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

Liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos de ratos estimulados em diferentes freqüências

TESE DE DOUTORADO

Autor: Rafael de Almeida Ricardo
Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica. Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda
Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz
Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa

Campinas
2010

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

Ricardo, Rafael de Almeida
R357L Liberação fracional de Ca2+ do retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos de ratos estimulados em diferentes freqüências / Rafael de Almeida Ricardo. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Jose Wilson Magalhães Bassani, Rosana Almada Bassani.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Coração – Ventrículo esquerdo. 2. Força muscular. 3. Cálcio. 4. Fluorescência. 5. Retículo sarcoplasmático. I. Bassani, Jose Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Fractional sarcoplasmic reticulum Ca2+ release in isolated rat ventricular myocytes stimulated at different frequencies
Palavras-chave em Inglês: Heart - Left ventricle, Muscular strength, Calcium, Fluorescence, Sarcoplasmic reticulum
Área de concentração: Engenharia Biomédica
Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica
Banca examinadora: Wamberto Antonio Varanda, Jader dos Santos Cruz, Orlando Petrucci Junior , Eduardo Tavares Costa
Data da defesa: 24/09/2010
Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

Candidato: Rafael de Almeida Ricardo

Data da Defesa: 24 de setembro de 2010

Título da Tese: "Liberação fracional de Ca2+ do retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos de ratos estimulados em diferentes frequências"

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente): _____

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz: _____

Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda: _____

Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr: _____

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa: _____

Dedico este trabalho à minha
querida esposa Helena e
aos meus pais, Durval e Fátima.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani, serei sempre grato pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos, que foram fundamentais para o desenvolvimento não apenas deste trabalho, mas também para minha formação acadêmica e pessoal. Obrigado pelos exemplos!

Agradeço especialmente a Prof. Dra. Rosana Almada Bassani pelo acompanhamento e orientação diários, pelas sugestões e discussões, pela organização e coordenação dos laboratórios que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Jose Hamilton Matheus Nascimento e Prof. Dr. Emiliano H. Medei pela oportunidade de acompanhar alguns experimentos de *patch clamp*.

A todos os funcionários e estagiários da Coordenadoria de P&D – CEB – UNICAMP, em especial às secretárias Nirlei, Marlene e Adriana; ao engenheiro Sérgio Moura e técnicos Eugênio, Mauro e Carlos, pelo apoio técnico em eletrônica e mecânica. Agradeço especialmente à Elisângela pela amizade e pelo preparo de miócitos e soluções fisiológicas.

Aos alunos e ex-alunos do departamento: Diogo, Marina, Alexandra, Daniele e em especial ao grande amigo Pedro, pelo convívio e amizade.

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

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

Apoio

Este trabalho teve o apoio da Fapesp (Bolsa Proc.: 06/05717-7) e do CNPq (Proc.: 300632/2005-3).

Resumo

A relação força-freqüência é uma característica intrínseca do músculo cardíaco, e se manifesta de diferentes formas, dependendo da espécie, e seus mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. Um possível mecanismo é a modificação da liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS), principal fonte do íon para ativar a contração em miocárdio de mamíferos. O principal objetivo deste trabalho foi determinar a relação entre a liberação fracional de Ca^{2+} do RS (FR) e a freqüência estimulatória em miócito ventricular isolado de rato. O potencial de ação (PA) representativo medido em cada freqüência de interesse foi registrado com a técnica *perforated patch clamp* em temperatura ambiente (23°C). A corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) e o transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$, medido com indo-1) foram registrados simultaneamente por meio da técnica *action potential clamp*. A FR em cada freqüência foi considerada como a relação entre a diferença entre variação total de $[Ca^{2+}]$ e a integral de I_{CaL}, e a carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$). A duração do PA a 90% de repolarização (APD90) aumentou de 76 ± 9 ms em 0,2 Hz para 130 ± 11 ms em 2 Hz ($p<0,05$). Em 0,2 Hz, o pico de I_{CaL} foi -4,5 ± 0,7 pA/pF e, com o aumento da freqüência para 2 Hz, foi reduzido para -2,7 ± 0,4 pA/pF ($p<0,05$). A $\Delta[Ca^{2+}]_i$ caiu de 603 ± 56 para 408 ± 32 nM ($p<0,05$), em 0,2 e 2 Hz, respectivamente. A FR também diminuiu com o aumento da freqüência, de 0,81 ± 0,02 em 0,2 Hz para 0,54 ± 0,02 em 2 Hz ($p<0,01$), enquanto a $[Ca^{2+}]_{RS}$ permaneceu constante para todas as freqüências utilizadas. O aumento da freqüência estimulatória reduziu a $\Delta[Ca^{2+}]_i$ possivelmente devido à redução da FR. É possível que a redução do pico de I_{CaL}, que é o principal *trigger* de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, seja a principal causa da redução da FR.

Abstract

The force-frequency relationship is an intrinsic characteristic of cardiac muscle. It is manifested in different ways depending on the species, and its mechanisms still remain to be completely understood. A possible mechanism is the variation of Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum (SR), the main source of the ion for contraction activation in mammalian myocardium. The main goal of this work was to determine the relationship between the fractional SR Ca^{2+} release (FR) and stimulatory frequency in isolated rat ventricular myocytes. Action potentials (AP) were recorded at 23ºC using the perforated whole-cell patch-clamp technique at different rates, and the representative AP at each rate was used later as stimulus waveforms (action potential clamp). L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) and intracellular Ca^{2+} transient ($\Delta[Ca^{2+}]_i$, measured with indo-1) were recorded simultaneously using action potential clamp. FR at a twitch was assumed to be the ratio of the systolic variation in total $[Ca^{2+}]$ minus I_{CaL} integral, and the SR content ($[Ca^{2+}]_{SR}$). AP duration at 90% repolarization (APD90) increased from 76 ± 9 ms at 0.2 Hz to 130 ± 11 ms at 2 Hz ($p<0.05$). At 0.2 Hz, I_{CaL} peak was -4.5 ± 0.7 pA/pF, and it decreased to -2.7 ± 0.4 pA/pF with increasing frequency to 2 Hz ($p<0.05$). $\Delta[Ca^{2+}]_i$ decreased from 603 ± 56 nM to 408 ± 32 nM ($p<0,05$), at 0.2 and 2 Hz, respectively. FR also decreased with frequency, from 0.81 ±0.02 at 0.2 Hz to 0.54 ±0.02 at 2 Hz ($p<0.01$), whereas $[Ca^{2+}]_{SR}$ did not change significantly. The negative relationship between Ca^{2+} transient amplitude and stimulation rate is likely to be due to the observed decrease in SR Ca^{2+} release. Lower FR at higher rates might be due to decrease in I_{CaL} peak, which is the main trigger of SR Ca^{2+} release.

Lista de Abreviaturas

APC – *action potential clamp*

APD – *action potential duration* (duração do potencial de ação)

APD20 – duração do PA até 20% da repolarização

APD90 – duração do PA até 90% da repolarização

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

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

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

CCD – *charge coupled device*

CEB – Centro de Engenharia Biomédica

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

C_m – capacitância de membrana

DBV – detector de borda de sinal de vídeo

DC – débito cardíaco

dV/dt – derivada temporal da fase de despolarização do potencial de membrana

E_m – potencial de membrana

FC – freqüência cardíaca

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

I_{CaL} – corrente de Ca^{2+} tipo L

I_K – corrente tardia retificadora de K^+

I_{K1} – corrente de entrada retificadora de K^+

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

I_{Na} – corrente de sódio

I_{to} – corrente transitória de saída de K^+

LED – *light emmiting diode*

NCX – trocador Na^+/Ca^{2+}

PA – potencial de ação

PJL – potencial de junção líquida

PMT – tubo fotomultiplicador

RFF – relação força freqüência

RS – retículo sarcoplasmático

t_{0mV} - tempo para repolarização até 0 mV

Ca^{2+} via I_{CaL}

twitch – contração evocada por estimulação elétrica

UV – ultra-violeta

V_c – volume celular

VCR – aparelho gravador de vídeo cassete

$V_{m\text{-}dia}$ – potencial membrana em repouso

VS – volume sistólico

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

$\Delta[Ca^{2+}]_{T,tw}$ – variação da concentração intracelular de Ca^{2+} total durante um transiente

$\Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa}$ – incremento na concentração intracelular de Ca^{2+} total devido ao influxo de

ΔVm – amplitude do potencial de ação

$\int I_{CaL}$ – integral temporal da corrente de Ca^{2+} tipo L

τ_{ativ} – constante de tempo de ativação da corrente de Ca^{2+} tipo L

τ_{inat} – constante de tempo de inativação da corrente de Ca^{2+} tipo L

Sumário

1. Introdução **01**

2. Objetivos **10**

3. Materiais e Métodos **12**

3.1 – Animais 13

3.2 – Soluções fisiológicas 13

3.3 – Isolamento de células 14

3.4 – *Set-up* experimental 15

3.5 – Medição de $[Ca^{2+}]_i$ com indo-1 17

3.6 – Microeletrodos 18

3.7 – Potencial de junção líquida 18

3.8 – Experimentos de *patch-clamp* 20

3.9 – Procedimentos experimentais 22

3.10 – Análise estatística dos dados 31

4. Resultados **32**

4.1 – Medições eletrofisiológicas 33

4.2 – Efeitos eletrofisiológicos da freqüência estimulatória 39

4.3 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o acoplamento excitação-contração 48

5. Discussão e Conclusões **56**

5.1 – Capacitância de membrana 57

5.2 – Caracterização da corrente de Ca^{2+} tipo L 57

5.3 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o potencial de ação 59

5.4 – Efeito da freqüência estimulatória sobre I_{CaL} 64

5.5 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o transiente de Ca^{2+} e FR 66

5.6 – Considerações fisiopatológicas 67

5.7 – Conclusões 69

6. Referências bibliográficas **70**

1 Introdução

1 Introdução

O coração é a principal bomba propulsora do sistema circulatório, que tem por função suprir sangue em quantidade e pressão adequadas para todo o organismo, não apenas em condições de repouso. Há condições em que o fluxo de sangue ejetado pelo coração é aumentado, como por exemplo, a hipotensão arterial e o exercício físico. Nesses casos, sob influência de sinalizadores neurais e/ou humorais, o aumento do volume de sangue ejetado por unidade de tempo é realizado pelo aumento da força desenvolvida a cada contração e pelo aumento da freqüência de bombeamento.

Fisiologicamente, a freqüência cardíaca (FC) é um determinante direto do fluxo de sangue bombeado pelo coração, uma vez que o débito cardíaco (DC), definido como a quantidade de sangue bombeada por minuto, é dado por:

$$DC = FC \bullet VS \tag{1.1}$$

onde VS corresponde ao volume ventricular ao final da diástole subtraído do volume ventricular ao final da sístole, ou seja, é o volume de sangue ejetado do ventrículo na sístole. Assim, em regime permanente, somando-se os valores de VS de cada sístole no período de 1 minuto obtém-se DC. Dentro do escopo do presente trabalho, não serão analisadas as variáveis envolvidas na determinação de FC e de VS, mas vamos considerar que, em uma aproximação de primeira ordem, se VS permanecer constante, DC será maior quanto maior for FC. Na realidade, como VS depende, dentre outros fatores, da força desenvolvida pelo músculo cardíaco, o seu valor, longe de ser uma constante, depende primariamente de fatores que estão implicados na geração de força pela maquinaria contrátil das células miocárdicas. Além disso, FC e VS não são independentes: a variação de qualquer um deles pode levar à modificação de ambos, via mecanismos reflexos e modulação da atividade cardíaca por eferências autonômicas. Portanto, a regulação de um parâmetro tão fundamental como DC pelo ajuste de FC e VS não é simples e não poderia ser descrita, de modo completo, apenas pela equação 1.1.

A FC é de fácil medição não-invasiva. A simples detecção do complexo QRS do eletrocardiograma permite a estimativa dos intervalos entre batimentos cardíacos e da FC média. Já sabemos que FC não é constante, ou seja, os intervalos entre contrações do coração não são regulares, mas estão sujeitos a variações substanciais *in vivo* (e.g.

arritmia respiratória fisiológica, Yasuma & Hayano, 2004). Estas variações têm sido correlacionadas ao grau de modulação autonômica da atividade cronotrópica (Aubert & Ramaekers, 1999; Stein & Kleiger, 1999; Lewis, 2005), que pode estar associada a patologias (Havilicekova *et al.*, 2009).

O acesso a VS é mais complexo. Como VS depende do comportamento contrátil da câmara cardíaca, o que se busca é a identificação e conhecimento dos seus determinantes primários, que, em última análise, são aqueles que determinam o desenvolvimento de encurtamento e força no coração. Os mecanismos celulares envolvidos no processo de contração miocárdica não são independentes da FC. É neste contexto que surge o interesse pela chamada relação força (ou VS)-freqüência (RFF), que há tantos anos vem interessando pesquisadores que investigam o inotropismo cardíaco.

O estudo da RFF teve início há mais de 100 anos, com o trabalho de Bowditch (1871), no qual foi descrito o fenômeno da escada (*Treppe*), ou seja, aumento progressivo da força contrátil acompanhando um aumento da freqüência estimulatória do músculo cardíaco. Muitos trabalhos se seguiram, com variadas configurações experimentais, que possibilitaram a análise detalhada de inúmeros conceitos, como restituição mecânica (Braveny & Kruta, 1958), relação força-intervalo (Koch-Weser & Blinks, 1963), fenômeno de escada (Woodworth, 1902), decaimento ou potenciação pós-pausa, resposta a pulsos pareados (Hilgemann, 1986), *alternans* (Wohlfahrt, 1982) e potenciação pós-extrassistólica (Hoffman *et al.*, 1956).

Existem muitos fatores que podem afetar o comportamento da RFF e determinar, por exemplo, o seu ponto ótimo (Koch-Weser & Blinks, 1963); contudo, sabe-se hoje que, subjacente às alterações de força, estão os mecanismos envolvidos no transporte e regulação celular de Ca^{2+} e de acoplamento excitação-contração.

A Figura 1.1 ilustra os principais mecanismos que são acionados, desde o aparecimento da atividade elétrica até a contração do miócito cardíaco. Durante o potencial de ação (PA), Ca^{2+} entra na célula via canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L (gerando a corrente de Ca^{2+} tipo L - I_{CaL}). O Ca^{2+} que entra pode ativar diretamente os miofilamentos, mas, de modo importante, se liga aos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), provocando a liberação de grande quantidade do estoque do íon desta organela, que é a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração. Ca^{2+} se difunde até os miofilamentos e se liga à troponina C, disparando a contração. Para que o íon se dissocie dos miofilamentos e o relaxamento ocorra, a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) precisa ser reduzida. Neste processo, atuam 4 mecanismos (Bassani *et al.*,

1992, 1994a): 2 rápidos (captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS e extrusão de Ca^{2+} pelo trocador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX)) e 2 lentos (extrusão via ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e captação pelo uniporter mitocondrial de Ca^{2+}). No canto superior direito da Figura 1.1 estão ilustrados os eventos primários: a ocorrência do PA dispara uma variação transitória de $[Ca^{2+}]_i$, conhecida como transiente de Ca^{2+} que é o elo de ligação entre a excitação elétrica da membrana e a contração da célula muscular. O conjunto de todos os eventos, desde o aparecimento do PA até o disparo da contração, é conhecido como acoplamento excitação-contração (Bers, 2002). Para condições aproximadamente estáveis da sensibilidade dos miofilamentos ao íon Ca^{2+}, o transiente de Ca^{2+} determina o curso temporal e a amplitude (portanto a potência) das contrações do músculo cardíaco.

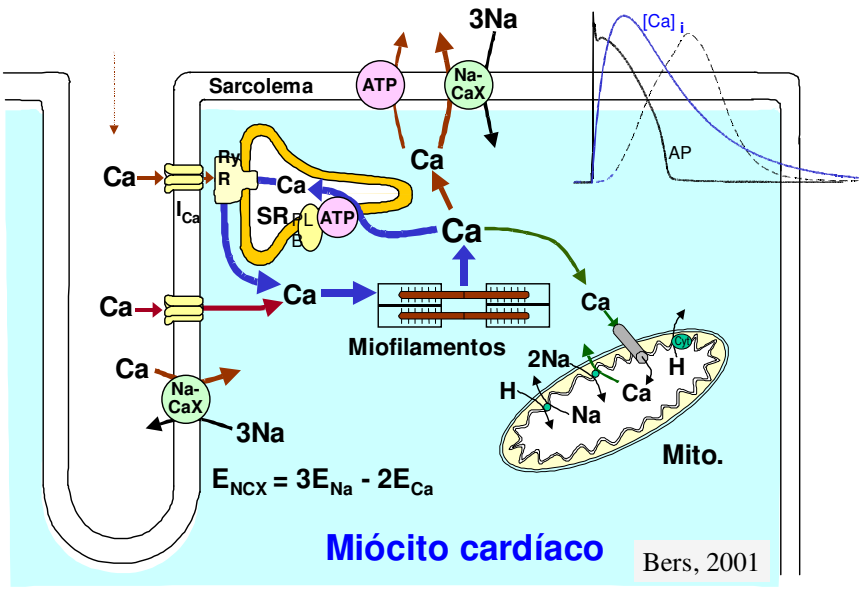

Figura 1.1 – Principais mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação contração nas células cardíacas (mod. de Bers, 2002). Veja texto para detalhes.

A Figura 1.2 ilustra um caso típico de mudança da amplitude das contrações causadas por alteração da freqüência estimulatória. De acordo com Bers (2001), vários fatores podem contribuir para o aumento de força devido ao aumento da freqüência de 0,5 para 1,5 Hz, neste caso: 1) aumento de $[Ca^{2+}]_i$ por aumento da corrente de entrada do íon (I_{CaL}); 2) aumento da carga de Ca^{2+} do RS; 3) redução da atividade extrusora de Ca^{2+} do NCX, devido ao aumento da concentração intracelular de Na^{+}; 4) alteração da quantidade de Ca^{2+} liberada, secundária ao aumento de carga e possivelmente devido a outros fatores.

