*calcium trigger*) no processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , devamos integrar os traçados das correntes entre o tempo zero e o tempo de pico correspondente a cada temperatura (~ 5 ms a $25^{\circ}C$ e ~ 2.5 ms a $35^{\circ}C$). Com esta consideração, obtivemos um valor normalizado para esta quantidade de Ca^{2+} de 0.0102 ± 0.0006 pC/pF a $35^{\circ}C$ e 0.0069 ± 0.0007 pC/pF a $25^{\circ}C$. ($p < 0.001$, $n=8$). A $35^{\circ}C$, mesmo com um tempo do pico menor, o influxo de Ca^{2+} para disparar o CICR foi maior. A figura 5.3 compara os valores das integrais de I_{Ca} durante todo o PA e do início até o tempo de pico. Neste último caso, a integral foi significativamente maior a $35^{\circ}C$. Poderia ser especulado que o gatilho precisaria ser maior neste caso, para compensar o menor conteúdo de Ca^{2+} no RS encontrado nesta temperatura (Puglisi, *et al.*, 1996). Um detalhe interessante é que o valor do gatilho é sensivelmente menor (~ 20 vezes) do que a quantidade de Ca^{2+} que entra durante o PA em ambas temperaturas, significando que o processo de CICR é disparado para valores de Ca^{2+} bem menores do que o total fornecido pelos canais. O restante do Ca^{2+} seria utilizado para repor a carga do RS e/ou atuar em outros mecanismos reguladores da função celular.

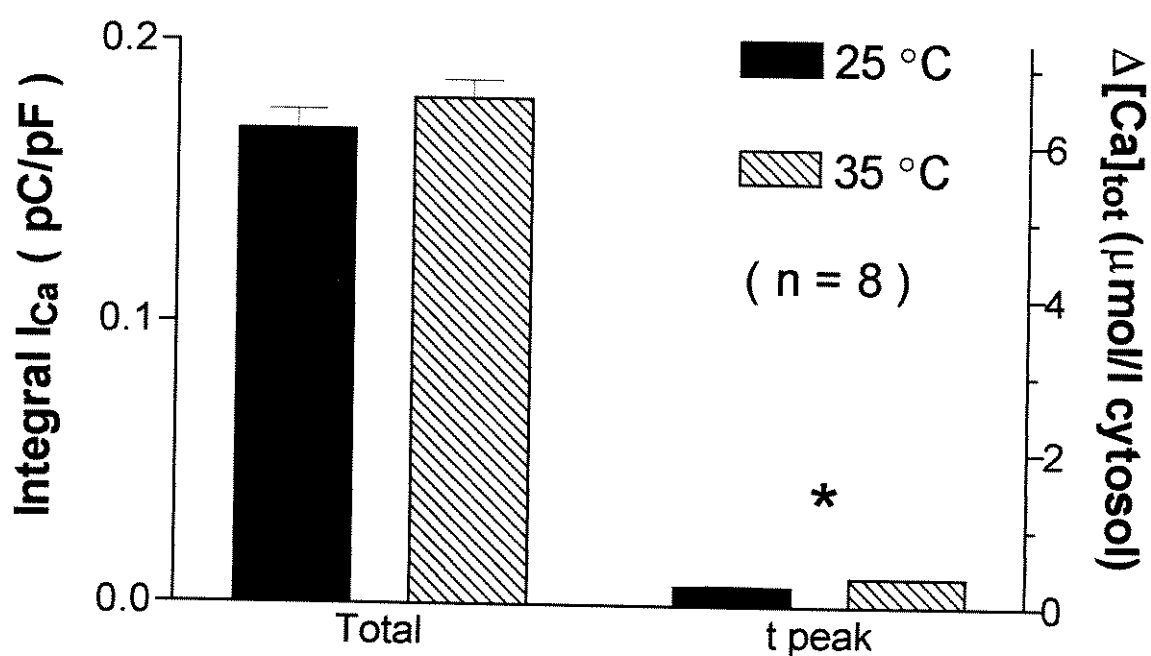


Figura 5.3 Comparação das integrais das correntes de Ca^{2+} durante o PA e do início até o tempo de pico nas duas temperaturas. Durante a duração total : 0.169 ± 0.010 pA/pF a $25^{\circ}C$ e 0.180 ± 0.06 pA/pF a $35^{\circ}C$. Até o tempo de pico : 0.0069 ± 0.0007 pA/pF a $25^{\circ}C$ e 0.0102 ± 0.0006 pA/pF a $35^{\circ}C$ ($p < 0.001$, $n=8$).