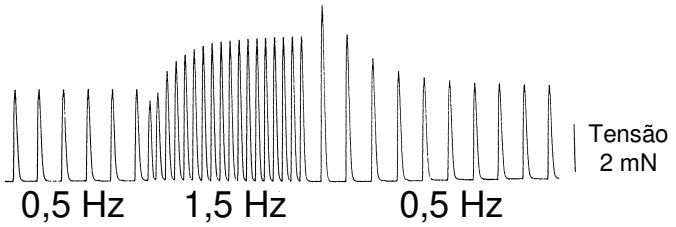

Figura 1.2 – Mudança de freqüência estimulatória em músculo papilar isolado coelho. Após estabilização sob estimulação a 0,5 Hz, a freqüência é aumentada para 1,5 Hz e, a seguir, retornada a 0,5Hz (mod. de Bers, 2001).

A RFF miocárdica não é igual em todas as espécies. Considerando na mesma faixa de freqüência (0,1 a 3 Hz), a relação é positiva no coelho, no cobaia e em humanos, mas é negativa no rato e no coração humano insuficiente. Além disso, no caso da RFF positiva do coelho e do homem, o aumento de força segue paralelo ao aumento de carga de Ca^{2+} do RS. Por outro lado, no rato normal e no coração humano insuficiente, a carga reticular de Ca^{2+} praticamente não se altera com a mudança da freqüência, embora a RFF seja negativa (Pieske *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000; Bers, 2001). Torna-se claro, portanto, que a RFF varia com a espécie animal e diferentes condições fisiopatológicas para a mesma espécie.

O miocárdio de rato e camundongo apresenta carga de Ca^{2+} reticular relativamente alta, mesmo em freqüências muito baixas, fato que é explicado em parte pela concentração intracelular de Na^{+} elevada no miocárdio destas espécies (Shattock & Bers, 1989; Bers, 2001). Deste modo, o aumento da freqüência praticamente não causa aumento do conteúdo de Ca^{2+} do RS, podendo até mesmo reduzi-lo (Maier *et al.*, 2000). Esta baixa capacidade de aumento do estoque do RS com a freqüência poderia ser um dos determinantes da RFF negativa em roedores, particularmente porque RFF positiva pode ser observada em preparações de ratos que apresentam carga de Ca^{2+} do RS mais baixa em freqüências menores (Frampton *et al.*, 1991; Bers, 2001; Bassani *et al.*, 2009; Bassani *et al.*, 2009).

A questão que se apresenta é se mudanças na freqüência podem *per se* ou indiretamente afetar o equilíbrio celular de Ca^{2+} e, portanto, a RFF. Mudanças na freqüência estimulatória afetam a duração do potencial de ação (APD, Boyett & Jewell, 1978; Attwell *et al.*, 1981). Dependendo da espécie, a relação APD-frequência pode ser negativa, como é o caso do gato, cobaia e humano (Li *et al.*, 1999; Carmeliet, 2004) ou

positiva, como é o caso do rato (Shigematsu *et al.*, 1997; Fauconnier *et al.*, 2003; presentes resultados), do hamster (Kocic *el al.*, 2002) e do coelho (Bassani *et al.*, 2004).

A Figura 1.3 ilustra um PA cardíaco e correntes envolvidas na sua geração (Bassani, 2006). De modo geral, o curso temporal do PA é influenciado por correntes despolarizantes (*e.g.*, correntes dependentes de tensão, de entrada de Na^+ e Ca^{2+}, como I_{Na} e $I_{Ca,L}$, respectivamente) e repolarizantes (*e.g.*, de saída de K^+, como I_{to}, I_K e I_{K1}). Mudanças no curso temporal do PA podem refletir mudanças nos tipos, cinética e amplitude destas correntes. Mais do que as correntes $I_{Ca,L}$ e I_{Na}, as correntes de K^+ têm sido identificadas como importantes determinantes das mudanças na forma de onda do PA (Nerbone *et al.*, 2001; Oudit *et al.*, 2001; Roseti *et al.*, 2001).

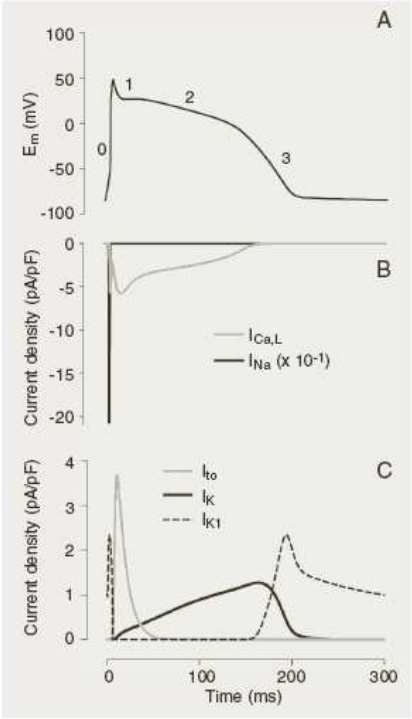

Figura 1.3 – Potencial de ação e correntes iônicas em modelo de célula ventricular de coelho. Fase 0 (*upstroke*): I_{Na} rapidamente leva o potencial de membrana para valores positivos a partir do repouso; fase 1 (repolarização rápida ou parcial): a contribuição maior nesta fase é da corrente transitória de saída de K^+ (I_{to}); Fase 2 (platô), caracterizada pela variação lenta do potencial de membrana (formando um platô com duração bastante variável), e balanço das correntes despolarizantes (principalmente $I_{Ca,L}$) e repolarizantes (principalmente retificadoras de saída de K^+, aqui representadas por I_K); Fase 3 (repolarização tardia), atribuída à redução da corrente $I_{Ca,L}$ e aumento gradual de I_K; considera-se que I_{K1} participe da repolarização terminal. Fase 4 (diástole

elétrica): potencial de membrana retorna aos níveis de repouso, cuja estabilidade envolve I_{K1}. Mod. de Bassani (2006).

Alterações na forma e amplitude do PA podem gerar profundas alterações no transiente de Ca^{2+}. Ao mesmo tempo, mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ podem afetar não só correntes de membrana, como também inúmeros outros mecanismos que afetam o transporte e a liberação de Ca^{2+} pelo RS. Em outras palavras, a FC altera o PA e este afeta o transiente de Ca^{2+} que pode, por sua vez, afetar o PA, o que torna o controle experimental para estudo da RFF bastante complexo.

Durante uma contração, o RS libera uma fração do seu conteúdo, e não sua carga total (Bassani *et al*., 1993, 1995a). Esta fração liberada a cada contração é denominada liberação fracional de Ca^{2+} do RS (FR, do termo em inglês *fractional SR* Ca^{2+} *release;* Bassani *et al*., 1993). Se a FR for alterada, profundas modificações poderão ocorrer no inotropismo. É conhecido que FR depende da entrada de Ca^{2+} via canais do tipo L (*trigger*) e da carga reticular do íon (Bassani *et al*., 1995a). Além disso, o processo de liberação de Ca^{2+} pode ser diretamente modulado. Já se identificou, por exemplo, aumento compensatório de FR em condições de redução de carga de Ca^{2+} do RS devido ao tratamento de miócitos cardíacos isolados com cafeína (Trafford *et al*., 2000). Na condição de insuficiência cardíaca, por exemplo, foi observada manutenção substancial de FR, mesmo na vigência de marcada depleção de Ca^{2+} do RS, aparentemente devido à ação estimulatória da proteína quinase II dependente de Ca^{2+} e calmodulina (CaMKII) sobre os canais de liberação de Ca^{2+} do RS (Ai *et al*., 2005). Por outro lado, durante a instalação de hipertrofia ventricular por sobrecarga de pressão, o aumento de ambos, carga de Ca^{2+} do RS e FR, foi observado (Carvalho *et al*., 2006). Estes dados em conjunto tornam atrativa a idéia da FR como um regulador fundamental do inotropismo. Contudo, não há informação disponível sobre como FR se comporta em diferentes freqüências, parâmetro que definitivamente, como já apresentado acima, altera a dinâmica celular de Ca^{2+} e, conseqüentemente, a amplitude da contração desenvolvida.

Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foram desenvolvidas técnicas e abordagens experimentais que, em conjunto, permitiram quantificar FR em células cardíacas isoladas (Bassani *et al*., 1992; 1994 a,b; Bassani & Bassani, 2003; Bassani *et al*.,1993; 1995b; Bassani *et al*., 1995c, Gomes *et al*., 1998; Bassani *et al*., 1998; Bassani *et al*., 1993; 1995a; Bassani & Bassani, 2003).

Um dos problemas da abordagem desenvolvida para determinação experimental de FR é a necessidade do bloqueio farmacológico completo da ATPase de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al*., 1993; Bassani *et al*., 1995a), o que só pode ser eficientemente conseguido com incubação das células com um inibidor irreversível da enzima por um período mínimo de 90 s. Isto inviabiliza a medição de FR em regime permanente (*steady-state*) e impossibilita a abordagem ao estudo da relação FR-freqüência da forma desejada. A técnica de medição direta da concentração de Ca^{2+} do RS para estimativa da depleção de Ca^{2+} pós-liberação (portanto, da FR), como apresentada por Trafford *et al*. (2000), é muito interessante, mas de difícil implementação (*e.g.* calibração do indicador de Ca^{2+} intra-RS).

Uma alternativa para medição de FR foi apresentada por Shannon *et al*. (2000) e Ginsburg & Bers (2004). Neste caso, é necessário o uso da técnica de *patch-clamp* para medição da quantidade do Ca^{2+} que adentra a célula via I_{CaL} durante a ativação elétrica celular, simultaneamente à medição de $[Ca^{2+}]_i$. De modo resumido, a quantidade de Ca^{2+} liberada do RS durante uma contração evocada por degraus de *voltage-clamp* é estimada a partir das medições de $[Ca^{2+}]_i$, após conversão para a concentração de Ca^{2+} total ($[Ca^{2+}]_T$: livre + ligado), usando o conhecimento dos ligantes passivos (*buffers*) intracelulares de Ca^{2+} (Bassani *et al*., 1998). A carga de Ca^{2+} do RS é estimada pela variação de $[Ca^{2+}]_T$ ou pela corrente mediada pelo NCX (I_{NCX}), causadas pela liberação de Ca^{2+} induzida pela aplicação rápida de cafeína (Bassani & Bers, 1995; Varro *et al*., 1995; Ginsburg *et al*., 1998). Da variação de $[Ca^{2+}]_T$ durante um *twitch* (*i.e*., transiente e contração evocados eletricamente), é subtraída a integral da corrente I_{CaL} (medida), e a diferença, normalizada pelo conteúdo de Ca^{2+} do RS, corresponde a FR. No entanto, o *twitch* é disparado por um pulso retangular de tensão. Assim, esta técnica não leva em conta a forma e amplitude do PA, que, como já apresentado, podem variar com a freqüência.

No presente trabalho foi utilizada a técnica de *voltage-clamp*, como descrita acima, mas na modalidade de *action potential clamp* (APC) que permite aplicar como pulso para fixação de tensão (*voltage-clamp*) uma forma de onda igual ao PA desenvolvido. Assim, foi possível, a partir do registro de PA em várias freqüências, utilizar a forma de onda estimulatória fisiológica, característica de cada freqüência, para produção do *twitch* no qual a FR será estimada. Desta forma, foi investigada no presente estudo, realizado com miócitos ventriculares de rato, a relação entre FR e freqüência estimulatória. Foi premissa do trabalho que a freqüência média é o determinante fundamental da amplitude média dos transientes de Ca^{2+} e, consequentemente, das contrações em células cardíacas

(Bassani *et al*., 1990, Ricardo *et al*., 2006). A hipótese de trabalho foi que a RFF negativa do coração do rato é determinada por redução freqüência-dependente de FR.

Gómez *et al.* (1997) mostraram, em modelo experimental de hipertrofia e insuficiência cardíaca, que, mantido constante o *trigger* para liberação de Ca^{2+} e a carga de Ca^{2+} do RS, o transiente de Ca^{2+} podia se apresentar reduzido, provavelmente por redução de FR. Além disso, o trabalho de Pieske *et al.* (1999) mostrou que a RFF positiva do coração humano se torna negativa na condição de insuficiência cardíaca. Esta alteração, cujo principal reflexo clínico esperado seria a limitação do aumento compensatório do DC em condições de hipotensão, exercício e *stress*, poderia ter como mecanismo básico a redução de FR com a freqüência, já que, como já exposto, nesta condição fisiopatológica, a carga de Ca^{2+} do RS não se mostra aumentada em freqüências mais altas, como acontece no miocárdio do rato (Maier *et al*., 2000). Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando um modelo animal cuja RFF é semelhante à do coração humano insuficiente, podem ter relevância não apenas no esclarecimento de mecanismos fisiológicos básicos que determinam esta relação, como também para estudos futuros com miocárdio humano, buscando esclarecer se esses mecanismos (particularmente a influência da freqüência sobre FR) são semelhantes àqueles encontrados em roedores.

2 Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Determinar a relação entre a liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e a freqüência estimulatória em miócitos ventriculares de ratos.

2.2 Objetivos específicos:

a) Medição do potencial de ação em miócitos ventriculares isolados de rato em diferentes freqüências estimulatórias;

b) Medição simultânea da corrente de Ca^{2+} tipo L e dos transientes de Ca^{2+} em miócitos estimulados em diferentes freqüências via *action potential clamp*;

c) Determinação da relação entre a liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e a freqüência estimulatória.

3 Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, de 4-6 meses de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (3 animais/gaiola), recebendo água e ração *ad libitum,* sob temperatura ambiente controlada e ciclo de iluminação de 12 h claro: 12 h escuro, e não sofreram manipulação experimental até o dia do sacrifício.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (certificados 1186-1, 1517-1 e 1737-1).

3.2 Soluções Fisiológicas

Todas as soluções foram preparadas com água tipo I (Easypure UF, Barnstead International, Dubuque, IA, EUA). Todos os sais e demais compostos químicos foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA) e Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), salvo quando indicado. As concentrações dos sais e demais compostos nas soluções abaixo estão expressas em mM:

Solução de *Tyrode* normal (NT): NaCl 140; KCl 6; $MgCl_2.6H_2O$ 1,5; HEPES (ácido hidroxietilpiperazina–N''–2 etanosulfônico) 5; glicose 11,1; $CaCl_2.2H_2O$ 1; pH 7,4 a 23°C (ajustado com NaOH).

Solução NT sem cálcio e sódio (Tyr-00): LiCl 140; KCl 6; $MgCl_2.6H_2O$ 2.5; HEPES 5; glicose 11,1; EGTA (ácido etilenoglicol tetracético) 1; pH 7,4 a 23°C (ajustado com KOH).

Solução de micropipeta para registro de corrente de Ca^{2+} (Pip-I): CsCl 130; $MgCl_2$ 5; KCl 1; HEPES 10; EGTA 1 (pH 7,2 ajustado com CsOH).

Solução de micropipeta para registro do potencial de membrana (Pip-P): Glutamato K 130; NaCl 7; Hepes 10, EGTA 0,5; (pH 7,2 ajustado com KOH).

Solução de micropipeta contendo anfotericina B: em 1 ml de solução Pip-P, foram adicionados 2 µl de solução estoque de anfotericina B (60 mg/ml em dimetil-sulfóxido (DMSO), preparada no dia do experimento ou mantida a 4ºC por no máximo 2 dias) e 3 µl de solução de Pluronic (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) 20% (concentrações finais de 127 µg/ml de anfotericina B; 0,1% de Pluronic; 0,5% de DMSO). Esta solução passou por processo de agitação por ultra-som para melhorar a dispersão das moléculas de anfotericina B.

Solução de perfusão para medição de corrente de Ca^{2+} (Tyr-ICa): cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl) 140, 4 aminopiridina (4-AP) 3, CsCl 4, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, $CaCl_2$ 1 (pH 7,4 ajustado com CsOH).

Solução de indo-1 para incubação de miócitos (NT-indo-1): 10 µl de solução estoque (10 mM em DMSO) de indo-1, acetoximetil-ester (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e 10 µl de solução 2% (v/v) de Pluronic em DMSO foram diluídos em 980 µl de NT.

Solução de cafeína em Tyr-00 (Caf-00): 15 mM de cafeína foram adicionados à solução Tyr-00.

Solução de Krebs Cl (Krebs-Cl): NaCl 115; KCl 4,6; $KHPO_4$ 1,2; $NaHCO_3$ 25; $MgSO_4.7H_2O$ 2,4; glicose 11,1; pH 7.4 sob borbulhamento com carbogênio.

Solução cardioplégica (CP): KCl 30; ácido glutâmico 70; $MgCl_2$ 1; HEPES 10; glicose 11; KH_2PO_4 10; taurina 20; pH 7,4 a 23°C (ajustado com KOH).

3.3 Isolamento de Células

Miócitos ventriculares esquerdos foram isolados por digestão enzimática, conforme descrito anteriormente (Penna & Bassani, 2010). De modo simplificado, o coração foi perfundido em sistema de Langendorff (37 ºC) com solução de Krebs-Cl contendo 0,5 mM de $CaCl_2$ por aproximadamente 4 minutos. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução, porém sem adição de $CaCl_2$ por 5 minutos. Foram então adicionados a esta solução colagenase tipo I (0,8-1,2 mg/ml; Worthington Biochemical Corporation,

Lakewood, NJ, EUA), e a perfusão com a enzima prosseguiu por 15-20 minutos. A seguir, procedeu-se à perfusão com solução sem a enzima e contendo albumina sérica bovina (BSA, 0,5 mg/ml) por 3-5 min. O tecido ventricular esquerdo foi então separado e triturado em solução CP contendo BSA, para dissociação das células. A suspensão de células foi lavada 2 vezes na mesma solução e armazenada a 4°C.

3.4 Set-up experimental

A Figura 3.1 ilustra esquematicamente a montagem experimental utilizada neste trabalho. Este sistema é formado basicamente por um microscópio invertido (Nikon Corp., Tokio, Japão, modelo Diaphot 300), um sistema de medição de fluorescência, um sistema de *patch clamp* e um sistema para captação de imagens.