A inativação mais rápida a 35°C poderia ser explicada por: efeito direto da temperatura, (acelerando o processo de inativação) e/ou maior inativação induzida pelo cálcio a 35°C. O primeiro caso já foi abordado nos experimentos de Cavalié *et al.*, 1985 onde 10 mM EGTA foram incluídos na solução de pipeta. Neste caso, a inativação dos canais foi mais pronunciada a maiores temperaturas, independentemente do transiente de Ca^{2+} . Para avaliar a segunda hipótese, medimos $t_{1/2}$ de inativação e a integral das correntes sucessivas, nas duas temperaturas (Tabela 5.1). Os valores absolutos de $t_{1/2}$ são maiores a 25°C, porém, se normalizados com relação ao valor inicial (i.e. valor do $t_{1/2}$ da primeira corrente), o mesmo grau de inativação é encontrado (~30 %), com evolução temporal semelhante (Figura 5.4 painel superior). Além disso, foram calculadas as integrais das correntes sucessivas para avaliar o influxo de Ca^{2+} à medida que a inativação evoluía. Sem a inativação dependente do Ca^{2+} liberado pelo RS (pulso n.1), a quantidade de Ca^{2+} que entra através dos canais é o dobro do valor de regime, nas duas temperaturas (~ 60 pC no pulso n.1 e ~30 pC no regime). Uma relação semelhante foi apresentada por Terraciano e McLeod (1997) em células de cobaia tratadas com thapsigargin. A figura 5.4 (painel inferior) indica que, além da integrais atingirem o mesmo valor final de regime, o curso temporal do decaimento é semelhante nas duas temperaturas. Estas observações (semelhantes decaimentos do $t_{1/2}$ e da integral) parecem indicar que a inativação produzida pelo Ca^{2+} liberado pelo RS não é maior a 35°C, e que provavelmente a maior inativação se deve ao efeito direto da temperatura sobre o canal.

Tabela 5.1 Valores de $t_{1/2}$ e da integral das correntes de Ca^{2+} sucesivas após o pulso de cafeína, nas duas temperaturas (média ± EPM, n=2)

Pulso #	<i>t</i> 1/2 (ms)		Integral do Cálcio (pC)	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1	72.7±2.7	11.2±1.2	65.0±3.7	67.6±4.0
2	69.0±3.0	9.1±0.9	61.3±3.8	60.2±1.4
3	60.0±3.0	6.9±0.9	55.8±4.1	52.8±1.8
4	45.5±4.5	5.7±1.1	49.6±4.1	46.0±3.4
5	37.0±2.0	5.1±1.0	44.0±3.9	41.0±4.7
6	31.8±3.8	4.5±1.1	38.7±2.6	36.2±4.3
7	26.1±0.1	4.0±0.8	37.0±1.9	31.8±3.4
8	24.2±0.2	3.8±0.6	35.0±2.0	30.2±1.8
9	22.1±0.1	3.7±0.7	32.3±1.6	29.3±0.8
10	21.9±0.1	3.4±0.4	30.8±0.1	28.8±0.4

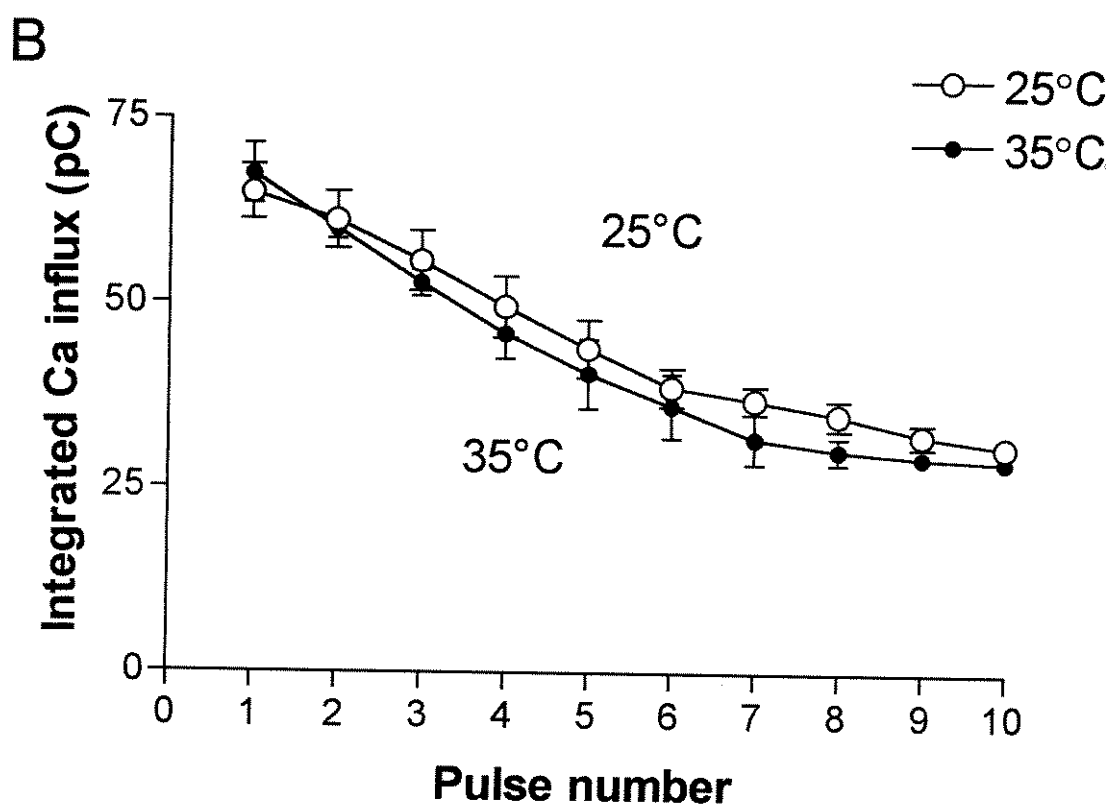
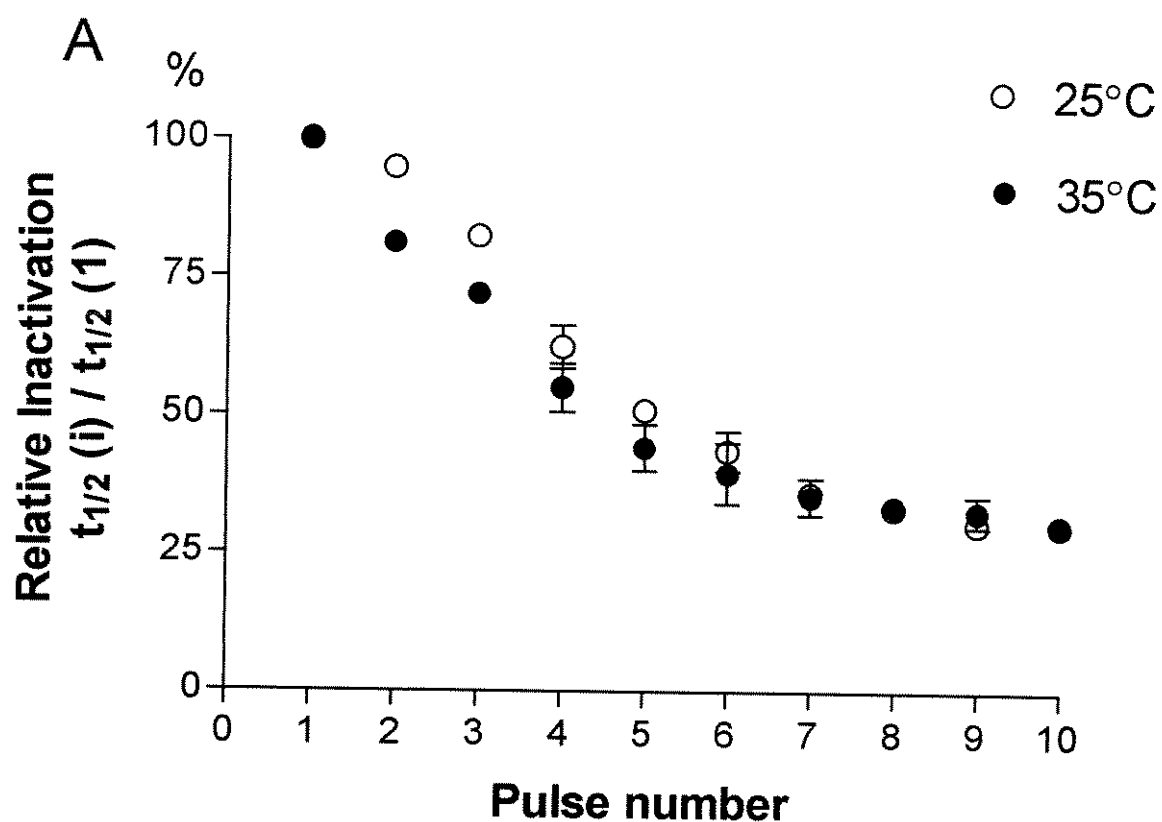