As células (preparação biológica) eram iluminadas por um diodo emissor de luz (*Super Bright* LED, Jumbo, 5000 mcd, 1.85V, 20mA, Archer, N. Cat. 276 - 086) vermelho de alta intensidade. A luz (comprimento de onda de aproximadamente 650 nm) atravessava a objetiva (mod. DPlan 40L, Nikon, Corp., Tokio, Japão) e era refletida até a câmera CCD (mod. SSC–M256, Sony Corp., Tókio, Japão), onde o sinal era captado e apresentado no monitor de vídeo (modelo SSM-930, Sony Corp., Tokyo, Japão). Este sistema possuía também a opção de gravação das imagens por meio de um gravador de vídeo cassete e registro de encurtamento celular por meio de um detector de borda de sinal de vídeo (DBV; mod. VED-104, Crescent Electronics, Sandy, UT, EUA).

Para o registro de sinais eletrofisiológicos (potencial de ação ou corrente de Ca^{2+}), foi utilizado um sistema de *patch clamp* composto por um pré-amplificador (*Headstage*, CV203BU, Axon Instruments Inc., Foster City, EUA), um amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments Inc., Foster City, EUA) e um conversor A/D – D/A (Digidata 1200B, Axon Instruments Inc., Foster City, EUA). O pulso estimulatório era gerado pelo programa pClamp (versão 6.0, Axon Instruments Inc.) e aplicado ao miócito por meio do pré-amplificador. O mesmo equipamento era responsável pela captação do sinal eletrofisiológico. Por fim, o sinal captado era armazenado no formato digital em computador para futura análise. A taxa de aquisição de sinal era de 10 kHz, e o sinal era posteriormente filtrado em 5 kHz (filtro digital passa baixa, tipo Butterworth, 5ª ordem). Todo o sistema foi montado sobre uma mesa anti-vibração (mod. Micro-g 163-531, Technical Manufacturing Corporation, Peabody, EUA).

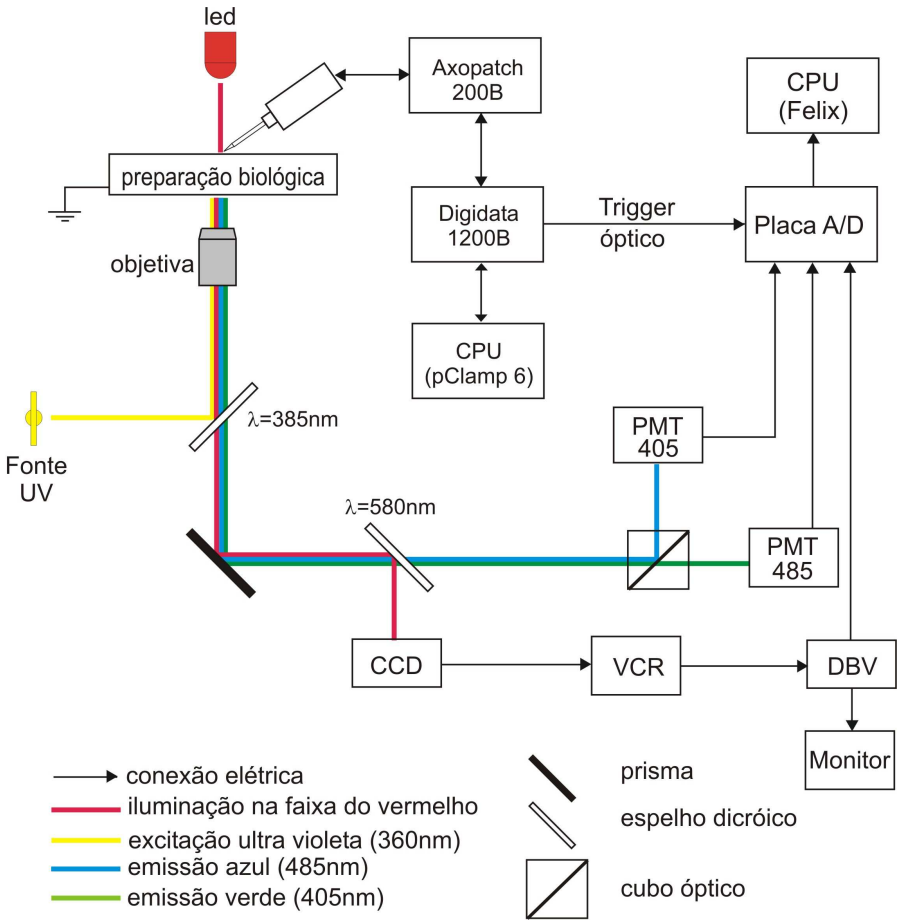

Figura 3.1 – Representação esquemática do *set-up* experimental utilizado neste trabalho. – CCD: câmera de vídeo CCD (Couple Charged Device); VCR: gravador de vídeo cassete; DBV: detector de borda de sinal de vídeo; Monitor: monitor de vídeo; PMT405 e PMT485: tubos fotomultiplicadores para monitoração dos sinais luminosos em 405 e 485 nm, respectivamente; Digidata 1200B: placa conversora A/D e D/A; CPU: computador. Axopatch 200B: amplificador de *patch clamp* . Em cada espelho dicróico está apresentado o comprimento de onda de reflexão (λ).

Para o registro dos transientes de Ca^{2+}, o indicador fluorescente indo-1, presente no interior das células era excitado, com luz na faixa ultravioleta (360 nm), proveniente de uma lâmpada de arco de xenônio de 75 W (mod. UXL-75XE, Ushio Inc., Tóquio, Japão). A fluorescência emitida pelo indicador nos dois comprimentos de onda de interesse (405 e 485 nm) era separada em um "cubo óptico" (composto de espelho dicróico e filtros de interferência) e detectada em tubos fotomultiplicadores (PMT405 e PMT485). Os sinais provenientes das PMTs (tensão elétrica proporcional à intensidade luminosa) eram enviados a um conversor analógico-digital e interface de aquisição (Photon Technology

International, Monmouth Junction, NJ, EUA), controlada pelo programa Felix (versão 1.1, Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ, EUA), e armazenados no formato digital em computador. A taxa de aquisição dos sinais foi de 50 Hz. A sincronia entre os registros eletrofisiológicos e transientes de Ca^{2+} foi obtida por meio de um *trigger* gerado pelo pClamp/Digidata, enviado ao sistema de fluorescência por meio de um acoplador óptico.

Neste ponto, daremos especial destaque à câmara de perfusão/estimulação utilizada nesse trabalho, que é uma adaptação da câmara desenvolvida por Gomes (1997). Construída em acrílico transparente e com área de trabalho em vidro (lamínula), esta câmara tem como principais características um sistema de perfusão que possibilita a instalação de fluxo laminar constante e com volume do compartimento de trabalho bastante reduzido (~400 µl), o que torna possível a troca rápida de solução de banho, necessária para obtenção da contratura induzida por aplicação de cafeína (ver item 3.9.5). Além disso, a pequena altura da camada líquida minimiza a capacitância do eletrodo, o que possibilitou o registro de sinais eletrofisiológicos de boa qualidade. Estas duas características foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

3.5 Medição de $[Ca^{2+}]_i$ com indo-1

O indo-1 é um indicador fluorescente raciométrico, o que apresenta a vantagem de diminuição de erros de medida causados por variação da concentração do indicador no interior da célula, intensidade da iluminação de excitação, e artefatos de movimento, entre outros (Gomes *et al*., 1998). O indicador foi excitado a 360 nm, e a razão da fluorescência emitida em 405 e 485 nm (R) foi calculada após subtração da fluorescência de fundo em cada comprimento de onda. R foi convertida em $[Ca^{2+}]_i$ por (Grynkievicz *et al*., 1985):

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

onde R_{min} e R_{max} são os limites inferior e superior de R, respectivamente; K_d é a constante de dissociação aparente do indo-1; β é a razão das intensidades da fluorescência emitida a 485 nm com $[Ca^{2+}]$ mínima e máxima. Os valores de R_{max} e R_{min} foram determinados de acordo com Bassani & Bassani (2002) e o valor β conforme Gomes *et al.* (1998). O valor de K_d foi considerado como 844 nM, como medido no ambiente intracelular (Bassani *et al*., 1995c).

3.6 Microeletrodos

Foram utilizados capilares de boro-silicato com diâmetros interno e externo de 1,12 e 1,5 mm, respectivamente, sem filamento interno (mod. TW150-3, World Precision Instruments Inc., Sarasota, EUA). Os capilares foram estirados em estirador programável (mod. P-97, Sutter Instrument Co., Novato, EUA) para produzir microeletrodos com resistência de 1-3 MΩ para medição de corrente (quando preenchidos com a solução PIP-I) e microeletrodos com resistência de 7-8 MΩ para medição de potencial de ação (quando preenchidos com a solução PIP-P). A impedância do microeletrodo (Z_{pip}) foi calculada pelo registro da corrente que flui por ele em resposta a um pulso quadrado de tensão de 5 mV (Z_{pip}= 5 mV / I_{pip}). Na Figura 3.2 estão apresentadas duas micrografias do eletrodo para registro de tensão, com aumentos diferentes.

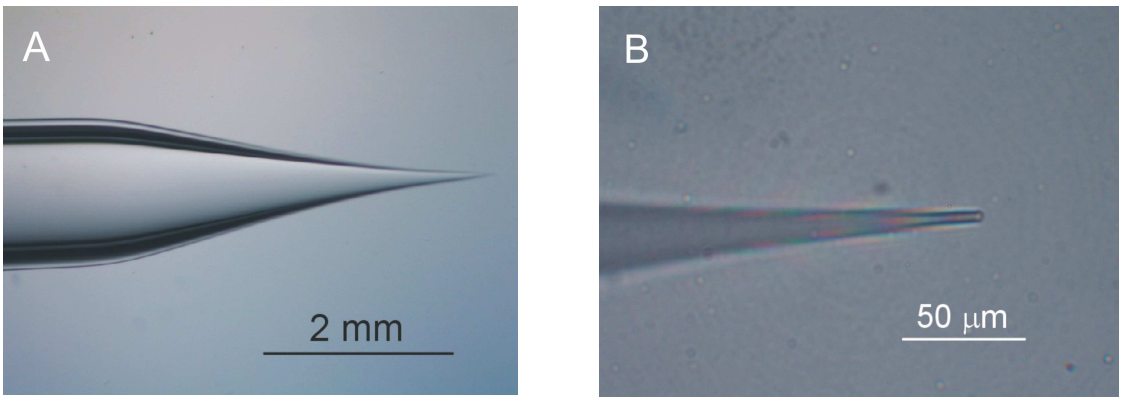

Figura 3.2. Micrografias do microeletrodo para registro de tensão com diferentes aumentos.

3.7 Potencial de Junção Líquida

Uma das preocupações iniciais que tivemos neste trabalho foi com relação ao potencial de junção líquida (PJL), que pode comprometer os resultados e as conclusões deles obtidas. O PJL é o potencial elétrico gerado na interface entre duas soluções contendo diferentes composições e/ou concentrações iônicas. A amplitude e sinal deste potencial são determinados principalmente pela concentração dos íons presentes nas soluções, além de suas mobilidades e valências (Barry & Diamond, 1970; Neher, 1992). Em alguns casos, o PJL é pequeno e pode ser desconsiderado. Por outro lado, em medições eletrofisiológicas utilizando *patch clamp*, sua magnitude pode alterar

significativamente as medições de potencial ou corrente de membrana. Para se ter uma idéia, neste trabalho foi observado PJL que chegou a cerca de 15% do valor de potencial de membrana em repouso. Tipicamente, soluções de pipeta à base de glutamato de potássio (molécula grande e de baixa mobilidade), como é o caso da solução Pip-P, apresentam potenciais de junção maiores que 10 mV, enquanto que soluções de KCl, como é o caso da solução Pip-I, apresentam potenciais de junção menores que 5 mV (calculado por meio do programa pClamp, versão 8.0, Axon Instruments Inc.). Portanto, o PJL para as soluções que utilizamos apresentou valores dentro do esperado (Tabela 3.1). Se, por um lado, o baixo PJL da solução Pip-I resulta em menos interferência nos resultados, a solução de glutamato tem como vantagem a minimização de influxo de ânions, já que os poros formados pela anfotericina não são permeáveis ao glutamato, reduzindo assim alterações do meio intracelular, e esta foi a razão para o uso deste último tipo para os registros de PA na configuração de *perforated patch-clamp*, apesar da existência do alto PJL.

Para a medição do PJL, o amplificador de *patch clamp* foi ajustado na opção *voltage clamp*. Em seguida, a ponta de um microeletrodo, preenchido com a solução de pipeta desejada, foi submersa na câmara de perfusão contendo a mesma solução do microeletrodo (e não a solução de perfusão). O controle "*pipette offset control*" do amplificador de *patch clamp* foi ajustado de modo que no seu display marcasse uma corrente próxima de zero (menor que 100 pA). Com isso, a solução da câmara de perfusão foi substituída pela solução de perfusão desejada e foi possível observar uma variação de corrente no *display* do amplificador. Por fim, o PJL foi considerado como sendo o potencial (intensidade e sinal) aplicado ao microeletrodo necessário para zerar a corrente apresentada no display.

Para a obtenção do valor médio do PJL entre as soluções utilizadas neste trabalho, foram realizadas seis medições para cada par de soluções (NT x Pip-P para registro de PA e Tyr-ICa x Pip-I para registro de corrente) e os valores médios estão apresentados na Tabela 3.1.

A compensação do PJL pode ser realizada durante ou após as medições. Neste trabalho, optamos por compensá-lo após as medições, durante o processamento dos dados registrados em cada fase do protocolo experimental, de duas maneiras: i) para o registro de PA, foi efetuada a subtração entre o valor do potencial de membrana e o valor do PJL entre as soluções NT e Pip-P; ii) para traçar a curva IxV de I_{CaL}, foi efetuada a

subtração entre o valor do potencial de *clamp* aplicado e o valor do PJL entre as soluções Tyr-ICa e Pip-I. Para o registro de I_{CaL} em APC, a compensação do PJL não foi realizada.

Tabela 3.1. Valores de potencial de junção líquida entre as soluções de pipeta (Pip-P e Pip-I) e as soluções de perfusão (NT e Tyr-ICa). N = 6.

Solução de pipeta	NT	Tyr-ICa
Pip-P	-15,3 ± -1,1 mV	-
Pip-I	-	-5,7 ± -0,9 mV

3.8 Experimentos de Patch Clamp

3.8.1 Técnica de *Patch Clamp*

A técnica de *patch clamp*, utilizada neste trabalho, foi originalmente proposta por Neher e Sakmann (1976) e Neher *et al.* (1978). Nesta técnica, que é um refinamento da técnica de *voltage clamp* (Cole, 1946), uma pequena porção da membrana celular é presa mecanicamente ao microeletrodo de vidro por meio de pressão negativa, aplicada ao interior do microeletrodo, formando um selo elétrico com resistência da ordem de GΩ (giga-selo). A partir deste ponto, pode-se obter acesso elétrico ao interior da célula, rompendo sua membrana. Esta abertura da membrana pode ser obtida principalmente de duas maneiras: aplicando-se um pulso de pressão negativa ao interior do microeletrodo ou adicionando-se um fármaco (*e.g.*, anfotericina B, nistatina) capaz de produzir poros na membrana celular (ver item 3.8.2). Estas duas técnicas são conhecidas como *ruptured patch clamp* e *perforated patch clamp*, respectivamente.

Uma vez obtido acesso elétrico ao interior da célula, existem duas configurações básicas de trabalho, que são o *voltage-clamp* e o *current-clamp*. Na configuração *current-clamp*, a corrente líquida de membrana (*i.e.*, diferença entre a corrente de entrada e corrente de saída) é fixada em um determinado valor e a variação de tensão elétrica transmembrana pode ser medida. Esta configuração pode ser utilizada tanto para medição da variação de tensão passiva da membrana (relativa apenas aos seus componentes resistivos e capacitivos), quanto para o registro de potenciais de ação evocados pela aplicação de pulsos de corrente supra limiares (como neste trabalho).

Por outro lado, na configuração *voltage-clamp*, a tensão elétrica transmembrana é fixada em um determinado valor, e é possível medir a corrente mediada pelos canais iônicos presentes na membrana da célula. Novamente, a corrente medida é a corrente líquida, ou seja, a corrente resultante do balanço entre as diversas correntes de entrada e saída relativas à movimentação iônica entre os meios intra e extracelular. Na maior parte das vezes, é possível isolar uma ou mais dessas correntes iônicas, possibilitando o estudo de canais ou transportadores iônicos de membrana individuais. Esta separação pode ser realizada de diversas formas, como, por exemplo, utilizando-se fármacos para impedir a mudança de estado de certos canais e/ou removendo algun(s) componente(s) da solução de perfusão. Além disso, é possível fazer esta separação por meio de aplicação de pulsos de *voltage-clamp* em faixas de tensão ou freqüência nas quais alguns canais de membrana não são ativados. Tais técnicas foram utilizadas neste trabalho para medir a corrente de Ca^{2+} tipo L.

3.8.2 A configuração *Perforated Patch Clamp*

A principal vantagem da configuração *perforated patch-clamp* sobre o clássico *ruptured patch-clamp* é causar menor interferência no ambiente intracelular (Horn & Marty, 1988). Nesta técnica, um antibiótico (nistatina ou anfotericina B), adicionado à solução de pipeta, interage com a membrana e abre poros seletivos a cátion (embora os poros também permitam a permeação de Cl^-). Após ação do antibiótico, a membrana fica permeável a alguns íons (*e.g.*, cátions monovalentes e Cl^-), mas bloqueia o fluxo de outros (*e.g.*, cátions multivalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+}), bem como de moléculas orgânicas e inorgânicas (Horn & Marty, 1988). Isto limita a diálise do meio intracelular que ocorre na configuração clássica do *ruptured patch-clamp*, na qual toda a porção da membrana em contato com a luz da micropipeta é rompida.

Neste trabalho, foi utilizada anfotericina B para registro de potenciais de ação. A ponta do microeletrodo foi preenchida com solução PIP-P (*front-filling*) por submersão do mesmo nesta solução. A mesma solução, contendo 127 μg/ml de anfotericina B, foi utilizada para preencher o restante do microeletrodo (*back-filling*). Este procedimento foi utilizado para que a anfotericina B não dificultasse a formação do giga-selo. Após a obtenção do giga-selo (ver item 3.9.1), um período de 15 a 30 minutos foi aguardado para que a anfotericina B provocasse a abertura de poros na membrana. Foram utilizadas apenas as células cuja resistência em série ficou abaixo de 15 MΩ.