Figura 5.4 Painel superior : Evolução temporal, a cada contração, da inativação relativa da corrente de Ca^{2+} após o pulso de cafeína. Painel inferior : Valor da integral da corrente em função da contração.

Segundo a teoria de controle local do processo de excitação contração, um canal de Ca^{2+} controlaria um conjunto de receptores de rianodina (Wier *et al.*, 1994). Uma inibição rápida dos canais de Ca^{2+} do sarcolema pelo Ca^{2+} liberado do RS atuaria como um mecanismo de realimentação negativa no processo de liberação de Ca^{2+} , e os modelos que tentam simular este processo devem incorporar este fenômeno da inativação induzida pelo Ca^{2+} . A observação que o mesmo grau de inativação pode ser atingido com menores concentrações de Ca^{2+} à medida que a temperatura aumenta de 25 a 35°C representa um possível aprimoramento a ser incorporado em futuros modelos de AEC.

Entrada de cálcio através da troca Na/Ca

Mesmo sendo a entrada de Ca^{2+} através dos canais a maior fonte de Ca^{2+} para o disparo do CICR (Bouchard *et al.*, 1995), fazendo considerações termodinâmicas pode-se mostrar que a troca Na/Ca reverte seu modo de funcionamento durante o começo do PA e contribui com a entrada de Ca^{2+} (Mullins, 1981, Grantham e Cannel, 1996). Esta habilidade de inverter seu modo de funcionamento, com eventual possibilidade de disparar o CICR, foi proposta primeiramente por Berlin *et al.* (1987), trabalhando com preparações de fibras cardíacas sobrecarregadas de Ca^{2+} . Posteriormente Bers *et al.* (1988) demonstraram que era possível produzir contrações em células onde I_{Ca} tinha sido bloqueada por nifedipina se a concentração intracelular de Na fosse elevada até 15 - 20 mmol/L (condição na qual o influxo de Ca^{2+} pela troca Na/Ca é favorecido). Mais recentemente Vornanem *et al.* (1994) propuseram que a troca Na/Ca poderia disparar a liberação de Ca^{2+} no retículo a 37°C. Em nossas simulações obtivemos um maior influxo de Ca^{2+} através da troca Na/Ca a 35°C do que a 25°C. Porém, a relação $I_{\text{NaCa}} / I_{\text{Ca}}$ (que ficou em torno de 30%) não variou significativamente. Apesar do valor desta relação estar de acordo com outros dados da literatura (Grantham e Cannel, 1996), não pode ser esquecido que estamos relacionando dados obtidos experimentalmente (I_{Ca}) com dados extraídos de um modelo matemático (I_{NaCa}).

Por outro lado é interessante observar que a utilização do modelo matemático para cálculo de I_{NaCa} permitiu a observação de que o influxo de Ca^{2+} estimado seria

compatível com a quantidade necessária do íon para disparar a liberação de Ca^{2+} do RS, porém o lento desenvolvimento temporal desta corrente e a grande distância relativa entre os trocadores e os receptores de rianodina dificultariam o processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} no RS.

Mecanismos de extrusão de cálcio

A contribuição dos mecanismos de redução do Ca^{2+} citosólico (RS, troca Na/Ca e os mecanismos lentos) foi analisada utilizando contraturas induzidas por aplicação rápida de cafeína (Bassani et al., 1992). Realizamos os mesmos experimentos a 25°C e 35°C para avaliar o efeito da temperatura na contribuição relativa de cada um deles. Apesar de cada mecanismo atuar mais rapidamente a 35°C, a participação relativa de cada sistema se mantém sem modificações significativas nas duas temperaturas.

Inotropismo Hipotérmico

Já foi demonstrado que, no músculo cardíaco, a amplitude, a duração e o $t_{1/2}$ de relaxamento diminuem à medida que a temperatura aumenta de 22 a 37°C (Blinks e Koch-Weser, 1963, Mattiazzi e Nilsson, 1976). Sabendo-se que a sensibilidade dos miofilamentos diminui com a temperatura (Harrison e Bers, 1989), o inotropismo hipotérmico positivo poderia ser explicado por: 1) aumento do fornecimento de Ca^{2+} (canais e/ou RS), e/ou 2) uma diminuição da extrusão de Ca^{2+} . Como obtido neste trabalho (Fig. 4.5), o fornecimento de Ca^{2+} através dos canais permanece constante com a mudança de temperatura. Por outro lado o conteúdo de Ca^{2+} do RS está aumentado a 25°C o que produziria maior liberação fracional de Ca^{2+} (Bassani et al., 1995b), o que, aliado à lentificação dos mecanismos de remoção de Ca^{2+} a 25°C, resultaria em maior amplitude e duração dos transientes de Ca^{2+} .

Sensibilidade a temperatura dos transportadores de cálcio.

Neste trabalho, assumimos que a relação entre algum parâmetro descritivo do decaimento do transiente de Ca^{2+} ou do relaxamento (e.g. $t_{1/2}$) nas duas temperaturas poderia indicar a sensibilidade à temperatura. Denominamos arbitrariamente este índice de Q_{10} , o que lembra, mas não é estritamente, o parâmetro clássico descritivo das reações químicas. Este tipo de índice já vem sendo utilizado com o mesmo propósito na literatura (Kiyosue *et al.*, 1993). Os resultados encontrados indicam que o aumento da temperatura acelera os sistemas de transporte de Ca^{2+} estudados.

Contribuição relativa ao processo de relaxamento

No coelho, a razão entre o $t_{1/2}$ de relaxamento da contração normal e da contratura de cafeína em NT (tomada como um índice da contribuição da troca Na/Ca) foi de 0.28 a 25°C e 0.21 a 35°C (os valores exatos usando os transientes de Ca^{2+} foram 0.27 e 0.23, respectivamente). De forma análoga, tomando-se a razão entre o $t_{1/2}$ da contração normal e o $t_{1/2}$ da contratura de cafeína em 0Na 0Ca como um índice da contribuição dos mecanismos lentos os valores obtidos foram 0.02 a 25°C e 0.04 a 35°C (os valores obtidos a partir dos transientes de Ca^{2+} foram 0.03 nas duas temperaturas). Apesar de estarmos lidando com uma estimativa grosseira, ela nos permite rapidamente inferir a respeito da contribuição de cada sistema. Usando esta metodologia a contribuição da troca Na/Ca e dos mecanismos lentos para as três espécies, foi calculada. A troca Na/Ca possui uma contribuição relativa um pouco maior no gato ($47 \pm 8\%$ a 25°C e $32 \pm 5\%$ a 35°C) mas não muito diferente do que ocorre no furão ($30 \pm 4\%$ a 25°C e $28 \pm 4\%$ a 35°C) e no coelho ($28 \pm 2\%$ a 25°C e $21 \pm 3\%$ a 35°C). A participação relativa dos mecanismos lentos é similar no coelho e no gato ($\sim 2\%$) e está bastante aumentada no furão ($7 \pm 1\%$ a 25°C e $5 \pm 1\%$ a 35°C), o que coincide com valores prévios reportados na literatura usando transientes de Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1994b, 1995a) e parece ter justificado a existência de uma ATPase de Ca^{2+} na membrana mais ativa, nesta espécie.