3.8.3. Técnica do *Action Potential Clamp* (APC)

Na técnica de APC, o pulso retangular de *voltage-clamp* é substituído pela forma de onda do potencial de ação registrado numa célula na condição desejada. Neste trabalho, estudamos miócitos estimulados a diferentes freqüências, nas quais os PAs registrados foram utilizados como comando de *voltage-clamp*. Assim, um número suficientemente grande de PAs foram registrados, para que fosse possível identificar a forma de onda representativa de cada freqüência. Aplicado o PA correspondente, a corrente de membrana pôde ser evocada por uma forma de onda mais próxima da fisiológica.

3.9 Procedimentos Experimentais

3.9.1 Cálculo da impedância do giga-selo e da capacitância de membrana

Para a obtenção do giga-selo, o microeletrodo foi aproximado do miócito por meio de um micromanipulador piezoelétrico (mod. PZ-301, Burleigh Instruments, NY, EUA), porém sem tocar na membrana celular. Esta aproximação foi realizada monitorando-se a impedância do microeletrodo, que tende a aumentar com a aproximação da membrana. A aplicação de pressão negativa no interior do microeletrodo foi utilizada para completar o processo de "selamento". Para o cálculo da impedância do giga-selo, um pulso de tensão quadrado de 5 mV de amplitude e 50 ms de duração foi aplicado e, por meio da corrente registrada, a impedância foi calculada como:

$$Z_{selo} = \frac{5mV}{I_{pip}} \qquad (3.2)$$

Neste trabalho, apenas as células que apresentaram selo estável e com impedância maior que 1 GΩ foram utilizadas. Para a obtenção do giga-selo com estas características, torna-se necessário a utilização de um bom aparato mecânico, formado por micromanipulador e bancada anti-vibração. Além das questões mecânicas, diversos outros fatores influenciam a formação do giga-selo, como, por exemplo, o procedimento de isolamento celular, a qualidade e integridade da membrana do miócito e a composição das soluções de perfusão e de pipeta (Neher, 1992).

A Figura 3.3 mostra um registro típico da corrente de membrana em resposta à aplicação de um pulso quadrado de tensão de 5 mV e 50 ms para o registro do valor do

giga-selo. Os transientes de corrente (positivo e negativo, Figura 3.3-A) são as respostas capacitivas do eletrodo à variação abrupta da tensão de *clamp*. Após a compensação da capacitância do eletrodo, o registro de corrente apresentava-se como mostrado na Figura 3.4-B, e esta era a condição básica para a posterior obtenção de acesso elétrico ao interior da célula. A partir de registros como na Figura 3.3-A, foi calculada a impedância do giga-selo (Eq. 3.2).

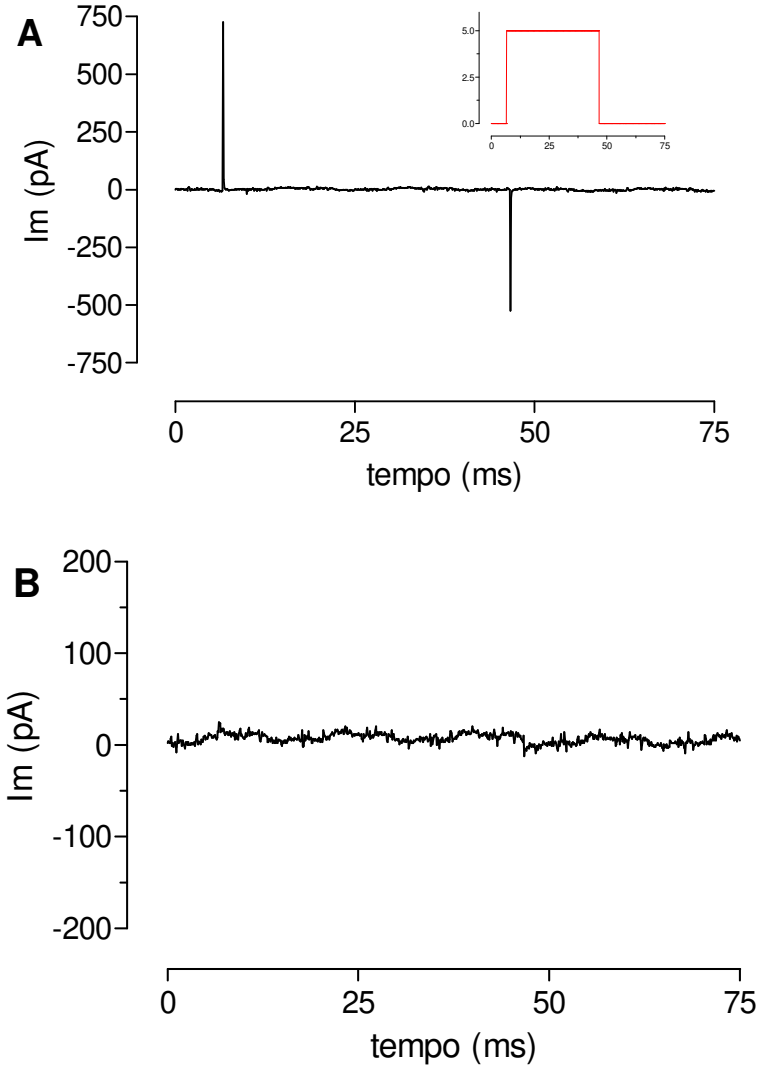

Figura 3.3 – Registro típico de corrente de membrana utilizado para o cálculo da impedância do giga-selo. O transiente de corrente em (A) é a resposta capacitiva do microeletrodo. Após sua compensação, o registro apresentava-se como em (B). Inset: pulso de tensão usado para monitorar e calcular a impedância do giga-selo.

A impedância média do giga-selo foi de 1,19 ± 0,07 GΩ (N= 38), valor aceitável para realização de registros de potenciais de ação e corrente de Ca^{2+}

Para a obtenção do acesso elétrico ao interior das células, foram utilizados dois métodos: i) *perforated patch clamp* para registro de PA e ii) *ruptured patch clamp* para registro de corrente. Neste último método, um rápido pulso de pressão negativa foi aplicado ao interior da micropipeta, de maneira a romper fisicamente a membrana celular.

A capacitância de membrana (C_m) foi determinada na configuração *voltage-clamp*. Resumidamente, a corrente de membrana resultante de uma despolarização e/ou hiperpolarização de 5 mV, a partir de um potencial de –85 mV, foi considerada como a resposta capacitiva da membrana, uma vez que a ativação de correntes iônicas em miócitos ventriculares pode ser considerada desprezível nestes níveis de tensão. A partir do registro desta corrente, ajustamos uma função exponencial (Eq. 3.3) à fase de queda da resposta capacitiva.

$$I_m(t) = A_0 + A_1 e^{-t/\tau} \tag{3.3}$$

onde τ é a constante de tempo de queda, A_0 é o valor da corrente de membrana I_m em regime e A_1 é o valor de pico da corrente I_m.

Assim, tomando-se o microeletrodo como uma resistência e a membrana celular como um circuito RC paralelo, calculamos C_m como:

$$C_m = \left(\frac{\tau}{\Delta E_m} \right) \left(\frac{(A_0 + A_1)^2}{A_1} \right) \tag{3.4}$$

Em todos os experimentos, C_m foi compensada ao máximo possível por meio de circuito específico para este fim, presente no amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, EUA). Da mesma maneira, a resistência série foi compensada de 60 a 80%.

3.9.2 Medição do potencial de membrana em diferentes freqüências

Inicialmente, os miócitos foram perfundidos com solução NT contendo 15 mM cafeína, para depletar o estoque de Ca^{2+} do RS. Em seguida, durante perfusão com NT, as células foram estimuladas com um trem de 10 pulsos condicionantes de corrente

(amplitude de 6 nA e duração de 2 ms, Figura 3.4), com o microeletrodo preenchido com solução PIP-P. Com esse número de pulsos, garantimos que a carga de Ca^{2+} do RS atinja a estabilidade, uma vez que, em miócitos ventriculares de rato, apenas cerca de 5 pulsos são suficientes para carregar completamente o RS (Bassani *et al*., 1993; Bassani *et al*., 2004). O PA evocado pelo décimo primeiro pulso estimulatório (pulso teste) foi registrado e considerado como PA típico para a freqüência utilizada. O mesmo protocolo foi repetido para todas as freqüências de interesse (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 Hz), variando-se o intervalo entre pulsos (D, Figura 3.4).

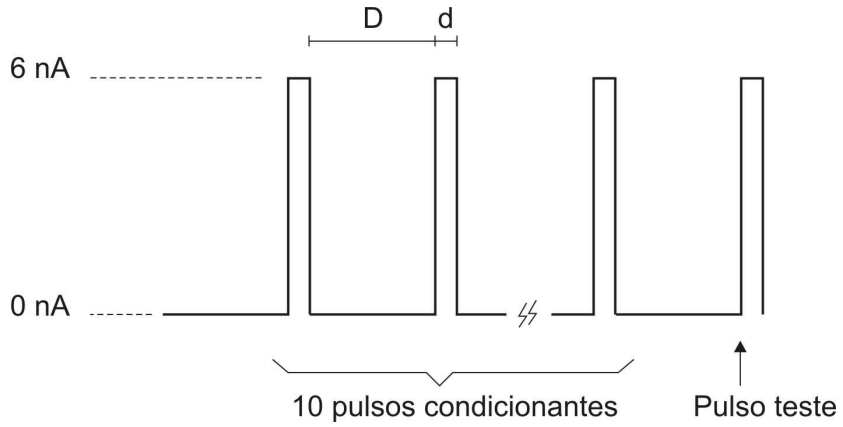

Figura 3.4 – Protocolo experimental utilizado para registro de potencial de ação em diversas freqüências estimulatórias. D = intervalo entre estímulos, variável de acordo com a freqüência estimulatória; d = duração do pulso de corrente (2 ms).

Em todos os registros de PA foram analisados os seguintes parâmetros: potencial de repouso (Vm); amplitude do PA (ΔVm); derivada temporal máxima da fase de despolarização do potencial de membrana (dV/dt); duração do PA até 20% da repolarização (APD20); duração do PA até 90% da repolarização (APD90); tempo para repolarização até 0 mV (t_{0mV}). Estes parâmetros são apresentados na Figura 3.5.

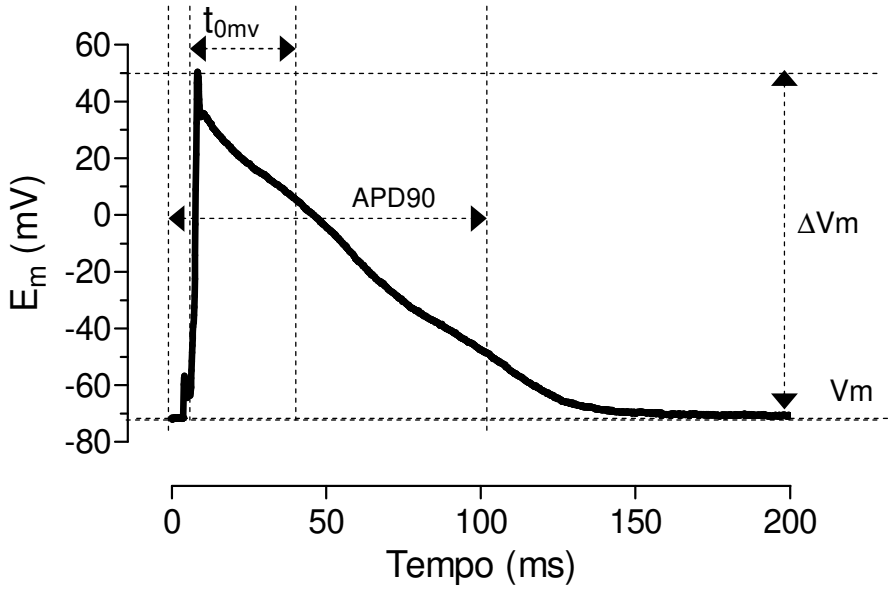

Figura 3.5 – Parâmetros analisados do PA. Foram omitidas a APD20 e a dV/dt para facilitar a visualização dos parâmetros na figura.

3.9.3 Caracterização da corrente Ca^{2+}

Antes de iniciar os protocolos de registro de corrente de Ca^{2+} para a estimativa da FR, realizamos um grupo de experimentos com o objetivo de caracterizar a corrente de membrana e confirmar se esta era de fato a corrente de Ca^{2+} tipo L.

a) Curva IxV: para a obtenção desta curva, os miócitos foram incubados em solução Tyr-00 por 5 a 10 min, para redução da concentração intracelular de Na^+ e perfundidos com solução Tyr-ICa durante o registro da corrente. A solução de pipeta utilizada foi a Pip-I. Foram aplicados 12 pulsos retangulares de *clamp*, com duração de 100ms, a partir do potencial de repouso (-85mV). Os pulsos foram de -50mV até +60mV, com incrementos de 10mV. Todos os pulsos de *clamp* foram precedidos de um pré-pulso de -85 mV para -50 mV, em forma de rampa, com duração de 50 ms, com o objetivo de ativar canais de Na^+.

b) *Corrente de membrana sensível a cádmio (Cd^{2+})*: novamente, miócitos foram incubados em solução Tyr-00 por 5 a 10 min e perfundidos com solução Tyr-ICa durante o registro da corrente. A solução de pipeta utilizada foi a Pip-I. Em um mesmo miócito, registramos

a corrente de Ca^{2+} em APC na freqüência 0,5Hz, antes e após a adição de 100µM de $CdCl_2$ à solução de perfusão. Sabe-se que a corrente de Ca^{2+} tipo L, neste tipo de preparação, é inibida na presença de Cd^{2+} nestas concentrações.

3.9.4 Medição simultânea de transientes de Ca^{2+} e da corrente de Ca^{2+} utilizando APC

Para realizarmos a estimativa da FR pelo método descrito por Shannon *et al.* (2000), foi necessário medir simultaneamente a corrente de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} do tipo L (I_{CaL}) e o transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$).

O protocolo experimental foi dividido em três fases. A fase de inicialização (Figura 3.6) foi estabelecida com a aplicação de solução Caf-00 (após perfusão com Tyr-00 por 15 s) com o objetivo de esvaziar o RS de Ca^{2+}. Quando $[Ca^{2+}]_i$ atingiu o pico, substituiu-se esta solução por NT contendo 15 mM de cafeína, aplicada por 2 s para permitir a extrusão do Ca^{2+} pelo NCX. Em seguida, os miócitos permaneceram incubados em solução Tyr-00 por 5 a 10 min, para depleção do Na^+ intracelular (Bassani *et al*., 1992; 1994b). Desta maneira, evita-se o influxo de Ca^{2+} pela NCX quando Ca^{2+} for introduzido no perfusato na ausência de Na^+ (solução Tyr-ICa).

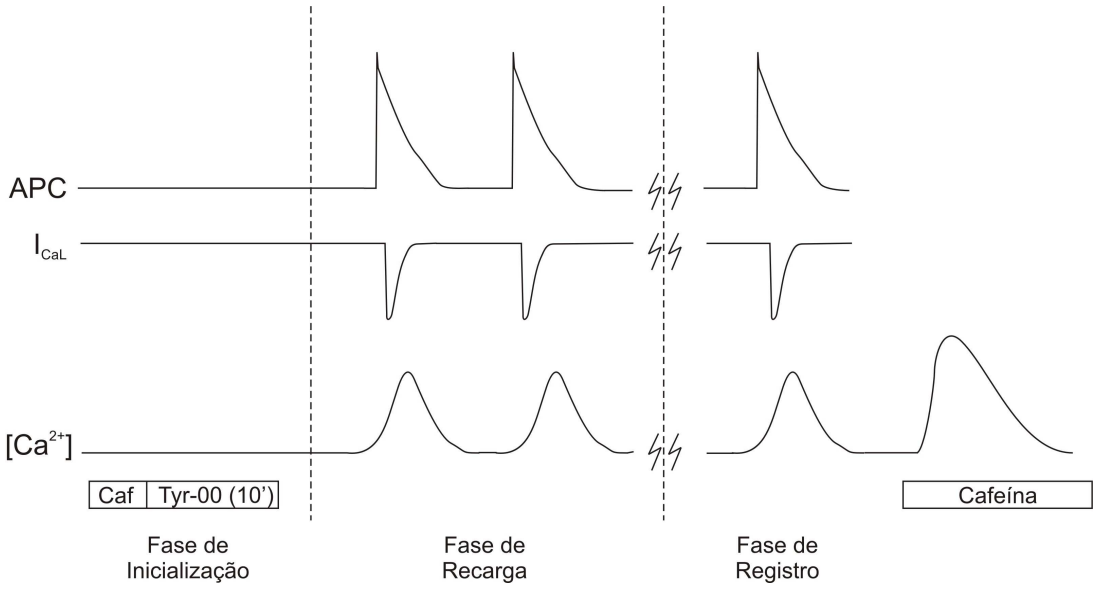

Figura 3.6 - Protocolo experimental utilizado para registro simultâneo de transientes de Ca^{2+} e corrente de membrana (corrente de Ca^{2+} tipo L). Na fase de inicialização, o RS foi depletado por meio da aplicação de cafeína (15 mM) à solução de perfusão. Na fase de recarregamento do RS, foram aplicados 10 pulsos estimulatórios (APC). Na fase de registro, a corrente e o transiente de Ca^{2+} evocados pelo décimo primeiro pulso estimulatório foram registrados e considerados para o cálculo da FR (ver texto para detalhes).

Durante a fase de recarga do RS, os miócitos foram perfundidos com solução Tyr-ICa, com o objetivo de bloquear as correntes de Na^+, de K^+ e a corrente mediada pela NCX (Ginsburg *et al.*, 1998). As contribuições da ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e do uniporter mitocondrial no transporte de Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1994) foram considerados desprezíveis. Esta fase tem como objetivo recarregar o RS com Ca^{2+} por meio da estimulação do miócito (via APC) com 10 pulsos condicionantes. I_{Ca} e o transiente de Ca^{2+} evocados pelo décimo primeiro pulso (pulso teste) foram registrados e considerados para o cálculo da FR. Após este registro, os miócitos foram perfundidos com cafeína (como na fase de inicialização), para possibilitar a estimativa da carga de Ca^{2+} do RS. Este procedimento foi realizado para cada freqüência de interesse.

3.9.5 Estimativa da carga de Ca^{2+} do RS

A carga de Ca^{2+} do RS foi estimada a partir do transiente de Ca^{2+} evocado por cafeína na ausência de Na^+ e Ca^{2+} (*e.g.*, Bassani & Bers, 1995; Ginsburg *et al.*, 1998; Ricardo *et al.*, 2008).

Após interrupção da estimulação elétrica, a solução de banho é rapidamente trocada por Tyr-00, para inibição da NCX. A presença de EGTA nesta solução assegura a rápida remoção do Ca^{2+} extracelular contaminante. Após 15-20 s, é feita a troca rápida da solução de perfusão por uma solução idêntica, exceto pela adição de 10 mM de cafeína (Caf-00). Este composto, ao atravessar a membrana celular, sensibiliza os canais de Ca^{2+} do RS ao Ca^{2+} (Bassani *et al.*, 1993) provocando sua abertura e fazendo com que este íon seja liberado para o citoplasma. Na presença mantida de cafeína, o Ca^{2+} captado via ATPase de Ca^{2+} desta organela é continuamente liberado, de modo que não há acúmulo do íon no interior do RS. Como conseqüência, o conteúdo de Ca^{2+} do RS é depletado, elevando a concentração citosólica de Ca^{2+} (Figura 3.7).

A partir do transiente evocado pela cafeína, estimou-se os valores diastólico (*i.e.*, imediatamente antes da aplicação do composto) e de pico da concentração total de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_T$). De maneira simplificada, num dado instante, parte do Ca^{2+} presente no citosol está na sua forma livre (cuja concentração medimos com indo-1) e parte ligada a sítios de ligação passiva (*buffers*). Podemos, portanto, dizer que $[Ca^{2+}]_i$ é a diferença entre $[Ca^{2+}]_T$ e a concentração de Ca^{2+} ligada a *buffers* (Bers, 2001). Podemos estimar $[Ca^{2+}]_T$ por:

$$[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}]_i + \left(\frac{[Ca^{2+}]_i \times B_{max-en}}{[Ca^{2+}]_i + K_{d-en}} \right) + \left(\frac{[Ca^{2+}]_i \times B_{max-in}}{[Ca^{2+}]_i + K_{d-in}} \right) \quad (3.5)$$

onde $[Ca^{2+}]_i$ é medida com indo-1; B_{max-en} e K_{d-en} correspondem à concentração máxima de sítios endógenos de ligação passiva de Ca^{2+} e à constante de dissociação aparente de Ca^{2+} nestes sítios, respectivamente (300 e 0,54 µM, Bassani *et al.*, 1998); B_{max-in} e K_{d-in} correspondem aos mesmos parâmetros para a ligação de Ca^{2+} com indo-1, assumidos, respectivamente, como 50 (Bassani & Bassani, 2002) e 0,844 µM (Bassani *et al.*, 1995b).

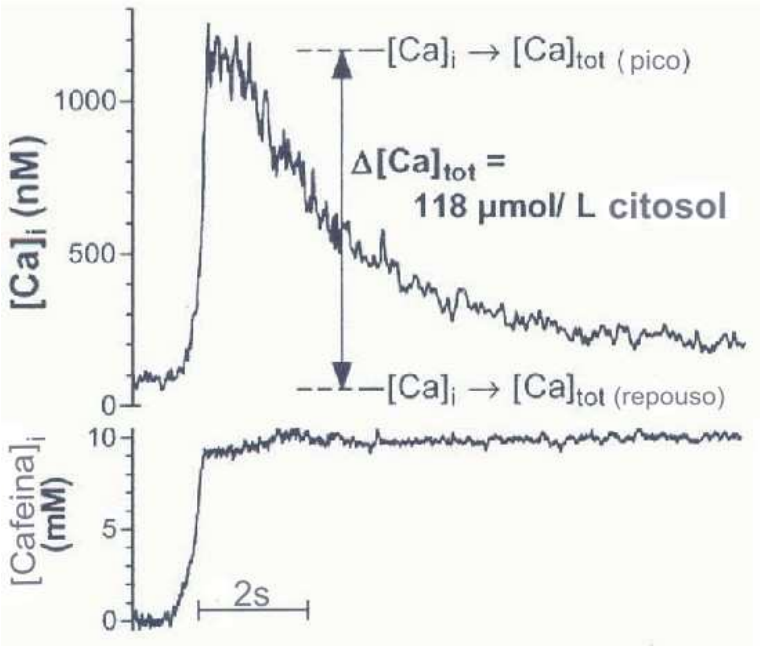

Figura 3.7 – Transiente de Ca^{2+} induzido pela aplicação rápida de cafeína (painel superior, com indicação da carga de Ca^{2+} do RS, $\Delta[Ca]_{tot}$) e concentração intracelular de cafeína (painel inferior). Modificado de Bers (2001).

A carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) foi considerada como a variação de $[Ca^{2+}]_T$ durante o transiente gerado pela aplicação de cafeína, i.e., a diferença entre os valores de pico e diastólico de $[Ca^{2+}]_T$.

3.9.6 Influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+}

Inicialmente, calculou-se o número de moles de Ca^{2+} equivalentes à carga transferida pelo influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} do sarcolema ($\Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa}$). Para isso, a

corrente foi integrada entre o início e o fim do pulso de APC, subtraindo-se a corrente de *holding*, quando necessário. A integral temporal de I_{Ca} ($\int I_{Ca} dt$) foi então dividida pela valência do íon Ca^{2+} (z=+2) e pela constante de Faraday (F= 96480 C/mol). Para estimar o impacto do influxo do íon sobre a $[Ca^{2+}]_T$ citosólica, dividiu-se o número de moles de Ca^{2+} que teve acesso ao meio intracelular via I_{Ca} pelo produto do volume celular e da fração não mitocondrial do volume celular (f_{nm}; 0,65; Olivetti, *et al.*, 1980; Hirakow *et al.*, 1980).

Neste trabalho, assumiu-se uma geometria celular cilíndrica, com secção transversal elíptica, e o volume celular (Vc) foi calculado como (Vornanen, 1996):

$$Vc = \pi \cdot a \cdot b \cdot c \tag{3.6}$$

onde c é o comprimento celular; a e b são 1/2 e 1/6 da largura celular, respectivamente. As dimensões celulares (comprimento e largura) foram medidas por meio de um micrômetro ocular.

Desta maneira, a variação $[Ca^{2+}]_T$ causada pelo influxo de $[Ca^{2+}]_i$ via I_{Ca} durante o pulso teste é:

$$\Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa} = \frac{\int I_{Ca} dt}{z \cdot F \cdot Vc \cdot f_{nm}} \tag{3.7}$$

onde $\int I_{Ca} dt$ é a integral temporal de I_{Ca}, z é a valência do íon Ca^{2+}, F é a constante de Faraday, Vc é o volume celular e f_{nm} é a fração não mitocondrial do volume celular.

3.9.7 Estimativa de FR

Como já mencionado anteriormente, FR foi estimada de acordo com Shannon *et al.* (2000) e Ginsburg *et al.* (2004):

$$FR = \frac{\Delta[Ca^{2+}]_{T,tw} - \Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa}}{[Ca^{2+}]_{RS}} \tag{3.8}$$

onde $\Delta[Ca^{2+}]_{T,tw}$ é a variação de $[Ca^{2+}]_T$ durante o transiente produzido pelo pulso teste; $\Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa}$ é o valor estimado do incremento na $[Ca^{2+}]_T$ devido ao influxo de Ca^{2+} via I_{CaL};

e $[Ca^{2+}]_{RS}$ é a carga de Ca^{2+} do RS. Neste método, assume-se que o termo dividendo da Eq. 3.8 equivale à quantidade de Ca^{2+} liberada pelo RS durante o pulso teste.

3.9 Análise estatística dos dados

Todos os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). A influência da freqüência estimulatória sobre todos os parâmetros de PA, transientes de Ca^{2+} e corrente de Ca^{2+} tipo L foi investigada por análise de variância monofatorial, e os contrastes comparados pelo teste de *Bonferroni*. O nível de significância estatística foi estabelecido para $p<0,05$.

4 Resultados

4 Resultados

4.1 Medições Eletrofisiológicas

4.1.1 Cálculo da capacitância de membrana

Após obter acesso elétrico ao interior da célula, o potencial de membrana foi fixado em -85 mV (V-*holding*) e um pulso de tensão quadrado de ± 5 mV foi aplicado, para permitir o cálculo da capacitância de membrana (C_m). Na Figura 4.1, é apresentado um registro típico de corrente de membrana em resposta a aplicação deste pulso. Este tipo de registro foi utilizado para o cálculo de C_m, segundo a Equação 3.4. Na Tabela 4.1, estão apresentados os valores médios relevantes para cálculo de C_m.

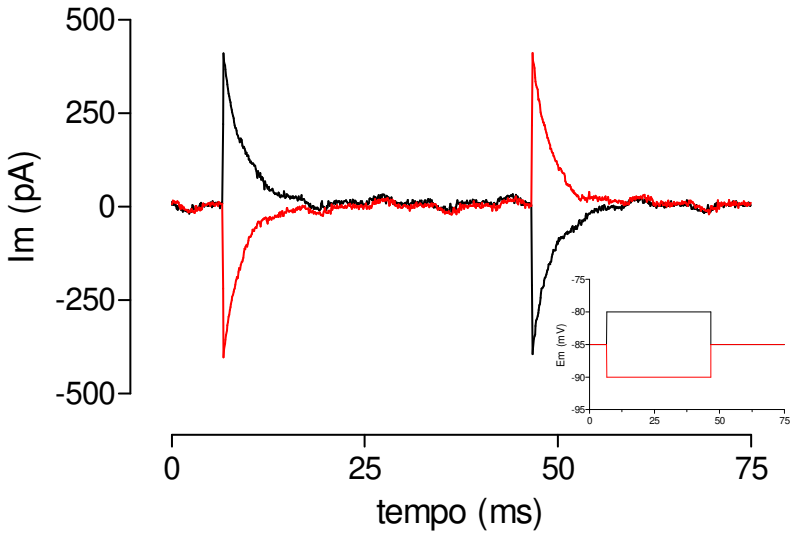

Figura 4.1 – Registro típico de corrente de membrana (I_m) evocada pela aplicação de um degrau de tensão de ±5 mV, a partir do potencial de -85 mV. Inset: pulsos de tensão aplicados.

Tabela 4.1 – Cálculo da capacitância de membrana (C_m). Média dos valores calculados para o pulso positivo e negativo de 5 mV a partir de -85 mV.

	A_0 (pA)	A_1 (pA)	τ (ms)	C_m (pF)
Média ± EPM (N)	23,4 ± 3,45 (38)	408 ± 37,7 (38)	1,16 ± 0,19 (38)	141,9 ± 3,98 (38)

4.1.2 Caracterização da corrente de Ca^{2+} tipo L

Antes de iniciar os experimentos descritos no capítulo anterior, teve-se o cuidado de caracterizar a corrente de membrana a ser registrada e confirmar sua identidade como a corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}). Portanto, foram realizados experimentos preliminares para determinação da curva corrente x tensão, a qual representa uma característica intrínseca de cada tipo de canal iônico de membrana. Em um outro grupo de experimentos, testou-se se a corrente registrada em APC havia sido isolada de outras correntes contaminantes (*e.g.*, corrente de sódio, potássio, entre outros). Além disso, foi realizada uma comparação entre a I_{CaL} evocada por pulso de *clamp* retangular e por APC.

a) Curva Corrente x Tensão (IxV)

Para a obtenção da curva IxV, os miócitos foram incubados em solução Tyr-00 por 5 a 10 min, para redução da concentração intracelular de Na^+, e perfundidos com solução Tyr-ICa durante o registro da I_{CaL}. A Figura 4.2 apresenta o registro típico da corrente de Ca^{2+} em resposta a pulsos retangulares de tensão com 100 ms de duração, a partir de um potencial de *holding* de -85 mV, para potenciais de -50 mV até +60 mV, com incrementos de 10 mV.

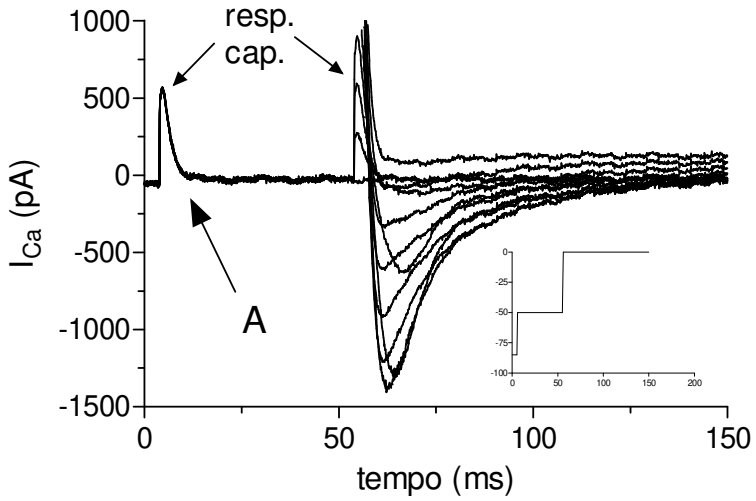

Figura 4.2 – Correntes de Ca^{2+} evocadas por 12 degraus de *voltage-clamp* (de -50 mV a +60 mV, com incrementos de 10 mV). O potencial de *holding* foi de -85 mV, com pré-pulso para -50 mV durante 50 ms. A ausência de corrente de Na^+ durante o pré-pulso (A) confirma o bloqueio dos canais de Na^+ pela solução Tyr-ICa. O *inset* apresenta 1 dos 12 pulsos de *clamp* usados para evocar a I_{CaL}

Os pulsos de *clamp* foram precedidos de um pré-pulso de -85 mV para -50 mV (a partir do potencial de *holding*) com duração de 50 ms, com o objetivo de ativar e posteriormente inativar canais de Na^+ (Gómez *et al.*, 2000). Como não foi observado desenvolvimento de corrente de entrada durante o pré-pulso (A, na Figura 4.2), podemos concluir que o procedimento de redução da concentração de Na^+ no interior da célula, aliado ao uso da solução Tyr-ICa (que não contém Na^+), foram capazes de eliminar a contaminação da corrente de Na^+ no registro da corrente de interesse. Este fato indica que foi possível eliminar a corrente de Na^+ sem a necessidade de aplicação do pré-pulso para isolamento de corrente I_{CaL}, e permite estimulação, durante experimentos de APC, com a mesma forma de onda do AP registrada, sem risco de contaminação significativa da corrente de membrana.

A Tabela 4.2 e Figura 4.3 apresentam a curva IxV média, obtida em 7 miócitos, na qual são mostradas a amplitude da I_{Ca} (Figura 4.3-A) e a densidade desta corrente (após normalização pela capacitância de membrana, Figura 4.3-B). Podemos observar a forma de "sino invertido" da curva IxV, com pico em aproximadamente 0 mV, que são típicos da I_{CaL} (Gómez *et al.*, 2000).

Tabela 4.2 – Curva IxV da corrente de Ca^{2+} (I_{CaL}) em miócitos ventriculares de rato. I_{CaL} está expressa como amplitude absoluta e densidade de corrente. Dados apresentados como média +/- EPM (N=7).

Em (mV)	I_{CaL} (pA)	I_{CaL} (pA/pF)
-50	-45,3 ± 37,7	-0,29 ± 0,19
-40	-67,0 ± 64,9	-0,42 ± 0,32
-30	-108,8 ± 109,4	-0,71 ± 0,75
-20	-228,6 ± 173,9	-1,48 ± 0,85
-10	-501,6 ± 102,8	-3,53 ± 0,59
0	-779,8 ± 129,6	-5,27 ± 0,87
10	-738,7 ± 205,8	-5,15 ± 0,48
20	-560,0 ± 180,1	-3,90 ± 0,20
30	-373,8 ± 140,4	-2,60 ± 0,86
40	-201,4 ± 88,2	-1,39 ± 0,53
50	-95,8 ± 44,0	-0,68 ± 0,31
60	-40,4 ± 17,1	-0,28 ± 0,11

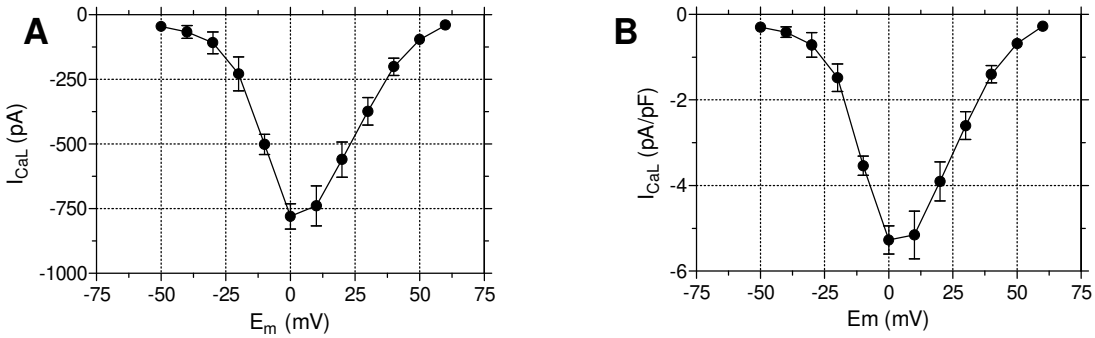

Figura 4.3 – Curvas corrente-tensão (IxV) da corrente de Ca^{2+} tipo L em miócitos ventriculares de rato, mostrando corrente absoluta (A) e densidade de corrente (B), após normalização pela capacitância de membrana. Os valores estão apresentados na Tabela 4.2. N= 7.

b) Sensibilidade ao bloqueio por Cd^{2+}

Utilizando a técnica de APC, procurou-se demonstrar que a corrente registrada durante os experimentos era de fato a corrente de Ca^{2+} tipo L. Para isso, registramos a corrente de membrana na ausência e na presença de 100 μM Cd^{2+}, que, nesta concentração, atua como bloqueador seletivo de canais de Ca^{2+} tipo L (Hess, 1988). A Figura 4.4-A apresenta o registro da corrente de membrana evocada em APC, na presença e na ausência de Cd^{2+}. Podemos observar que a adição de Cd^{2+} à solução Tyr-ICa praticamente eliminou o desenvolvimento de corrente, indicando que a corrente registrada na ausência de Cd^{2+} era de fato a corrente de Ca^{2+} tipo L. Na Figura 4.4-B, temos a corrente sensível a Cd^{2+}, obtida da subtração dos dois traçados da Figura 4.4-A.