Concluindo, apesar das mudanças nas velocidade de transporte, na amplitude e cinética dos transientes de Ca^{2+} e das contrações, a participação relativa dos mecanismos de transporte não é sensivelmente afetada pelo aumento da temperatura de 25 para 35°C nas espécies estudadas. A diminuição na velocidade de transporte dos sistemas encarregados da remoção de Ca^{2+} explicaria, em parte, o inotropismo hipotérmico positivo, observado em miócitos ventriculares das três espécies estudadas.

Capítulo 6

Bibliografía

- ARREOLA, J., DIRKSEN, R.T., SHIEH, R-C., WILLIFORD, D.J., e SHEU, S-S. Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients under action potential clamp in guinea-pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **261**: C393-C397, 1991.
- BARCENAS-RUIZ, L., e WIER, W.G. Voltage dependence of intracellular $[\text{Ca}]_i$ transients in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **61**:148-154, 1987.
- BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M., e BERS, D. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* **453**: 591-608, 1992.
- BASSANI, J.W.M., BASSANI, R.A., e BERS, D. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells : species - dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.* **476**: 279-293, 1994 a.
- BASSANI, J.W.M., BASSANI, R.A., e BERS, D. Relaxation in ferret ventricular myocytes :unusual interplay among calcium transport systems. *J. Physiol.* **476**: 295-308, 1994 b.
- BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M., e BERS, D.M. Relaxation in ferret ventricular myocytes : role of the sarcolemmal Ca ATPase. *Pfluegers Arch.* **430**: 573-578, 1995 a.
- BASSANI, J.W.M., YUAN, W. e BERS, D.M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **268**: C1313-C1329, 1995 b.
- BEAN, B.P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* **86**: 1-30, 1985.
- BERLIN, J.R., CANNEL, M.B., LEDERER, W.J. Regulation of twitch tension in sheep cardiac Purkinje fibers during calcium overload. *Am. J. Physiol.* **253**: H1540-H1547, 1987.

- BERS, D.M. Excitation - contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. 1985.
- BERS, D.M., e BERLIN, J.R. The kinetics of $[Ca]_i$ decline in cardiac myocytes depends on peak $[Ca]_i$. *Am. J. Physiol.* **268**: C271-C277, 1995.
- BERS, D.M., CHRISTENSEN, D.M., NGUYEN, T.X. Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20** : 405-414, 1988.
- 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.
- BERS, D.M., BRIDGE, J.H.B., e SPITZER, K.W. Intracellular Ca^{2+} transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* **417**:537-553, 1989.
- BERSOHN, M.M., VEMURI, R., SCHUL, D.W., WEISS, R.S., e PHILIPSON, K. Effect of temperature on sodium-calcium exchange in sarcolemma from mammalian and amphibian hearts. *Biochim Biophys. Acta.* **1062**: 19-23, 1991.
- BLINKS, J.R., KOCH-WESER, J. Physical factors in the analysis of the action of drugs on myocardial contractility. *Pharmacol. Rev.* **15**: 531-599, 1963.
- BOUCHARD, R.A., CLARK, R.B., e GILES W.R. Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **76**: 790-801, 1995.
- BURTON, A.C., Physiology and Biophysics of the Circulation. 2.Ed. Year Book Medical Publishers. USA, 1972.