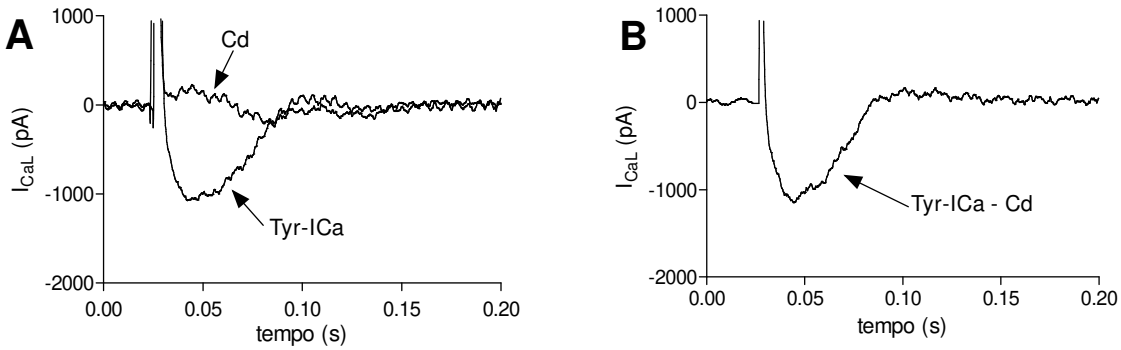

Figura 4.4 – Corrente de Ca^{2+} tipo L evocada por pulsos de APC. A) Registro de corrente de Ca^{2+} na ausência e na presença de Cd^{2+} (100 μM). B) Corrente de Ca^{2+} tipo L (sensível a Cd^{2+}), obtida pela subtração dos traçados apresentados em A.

c) Eliminação da corrente de Na^+ em experimentos com APC

De maneira análoga ao que foi descrito no item 4.1.2-a para pulsos estimulatórios retangulares, foi testada a eliminação da corrente de Na^+ durante perfusão com solução Tyr-ICa (após redução da concentração intracelular de Na^+) nos experimentos com APC. Um pré-pulso de -85 mv (potencial de *holding*) para -50 mV, com duração de 50 ms, foi aplicado imediatamente antes do pulso de APC. Como não houve geração de corrente de entrada durante o pré-pulso (Figura 4.5, A), pode-se concluir que houve sucesso do presente protocolo experimental na eliminação da corrente de Na^+. Este é um fato muito importante, pois, desta maneira, podemos utilizar o pulso de APC partindo de um potencial semelhante ao diastólico, o que é uma condição mais próxima da fisiológica.

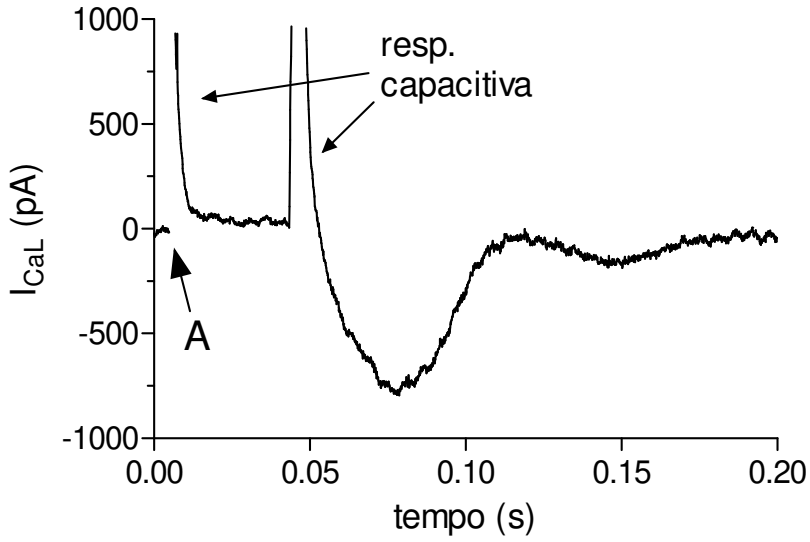

Figura 4.5 – Eliminação da corrente de Na^+ durante estimulação por APC. Um pré-pulso de -85 mV para -50 mV (duração de 50 ms) precedeu o pulso de APC. A ausência de corrente de Na^+ durante o pré-pulso (A) confirma a eliminação desta corrente neste procedimento experimental.

d) I_{CaL} evocada por pulso de *clamp* retangular e por APC

Para ressaltar a importância de se usar a técnica de APC para medir a I_{CaL}, registramos esta corrente, em um mesmo miócito, evocada por pulso de *clamp* retangular (duração de 200ms, de -85mV para +10mV, a 0,5Hz) e por APC (a 0,5 Hz). As diferenças

entre o curso temporal das duas correntes são apresentadas na Figura 4.6. Observa-se que o pico da I_{CaL} foi menor em APC e sua taxa de ativação e inativação também foram menores.

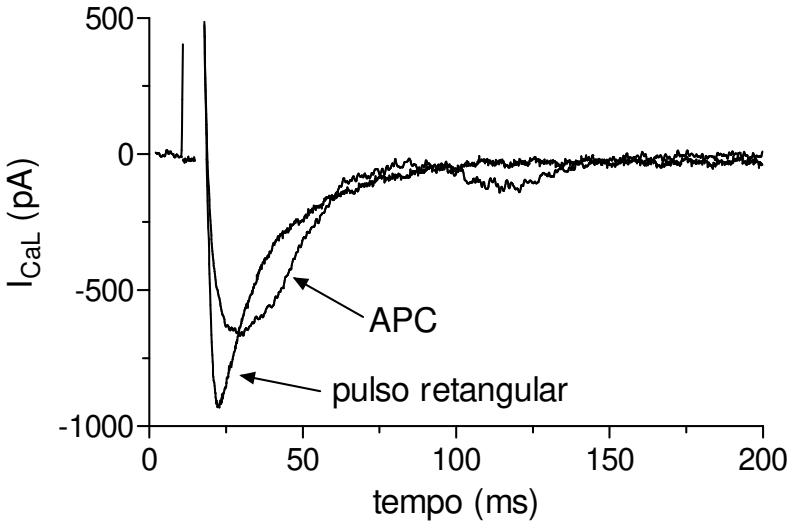

Figura 4.6 – Registros típicos de corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) evocadas com pulso de *clamp* retangular (duração de 200ms, de -85mV para +10mV, a 0,5Hz) e com pulso de APC (0,5 Hz).

4.2 Efeitos Eletrofisiológicos da Freqüência Estimulatória

4.2.1 Potencial de Ação

Após o registro de corrente para o cálculo da capacitância de membrana, foi iniciado o protocolo de registro de PA em diferentes freqüências estimulatórias. Para isso, o sistema de *patch clamp* foi alterado para a configuração *current- clamp,* e a corrente de *holding* ajustada para 0 nA. De acordo com o protocolo apresentado no item 3.9.2, um trem de 10 pulsos condicionante foi aplicado, e o décimo primeiro PA foi considerado como a forma de onda típica para aquela freqüência. Na Figura 4.7 apresentamos o registro de PAs obtidos a 0,1; 0,2; 0,5; 1, 2 e 3 Hz.

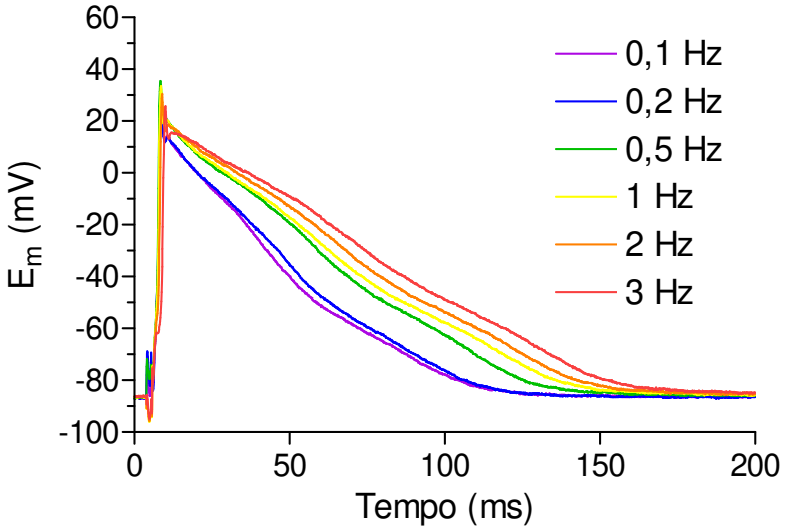

Figura 4.7 – Registro de potenciais de ação representativos, evocados a diferentes freqüências estimulatórias em um miócito ventricular esquerdo de rato.

Pode-se notar nestes registros que a duração do PA aumentou com o aumento da freqüência estimulatória. Desses registros, foram analisados os seguintes parâmetros: a) potencial de repouso (Vm); b) amplitude do PA (ΔVm); c) derivada temporal máxima da fase de despolarização do potencial de membrana (dV/dt); d) duração do PA até 20% da repolarização (APD20); e) duração do PA até 90% da repolarização (APD90); f) tempo para repolarização até 0 mV (t_{0mV}). Na Tabela 4.3, são apresentados os valores médios de todos estes parâmetros.

Tabela 4.3 – Parâmetros do potencial de ação (PA) analisados. Potencial de repouso (Vm-dia); amplitude do PA (ΔVm); derivada temporal máxima da fase de despolarização do potencial de ação (dV/dt); duração do PA até 20% da repolarização (APD20); duração do PA até 90% da repolarização (APD90); tempo para repolarização até 0 mV (t_{0mV}). (* p< 0,05 vs. 0,1Hz; teste de Bonferroni).

	Freqüência					
Parâmetro	0,1 Hz	0,2 Hz	0,5 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz
Vm-dia (mV)	-82,10 ± 7,85	-85,01 ± 3,68	-88,73 ± 3,63	-88,30 ± 3,42	-93,13 ± 4,21	-87,30 ± 6,08
ΔVm (mV)	123,6 ± 5,84	121,4 ± 4,55	124,2 ± 4,61	124,2 ± 5,68	127,7 ± 4,39	128,7 ± 9,39
dV/dt máx (mV/ms)	174,5 ± 17,92	171,8 ± 18,25	174,9 ± 16,64	154,7 ± 20,58	157,8 ± 18,26	170,9 ± 19,34
APD20 (ms)	3,74 ± 0,60	4,27 ± 0,45	5,09 ± 0,64	4,51 ± 0,68	4,33 ± 0,52	3,30 ± 0,20
APD90 (ms)	74,90 ± 7,97	76,49 ± 9,48	89,09 ± 11,29	99,82 ± 14,57	130,4 * ± 11,45	149,3 * ± 9,14
t_{0mV} (ms)	29,20 ± 1,92	30,66 ± 1,83	36,97 ± 3,17	41,32 ± 3,99	50,23 * ± 7,85	51,89 * ± 6,62
N	5	7	8	6	6	3

Os parâmetros Vm-dia e ΔVm não foram alterados significativamente pela variação da freqüência estimulatória (p > 0,05, Tabelas 4.4 e 4.5) e estão apresentados na Figura 4.8.

Tabela 4.4 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre o potencial de repouso.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	78,77	0,89	0,49
Resíduo	28	88,31		
Total	33			

Tabela 4.5 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a amplitude do PA.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	36,64	0,21	0,95
Resíduo	28	172,0		
Total	33			

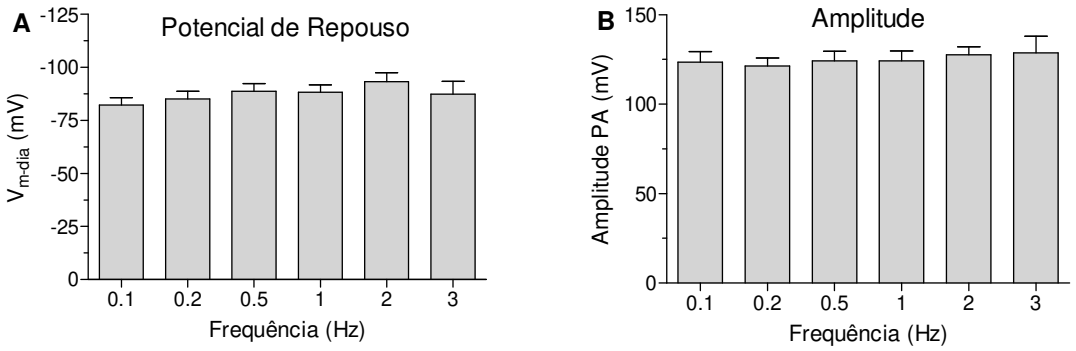

Figura 4.8 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o potencial de repouso (A) e amplitude do potencial de ação (B).

Da mesma forma, dV/dt também não sofreu efeito da variação da freqüência estimulatória ($p > 0,05$, Tabela 4.6). A Figura 4.9 apresenta o comportamento da dV/dt com a variação da freqüência.

Tabela 4.6 – Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a derivada temporal máxima da fase de despolarização do potencial de ação.

Causa de Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	16,87	0,1765	0,97
Resíduo	29	95,56		
Total	34			

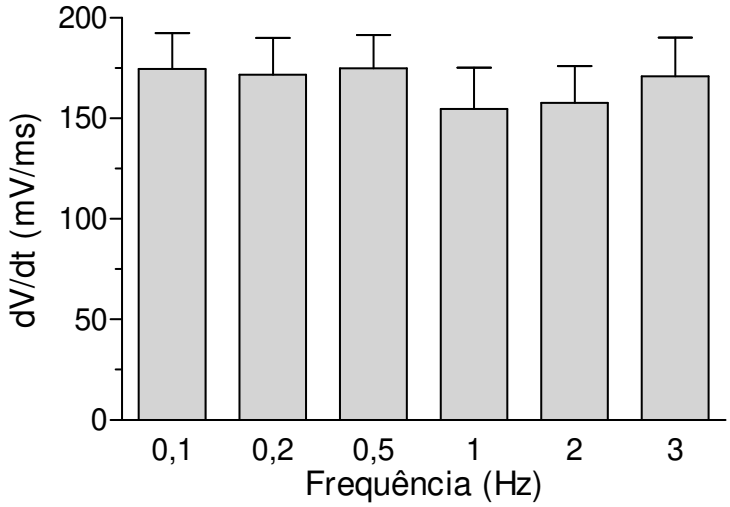

Figura 4.9 – Efeito da freqüência estimulatória sobre a derivada temporal máxima da fase de despolarização do potencial ação.

Os valores de APD20 e APD90 para as freqüências utilizadas são apresentados na Tabela 4.3 e na Figura 4.10. Apenas os valores de APD90 foram dependentes da freqüência estimulatória, com uma relação positiva entre este parâmetro e a freqüência ($p < 0,01$, Tabela 4.7 e 4.8).

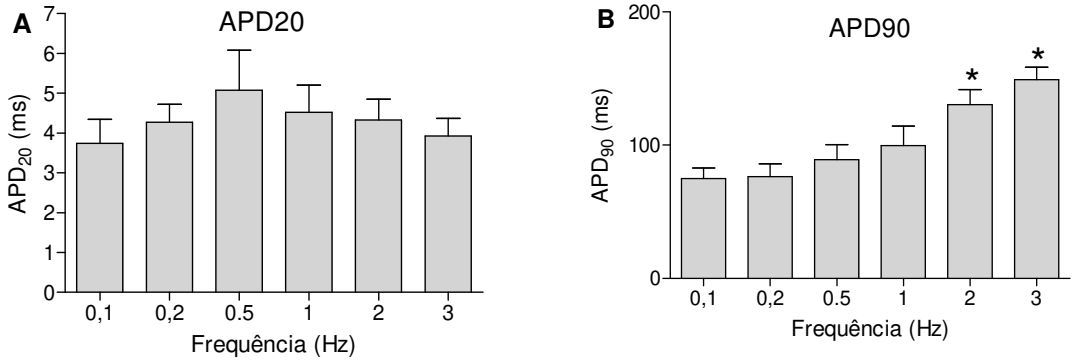

Figura 4.10 – Efeito da freqüência estimulatória sobre a duração do PA até 20% da repolarização (A, APD20) e duração do PA até 90% da repolarização (B, APD90). (* $p < 0,05$ vs. 0,1Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.7 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a APD20.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	1,12	0,51	0,76
Resíduo	28	2,19		
Total	33			

Tabela 4.8 – Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a APD90.

Causa de Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	4148	5,23	< 0,01
Resíduo	29	792,6		
Total	34			

Por fim, observou-se um efeito significativo da freqüência sobre o t_{0mV} ($p < 0,01$, Tabela 4.9 e Figura 4.11), que foi elevado pelo aumento da freqüência.

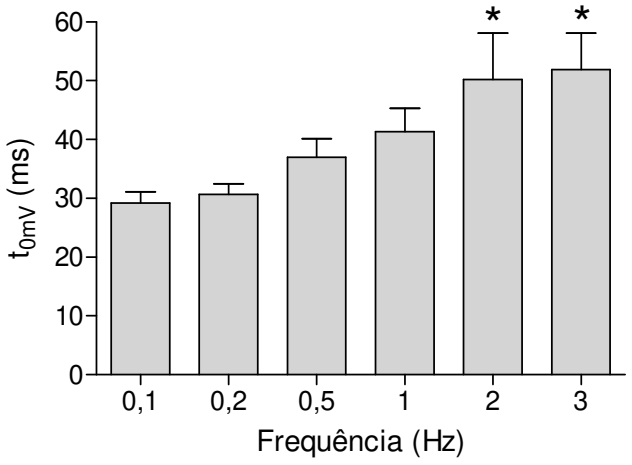

Figura 4.11 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o tempo para repolarização até 0 mV (t_{0mV}). (* $p < 0,05$ vs. 0,1Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.9 – Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre o tempo para repolarização até 0 mV (t_{0mV}).