- CARAFOLI, E. Mitochondria, Ca^{2+} transport and the regulation of heart contraction and metabolism. *J. Mol. Cell Cardiol.* **7**: 83-89, 1975.
- CARONI, P., e CARAFOLI, E. The Ca^{2+} - pumping ATPase of heart sarcolemma. *J. Biol. Chem.* **256**: 3263-3270, 1981.
- CAVALIE, A., McDONALD, T.F., PELZER, D., e TRAUTWEIN, W. Temperature - induced transitory and steady - state changes in the calcium current of guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **405**: 294-296, 1985.
- DEBETTO, P.F., CUSSINATO, F., e LUCIANI, S. Temperature dependence of Na/Ca exchange activity in beef-heart sarcolemmal vesicles and proteoliposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 205-210, 1990.
- DELBRIDGE, L.M., BASSANI, J.W.M., e BERS, D.M. Steady-State twitch Ca fluxes and cytosolic Ca buffering in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **270**: C192-C199, 1996.
- DiFRANCESCO, D. e NOBLE, D. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **307**: 353-398, 1985.
- DOERR, T., DENGGER, R., e TRAUTWEIN, W. Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflugers Arch.* **413**: 599-603, 1989.
- DOERR, T., DENGGER, R., DOERR, A., e TRAUTWEIN, W. Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea-pig studied with action potential clamp. *Pflugers Arch.*, **416**: 230-237, 1990.
- FABIATO, A. Calcium - induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**: C1-C14, 1983.

- GLOSSMANN, H., e STRIESSNIG, J. Molecular Properties of Calcium Channels *Rev. Physiol. Biochem Pharmacol.* **14**:1-105, 1990.
- GRANTHAM, C.J., e CANNEL, M.B., Ca^{2+} influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **79**: 194-200, 1996.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., e TSIEN R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol Chem.* **250**: 3440-3450, 1985.
- GUYTON, A.C., Fisiologia Humana. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1998.
- HARRISON, S.M., e BERS, D.M. Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J. Gen. Physiol.* **93**: 411-428, 1989.
- HIRANO, Y., FOZZARD, H.A., JANUARY, C.T. Characteristics of L-type and T-type Ca^{2+} currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am. J. Physiol.* **256**: H1478-1492, 1989.
- HIRAOKA, M. e KAWANO, S. Calcium sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol.* **410**: 187-212, 1989.
- HOVE-MADSEN, L e BERS, D.M. Passive Ca buffering and SR Ca uptake in permeabilized rabbit ventricular myocytes. *Am J. Physiol* **264**: C677-C686, 1993.
- HRYSHKO, L.V., STIFFEL, V.M., e BERS, D.M. Rapid cooling contractures as an index of sarcoplasmic reticulum calcium content in rabbit ventricular myocytes *Am. J. Physiol.* **257**: H1369-H1377, 1989.
- ISENBERG, G., e TRAUTWEIN, W. Temperature sensitivity of outward current in cardiac Purkinje fibers : Evidence for electrogenicity of active transport. *Pflugers Arch.* **358**: 225-234, 1975.

- KAWANO, S., HIRAYAMA, Y. e HIRAOKA M. Activation mechanism of Ca^{2+} - sensitive current in rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol.* **486**: 593-604, 1995
- KIYOSUE, T., ARITA, M., MURAMATSU, H., SPINDLER, A.J., e NOBLE D. Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperature in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* **468**: 85-106, 1993.
- KLOCKNER, U., SCHIEFER, A., e ISENER, G. L-type Ca-channels : Similar Q_{10} of Ca-, Ba- and Na-conductance points to the importance of ion-channel interaction. *Pflugers Arch.* **415**: 638-641, 1990.
- LEBLANC, N., e HUME, J.R., Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science.* **248**: 372-376, 1990.
- LEE, K.S., MARBAN, E., TSIEN, R.W. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* **364**: 395-411, 1985.
- LEHNINGER, A.L., Ca^{2+} transport by mitochondria and its possible role in the cardiac excitation - contraction relaxation cycle. *Circ. Res.* **34/35** Suppl III: 83-89, 1974.
- LUO, C-H., e RUDY, Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. *Circ. Res.* **74**: 1071-1096, 1994.
- MATTIAZZI, A.R., e NILSSON, E. The influence of temperature on time course of the mechanical activity in rabbit papillary muscle. *Acta Physiol Scand.* **97**: 310-318, 1976.
- MATSUOKA, S., e HILGEMANN, D.W. Steady-State and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. *J. Gen. Physiol.* **100**: 963-1001, 1992.
- MULLINS, L.J., A mechanism for Na/Ca transport *J. Gen. Physiol.* **70**: 681-695, 1977.