Causa de Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	5	456,8	4,005	< 0,01
Resíduo	29	114,1		
Total	34			

4.2.2 Corrente de Ca^{2+} tipo L

Na Figura 4.12, temos o registro típico de I_{Ca} (em APC), expressa em valores absolutos (A) e de densidade de corrente (B). Esta é a corrente I_{CaL} registrada simultaneamente ao pulso teste da Figura 4.20, na freqüência 0,5.

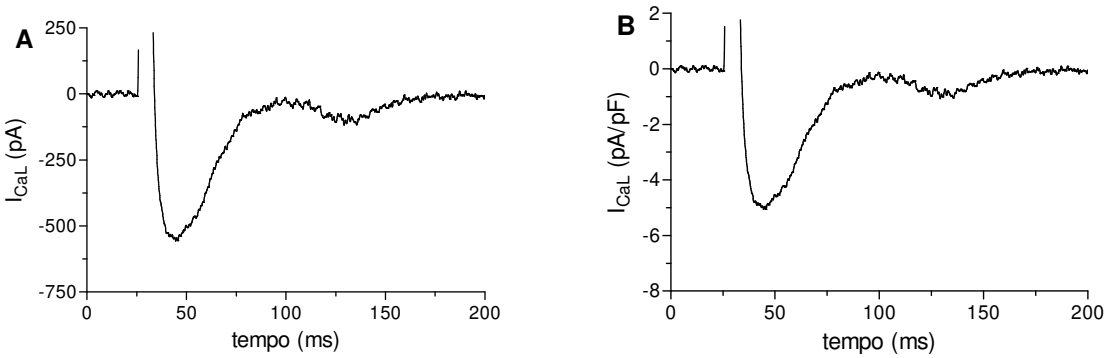

Figura 4.12 – Registro típico de I_{CaL} em miócito ventricular de rato estimulado por *action potential clamp* a 0,2 Hz. A) Valor absoluto de corrente. B) Densidade de corrente após normalização pela capacitância de membrana (110 pF).

Na Figura 4.13 apresentamos o curso temporal típico de I_{CaL} registrada em 0,2 e 2 Hz. Estes registros foram feitos durante o 11º. pulso de APC, usando-se a forma de onda característica de cada freqüência.

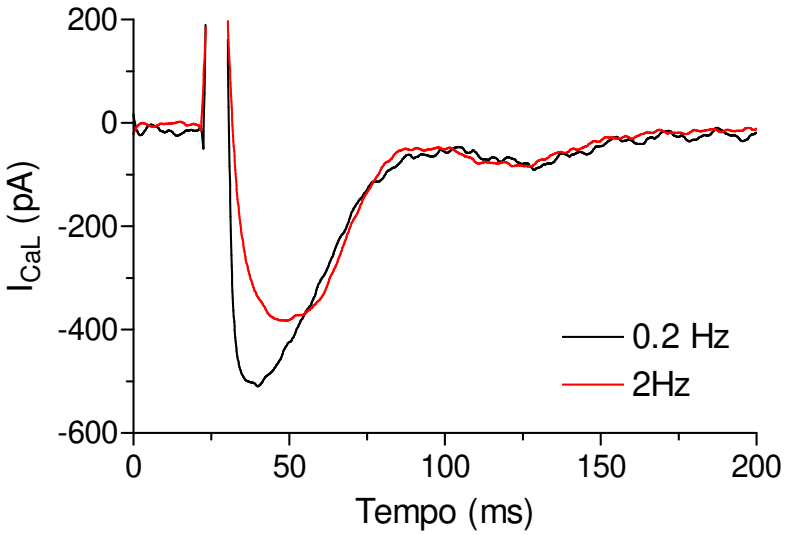

Figura 4.13 – Curso temporal típico da corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}), registrada em duas freqüências estimulatórias (0,2 e 2 Hz). O aumento da freqüência reduziu o pico da corrente, reduziu sua integral temporal e tornou mais lenta tanto a fase de ativação quanto a fase de inativação da corrente.

Na Tabela 4.10 e na Figura 4.14 estão apresentados os valores do pico de I_{CaL} em uma faixa maior de freqüências estimulatórias. Foi detectada uma redução significativa do pico de I_{CaL} com o aumento da freqüência ($p< 0,05$; Tabela 4.11).

Tabela 4.10 – Parâmetros da corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}): valor de pico de densidade de I_{CaL}, e constantes de tempo de ativação (τ_{ativ}) e de inativação (τ_{inat}). (* $p< 0,05$ vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

	Freqüência			
Parâmetro	0,2 Hz	0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
pico I_{CaL} (pA/pF)	-4,50 ± 0,68	-3,30 ± 0,37	-2,88 * ± 0,29	-2,72 * ± 0,39
τ_{ativ} (ms)	1,65 ± 0,09	1,87 ± 0,22	2,36 ± 0,39	2,61 * ± 0,35
τ_{inat} (ms)	25,07 ± 2,64	27,10 ± 1,67	29,94 ± 1,81	35,64 * ± 2,27
N	7	6	8	8

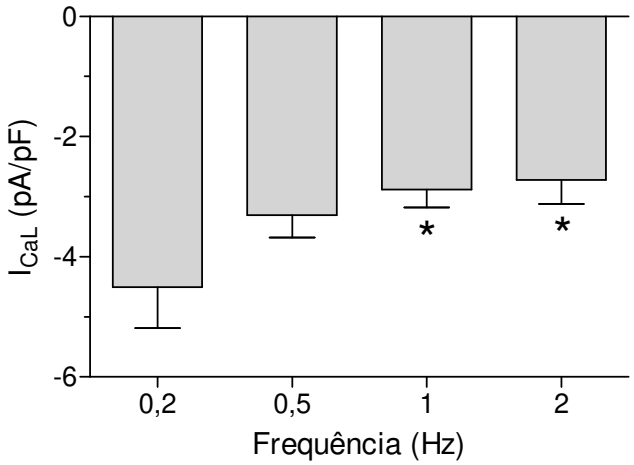

Figura 4.14 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o valor de médio do pico da corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}).

Tabela 4.11 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre o pico da corrente de Ca^{2+} tipo L.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	3	4,587	3,118	0,04
Resíduo	24	1,471		
Total	27			

A alteração da freqüência estimulatória também provocou efeitos sobre a dinâmica de I_{CaL}. Para evidenciar este fato, apresenta-se na Figura 4.15 os mesmos registros da Figura 4.13, porém normalizados pelo respectivo pico de I_{CaL}. Desta maneira, pode-se observar que ambas as fases de ativação e de inativação de I_{CaL} ficaram mais lentas com o aumento da freqüência. A Tabela 4.10 e a Figura 4.16 mostram as constantes de tempo de ativação (τ_{ativ}) e de inativação (τ_{inat}) de I_{CaL}. O aumento da freqüência estimulatória aumentou significativamente ambos os parâmetros ($p < 0,05$; Tabelas 4.12 e 4.13).

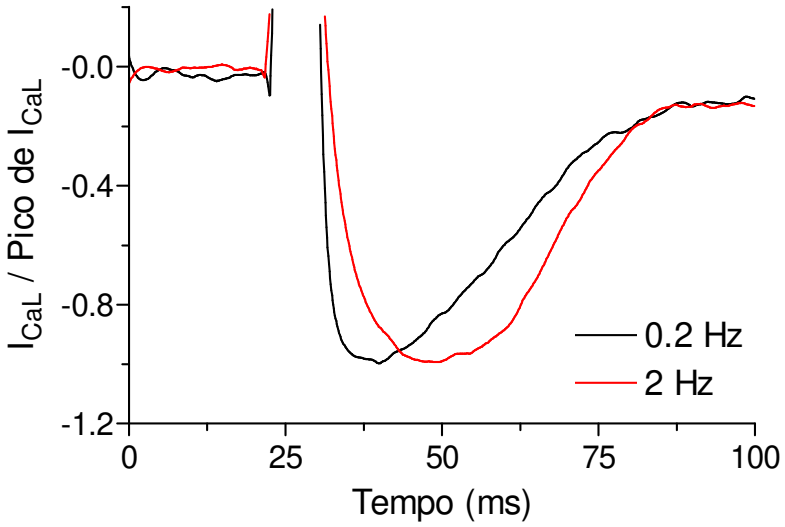

Figura 4.15 – Curso temporal típico das correntes de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) registradas em duas freqüências estimulatórias e normalizadas pelos respectivos valores de pico. Note que as fases de ativação e inativação da corrente se tornaram mais lentas com o aumento da freqüência estimulatória.

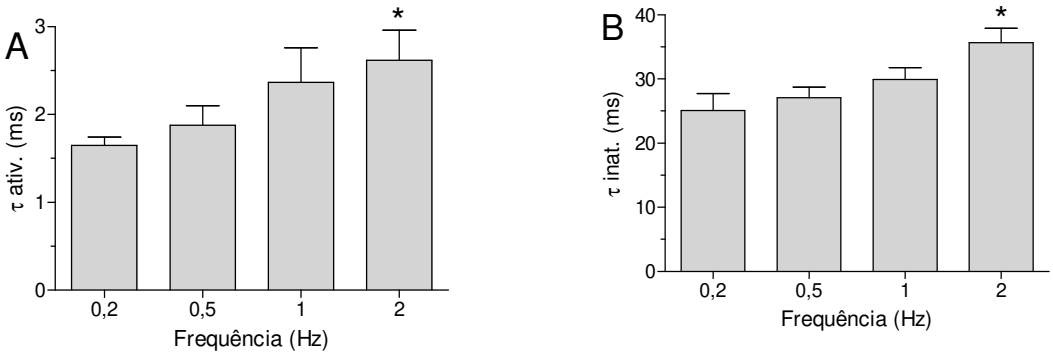

Figura 4.16 – Efeito da freqüência estimulatória sobre a constante de tempo de ativação (τ_{ativ}; A) e de inativação (τ_{inat}; B) da corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) (N = 7). (* p< 0,05 vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.12 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a constante de tempo de ativação da corrente de Ca^{2+} tipo L.

Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	3	0,8543	3,919	0,03
Resíduo	12	0,2180		
Total	15			

Tabela 4.13 - Análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a constante de tempo de inativação da corrente de Ca^{2+} tipo L.

Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	3	94,87	3,687	0,04
Resíduo	12	25,73		
Total	15			

4.3 Efeito da Freqüência Estimulatória sobre o Acoplamento Excitação-Contração

4.3.1 Transientes de Ca^{2+}

Ao iniciarmos o protocolo de registro simultâneo de transientes e corrente de Ca^{2+}, optamos por reduzir a faixa de freqüências utilizada, excluindo as freqüências extremas de 0,1 e 3 Hz. A freqüência de 0,1 Hz foi excluída porque a forma de onda do PA era praticamente idêntica àquela a 0,2 Hz. Por outro lado, poucas células responderam à estimulação a temperatura ambiente. Na Tabela 4.14 e na Figura 4.17, estão apresentados os valores médios da amplitude dos transientes de Ca^{2+} nas freqüências de interesse (0,2; 0,5; 1 e 2 Hz). No *inset* desta figura, pode-se observar o curso temporal típico de um transiente de Ca^{2+} na freqüência de 0,5 Hz. A análise de variância monofatorial indicou redução significativa da amplitude dos transientes com o aumento da

freqüência estimulatória ($p< 0,05$; Tabela 4.15), ou seja, foi observada uma relação negativa entre a amplitude dos transientes de Ca^{2+} e a freqüência. Por outro lado, o aumento da freqüência não provocou variação significativa da concentração intracelular de Ca^{2+} diastólica ($[Ca^{2+}]_{dia}$) ($p< 0,05$; Tabela 4.16).

Tabela 4.14 – Parâmetros do transiente de Ca^{2+} analisados (concentração intracelular de Ca^{2+} diastólica ($[Ca^{2+}]_{dia}$) e amplitude do transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$)) e valores calculados de influxo de Ca^{2+}, carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) e liberação fracional de Ca^{2+} do RS (FR). (* $p< 0,05$ vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

	Freqüência			
Parâmetro	0,2 Hz	0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
$[Ca^{2+}]_{dia}$ (nM)	215 ± 25	200 ± 24	211 ± 7	258 ± 12
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (nM)	603 ± 56	550 ± 63	544 ± 29	408 * ± 32
influxo de Ca^{2+} (µM)	8,04 ± 1,15	5,17 ± 1,06	3,74 * ± 0,63	4,14 * ± 0,81
$[Ca^{2+}]_{RS}$ (µM)	129,4 ± 7,8	141,1 ± 8,8	153,7 ± 6,0	136,2 ± 8,0
FR	0,81 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,68 * ± 0,03	0,54 * ± 0,02
N	7	6	8	8

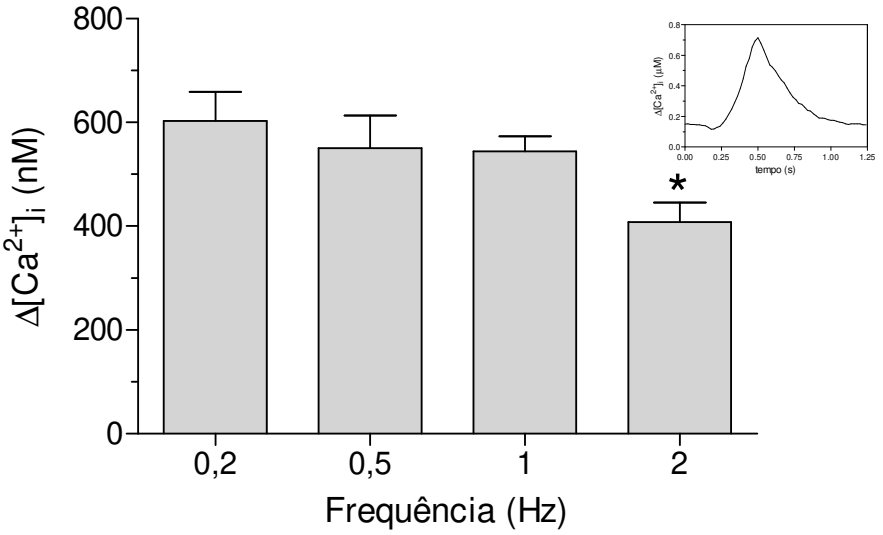

Figura 4.17 – Amplitude média dos transientes de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) evocados em miócitos ventriculares de rato a diferentes freqüências estimulatórias. (N = 7;). *Inset*: Registro de um transiente de Ca^{2+} obtido sob estimulação a 0,5 Hz. (* p< 0,05 vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.15 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a amplitude dos transientes de Ca^{2+}.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	3	48640	3,242	0,03
Resíduo	24	15010		
Total	27			

Tabela 4.16 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a concentração intracelular de Ca^{2+} diastólica.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Freqüência	3	4373	1,983	0,14
Resíduo	24	2205		
Total	27			

4.3.2 Variação de $[Ca^{2+}]_T$ causada pelo influxo de Ca^{2+}

Como mostrado na Tabela 4.14 e Figura 4.18, o aumento de freqüência reduziu não apenas o pico de I_{CaL}, como também reduziu acentuadamente o aumento estimado de $[Ca^{2+}]_T$ dependente do influxo de Ca^{2+} através dessa corrente. ($p< 0,05$; Tabela 4.18).

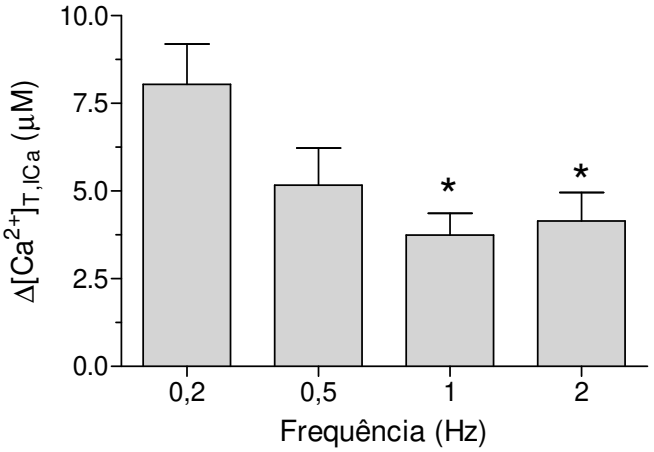

Figura 4.18 – Efeito da freqüência estimulatória sobre o valor médio do aumento da concentração citosólica total de Ca^{2+} dependente do influxo via corrente de Ca^{2+} do tipo L. (* $p< 0,05$ vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.18 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre aumento da concentração citosólica total de Ca^{2+} dependente do influxo via corrente de Ca^{2+} do tipo L.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Freqüência	3	27,13	4,660	0,01
Resíduo	24	5,821		
Total	27			

4.3.3 Carga de Ca^{2+} do RS

Na Tabela 4.14 e na Figura 4.19, estão apresentados os valores médios de $[Ca^{2+}]_{RS}$ em função da freqüência estimulatória. Não foi encontrada influência significativa da freqüência estimulatória sobre esta variável. ($p > 0,05$; Tabela 4.19).

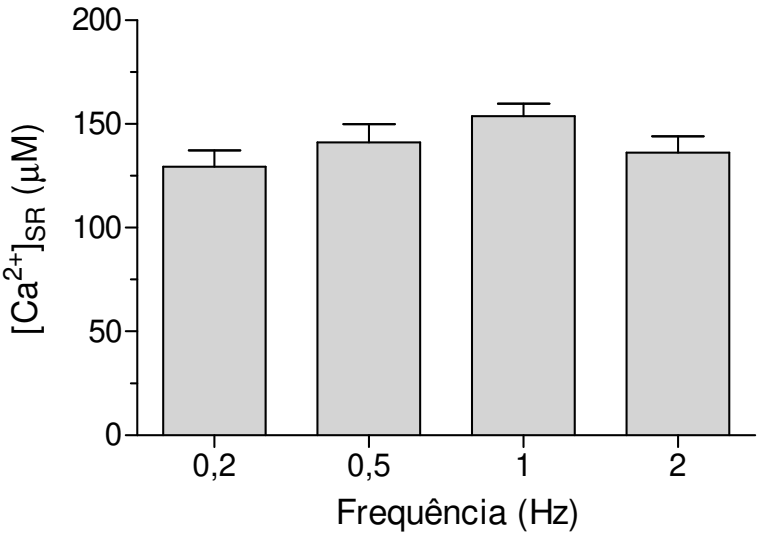

Figura 4.19 – Estimativa da carga de Ca^{2+} do RS ($[Ca^{2+}]_{RS}$) em miócitos ventriculares de rato estimulados com diferentes freqüências.