- MULLINS, L.J., Ion transport in heart. Raven Press, New York. EEUU. 1981.
- PELZER, D., PELZER, S., e McDONALD, T.F. Properties and regulation of calcium channels in muscle cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **114**: 107 - 207, 1990.
- PUGLISI, J.L., BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M., AMIN, J.A., BERS, D.M., Temperature and relative contributions of Ca transport systems inn cardiac myocyte relaxation. *Am. J. Physiol.* **270**: H1772-H1778, 1996.
- REUTER, H., e SEITZ, N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol.* **195**: 45-70, 1968.
- ROMAIN, C., KARLSSON, J-O, e SCHINDLER H. Activity of cardiac L-type Ca^{2+} channels is sensitive to cytoplasmic calcium. *Pflugers Arch.* **421**: 516-518, 1992.
- SHANNE, F.A.X., KANE, A.B., YOUNG, E.E., e FARBER, J.L. Calcium dependence of toxic cell death : A final common pathway. *Science*. **206**: 700-702, 1979.
- SHATTOCK, J.M., e BERS, D. Inotropic response to hypothermia and the temperature dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle : implications for the excitation - contraction coupling. *Circ. Res.* **60**: 761 - 771, 1987.
- SHIKEGAWA, M., FINEGAN, J.M., e KATZ, A.M. Calcium transport ATPase of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **251**: 6894-6900, 1976.
- SIPIDO, K.S., CALLEWAERT, G., e CARMELIET, E. Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Cir. Res.* **76**: 102-109, 1995.
- SIPIDO, K.S., CALLEWAERT, G., e CARMELIET, E. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - dependent chloride current in single purkinje cells from rabbit heart. *J. Physiol.* **468**: 641-667, 1993.

- SPERELAKIS, N., e BANKS, R.O., Physiology : essentials of basic science. Little, Brown & Company. Boston, Massachusetts, EEUU. 1993.
- STERN, M.D. Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium*. **13**: 183- 192, 1992.
- SUTKO, J.L., e WILLERSON, J.T. Ryanodine alteration of the contractile state of rat ventricular myocardium. Comparison with dog, cat and rabbit ventricular tissues. *Circ. Res.* **46**: 332-343, 1980.
- TERRACCIANO, C.M.N., e MacLEOD, K.T. Measurements of Ca^{2+} entry and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content during the cardiac cycle in guinea pig and rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* **72**: 1319-1326, 1997.
- VORNANEN, M., SHEPERD, N., e ISENBERG, G. Tension - voltage relations of single myocytes reflects Ca release triggered by Na/Ca exchange at 35°C but not at 23°C. *Am. J. Physiol.* **267**: C623-C632, 1994.
- WIER, W.G., EGAN, T.M., LOPEZ-LOPEZ, J.R., BALKE, C.W. Local control of excitation - contraction coupling in rat heart cells. *J. Physiol.* **474**: 463-471, 1994.
- YUAN, W., GINSBURG, K.S., e BERS, D.M. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **493**: 733-746, 1996.
- ZYGMUNT, A.C. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am. J. Phys.*, **36**: H1984-H1995, 1994.
- ZYGMUNT, A.C. e GIBBONS, W.R. Calcium - Activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* **68**: 424-437, 1991.