Tabela 4.19 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a carga de Ca^{2+} do RS.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Freqüência	3	797,0	1,993	0,14
Resíduo	24	399,8		
Total	27			

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

A Figura 4.20 apresenta um registro típico de transientes de Ca^{2+} em um miócito estimulado via APC, na freqüência de 0,5 Hz. Durante a fase de recarga (10 pulsos de APC condicionantes), podemos observar um aumento gradativo da amplitude dos transientes de Ca^{2+}, com estabilização aproximadamente no sétimo transiente. Isto indica que os 10 pulsos foram suficientes para que o RS atingisse sua carga de *steady-state* (Bassani *et al.*, 2004). De acordo com nosso procedimento experimental (item 3.9.4), o décimo primeiro transiente (pulso teste) foi utilizado para o cálculo de $\Delta[Ca^{2+}]_{T,ICa}$.

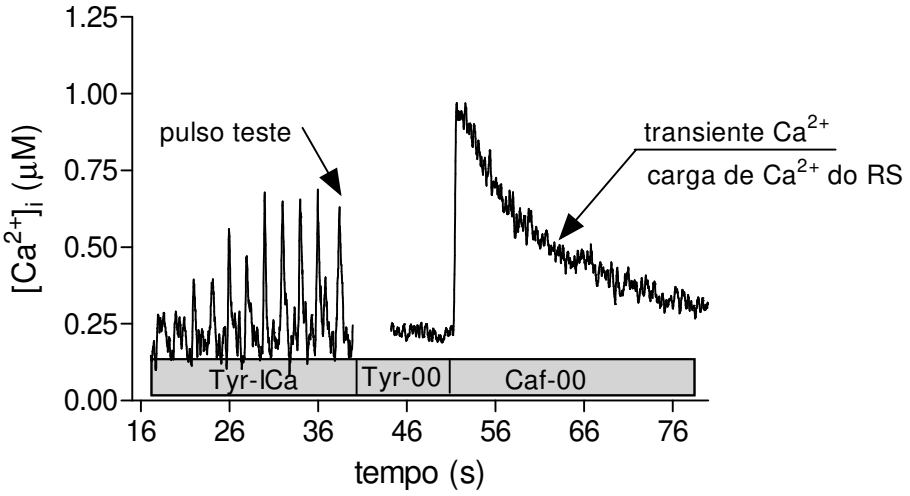

Figura 4.20 – Registro típico de transientes de Ca^{2+} em miócito ventricular de rato estimulado por *action potential clamp* a 0,5 Hz.

Para o cálculo da FR, utilizou-se o transiente de Ca^{2+} e o incremento estimado do aumento da $[Ca^{2+}]_T$ dependente do influxo de via I_{CaL} durante o pulso teste, bem como a $[Ca^{2+}]_{SR}$. Apenas para se ter uma idéia do curso temporal do transiente de Ca^{2+} comparado ao da I_{CaL}, ambos os sinais estão apresentados na mesma escala de tempo (Figura 4.21). Pode-se observar que a fase de maior amplitude da corrente precede a fase de subida do transiente, o que está de acordo com a indução de liberação de Ca^{2+} do SR nos primeiros 50 ms após a despolarização da membrana (Puglisi *et al.*, 1999).

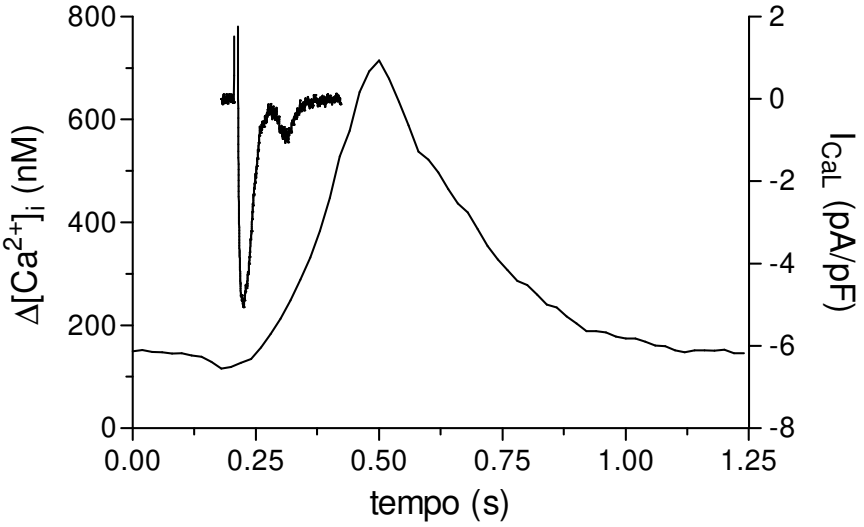

Figura 4.21 – Registro simultâneo de transiente de Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) em miócito ventricular de rato estimulado por *action potential clamp* a 0,2 Hz.

Por fim, os valores estimados de FR estão apresentados na Tabela 4.14 e na Figura 4.22. Observamos a existência de uma relação negativa entre a FR em *steady-state* e a freqüência estimulatória, caracterizada pela redução significativa da FR ($p< 0,01$; Tabela 4.20) com o aumento da freqüência.

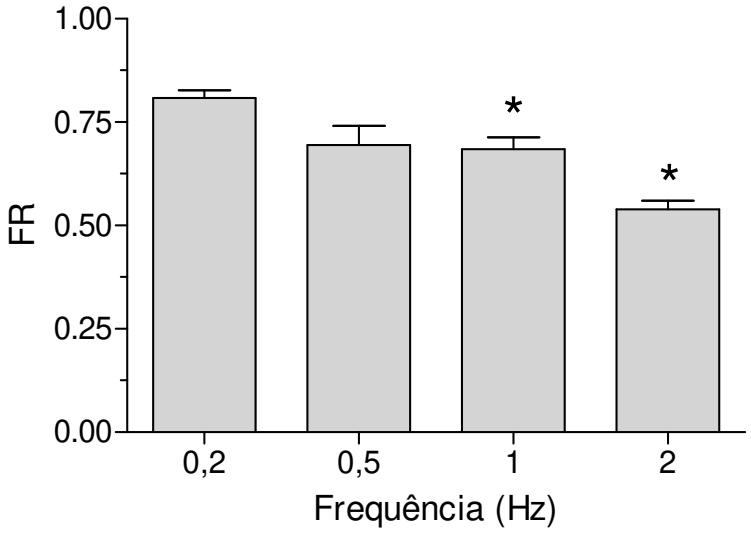

Figura 4.22 – Efeito da freqüência sobre a liberação fracional de Ca^{2+} do RS (FR). (* $p< 0,05$ vs. 0,2Hz; teste de Bonferroni).

Tabela 4.20 - Resultado da análise de variância monofatorial para investigar o efeito da freqüência estimulatória sobre a liberação fracional de Ca^{2+} do RS.

Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	P
Freqüência	3	0,08574	14,86	<0,0001
Resíduo	24	0,005772		
Total	27			

5 Discussão

5 Discussão

No presente trabalho, apresentamos os resultados obtidos de medições eletrofisiológicas e de fluorescência realizadas em miócitos ventriculares de rato estimulados em diferentes freqüências, com o objetivo de analisar a influência da freqüência estimulatória sobre o acoplamento excitação-contração. Dentre eles, destacamos o registro de PA na configuração *perforated patch-clamp*, bem como o registro simultâneo de transientes de Ca^{2+} e de I_{CaL} evocados por formas de onda da mesma configuração que o PA. Com estes dados, foi possível, pela primeira vez, estimar a liberação fracional de Ca^{2+} do RS em *steady-state* em diferentes freqüências estimulatórias.

5.1 Capacitância de membrana

Para medir a C_m, dois pulsos retangulares de tensão ($\Delta E_m = \pm 5$ mV, a partir do potencial de repouso) foram aplicados à membrana do miócito após o acesso elétrico ao mesmo. Como mostrado na Figura 4.1, a resposta da corrente de membrana a estes dois pulsos foi semelhante, tanto para o pulso positivo quanto para o pulso negativo. Isto indica que, nestes níveis de tensão, não ocorreu ativação significativa de canais iônicos, e que as correntes registradas podem ser consideradas como capacitivas. Este é um importante pré-requisito para este modo de estimativa da C_m. Os valores de C_m estimados estão de acordo com os valores descritos na literatura para este tipo celular (Satoh *et al.*, 1996) e com dados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Ferraz, 2003)

5.2 Caracterização da corrente de Ca^{2+} tipo L

Antes de iniciarmos os experimentos específicos para o cálculo da FR (descritos no item 3.9.4), realizamos uma série de experimentos preliminares com o objetivo de caracterizar a corrente de membrana registrada. Além disso, foi possível confirmar se esta corrente era I_{CaL}, sem contaminação de outras correntes iônicas de membrana (*e.g.*, corrente de K^+ e Na^+).

Primeiramente, determinamos a curva corrente x tensão (IxV). Este tipo de curva permite inferência sobre a dependência de tensão da ativação de um dado tipo de canal iônico, a qual, assim como o gradiente eletroquímico para o fluxo do íon, determina a

magnitude da corrente que flui pelos canais. Portanto, cada tipo de canal dependente de tensão de membrana apresenta uma relação IxV característica.

A curva IxV mostrada na Figura 4.3 apresenta características típicas da curva IxV de canais de Ca^{2+} tipo L (Bers, 2001). O pico da densidade de corrente foi -5,27 ± 0,87 pA/pF, para o pulso de *clamp* de -85 para 0 mV, que se mostrou muito próximo dos valores encontrados na literatura (Gómez *et al.*, 2000; Shi, 2007).

A estratégia inicialmente escolhida para remover a contaminação da I_{CaL} com a corrente de Na^+ dependente de tensão era utilizar um pré-pulso, a partir do potencial de *holding* para -50 mV. Esta abordagem é bastante utilizada com o objetivo de inativar canais de Na^+ dependentes de tensão previamente ao pulso teste, de modo que durante o último, esses canais estejam indisponíveis para ativação (Gómez *et al.*, 2000). Posteriormente, foi tentada outra abordagem (Ginsburg *et al.*, 1998): a de registar I_{CaL} durante perfusão com uma solução na qual Na^+ fosse substituído por um íon que não permeasse os canais (solução Tyr-ICa), no caso, tetraetilamônio (que também atua como inibidor de canais de K^+). No entanto, como era necessária a presença de concentração milimolar de Ca^{2+} no perfusato para a geração de I_{CaL}, a simples remoção do Na^+ extracelular implicaria em grande influxo de Ca^{2+} pelo NCX, o que levaria a sobrecarga celular do íon e tornaria impossível a realização dos experimentos propostos. Para evitar este problema, as células foram perfundidas com solução Tyr-00 por vários minutos antes da introdução da solução Tyr-ICa. Este procedimento causa depleção do Na^+ intracelular, impedindo assim o influxo de Ca^{2+} quando este íon é reintroduzido no perfusato (Bassani *et al.*, 1992). Nesta condição, podemos notar que o pré-pulso não ativou a corrente de Na^+ (seta "A" na Figura 4.5), o que indica que, com a pré-perfusão com solução Tyr-00, a aplicação do pré-pulso não é necessária para eliminar esta contaminação. A eliminação do pré-pulso permite a aplicação de uma forma de onda estimulatória mais semelhante à fisiológica.

A minimização de outras correntes contaminantes foi feita com base na composição das soluções de perfusão e de pipeta. Para a eliminação de I_{to} (corrente transitória de saída de K^+), adicionou-se 4-AP à solução de perfusão (Wang & Duff, 1997). Para bloquear I_K (corrente de K^+ com retificação de saída), além da presença de tetraetilamônio no perfusato, K^+ foi substituído por Cs^+ no perfusato e na solução de pipeta, exceto por uma pequena quantidade de K^+ na última (1 mM), para minimizar interferência na liberação de Ca^{2+} do RS (Meissner *et al.*, 1997). Em relação à I_{Cl}, assumimos que esta corrente seja desprezível à temperatura na qual os experimentos

foram realizados (23°C), uma vez que ela só foi detectada em miócitos ventriculares em temperatura próxima da fisiológica (Puglisi *et al.*,1999).

Nessas condições, foi possível demonstrar que a corrente de membrana desenvolvida em resposta a pulsos despolarizantes foi praticamente eliminada pela presença de 100 μM de Cd^{2+} , um bloqueador seletivo de canais de Ca^{2+} tipo L. Assim, pode-se concluir que a corrente registrada era de fato I_{CaL}.

5.3 Efeito da freqüência estimulatória sobre o potencial de ação

Neste trabalho, foram registrados PAs evocados a diferentes freqüências estimulatórias. A utilização da técnica *perforated patch-clamp*, para registro de PAs possibilitou um registro menos "invasivo" (sem diálise intracelular), se comparado ao clássico *ruptured patch-clamp* (Horn & Marty, 1988), tornando nossos registros de PA mais confiáveis. Porém, esta técnica é relativamente mais complexa. Foi necessário um longo período de experimentos exploratórios até se encontrar a melhor relação entre formato do microeletrodo, solução de pipeta e concentração do antibiótico (no caso, anfotericina) para que se atingisse sucesso nos experimentos.

O potencial de repouso e amplitude do PA, não apresentaram variação significativa com o aumento da freqüência estimulatória, e seus valores foram comparáveis aos encontrados na literatura (Shigematsu *et al.*, 1997; Fauconnier *et al.*, 2003; Ferraz, 2003). Outros autores também não observaram variação da amplitude do PA (Shigematsu *et al.*, 1997; Fauconnier *et al.*, 2003). Por outro lado, Fauconnier *et al.* (2003) relataram ligeira despolarização diastólica em músculo papilar isolado em resposta ao aumento de freqüência.

Os mecanismos envolvidos no efeito da freqüência estimulatória sobre o PA (e também sobre correntes de membrana, de maneira geral) são muito complexos. Há muito tempo se sabe que a variação da freqüência altera a duração do PA cardíaco (APD; Boyett & Jewell, 1978; Attwell *et al.*, 1981). Dependendo da espécie, a relação APD-frequência pode ser negativa (mais comum), como é o caso do gato, cobaia e humano (Li *et al.*, 1999; Carmeliet, 2004) ou positiva, como é o caso do rato (Shigematsu *et al.*, 1997; Fauconnier *et al.*, 2003; presentes resultados), hamster (Kocic *el al.*, 2002) e coelho (Bassani *et al.*, 2004).

A variação da freqüência estimulatória (ou do intervalo entre estímulos) pode causar alterações no PA que podem ser separadas em dois tipos: i) alterações transitórias, caracterizadas como uma fase de adaptação, e que ocorrem também em

resposta a extra-sístoles (Bassani *et al*., 2004; Zaniboni *et al*., 2007); e ii) alterações sustentadas, em resposta a um aumento ou diminuição mantido da freqüência estimulatória (Carmeliet, 2004). Neste trabalho, buscou-se analisar as alterações do segundo tipo.

O curso temporal do PA cardíaco está intimamente relacionado às correntes de membrana carregada por diversos íons (principalmente Na^+, Ca^{2+} e K^+; Bers, 2001), sejam elas conduzidas por canais ou transportadores. Isto significa que características de ativação, inativação e recuperação da inativação dos canais, e *driving-force* para o fluxo iônico, entre outros fatores, determinam de maneira marcante a forma de onda do PA. Por sua vez, esta última influencia a função de canais dependentes de tensão e de transportadores.

Neste estudo, foi observada uma relação positiva, estatisticamente significativa, entre APD90 e a freqüência estimulatória, que poderia, em tese, ser gerada por diversos mecanismos. Um possível mecanismo seria alteração do transporte iônico pelo NCX, que contra-transporta 3 íons de Na^+ em troca por 2 íons de Ca^{2+} e, portanto, é eletrogênico (Blaunstein & Lederer, 1999). A direção de transporte de Na^+ e Ca^{2+} depende dos gradientes transmembrana de concentração de Na^+ e Ca^{2+} e do potencial de membrana (E_m). Estes parâmetros determinam o potencial de reversão do NCX ($E_{Na/Ca}$), que é dado por:

$$E_{Na/Ca} = 3E_{Na} - 2E_{Ca} \qquad (5.1)$$

onde E_{Na} e E_{Ca} são os potenciais de equilíbrio do Na^+ e do Ca^{2+}, respectivamente.

Para melhor compreensão deste mecanismo, apresentamos na Figura 5.1 o comportamento de $E_{Na/Ca}$ e da *driving force* do NCX (a diferença entre E_{NCX} e E_m) durante um PA.

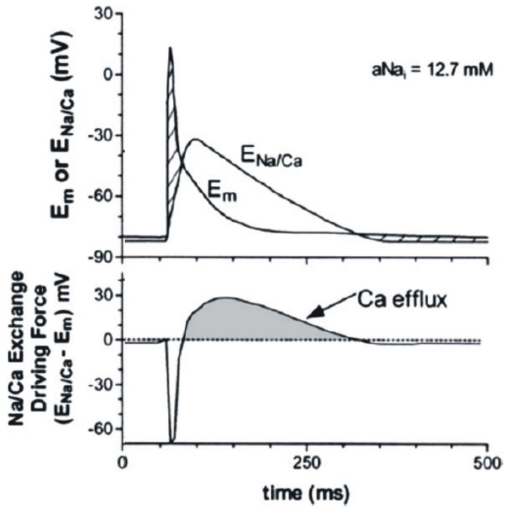

Figura 5.1 – Comportamento do potencial de reversão ($E_{Na/Ca}$) e *driving force* da NCX durante um PA no rato. (Shattock & Bers, 1989).

Considera-se que a principal função do NCX é transportar Ca^{2+} para fora da célula, balanceando, em regime permanente, o influxo de Ca^{2+} via I_{CaL} (Bers, 2001). Como ele é eletrogênico, alterações no curso temporal da I_{NCX} podem afetar de maneira significativa o curso temporal do PA.

Despa *et al.* (2002) relataram aumento da concentração intracelular de Na^+ ($[Na^+]_i$) em resposta ao aumento da freqüência estimulatória em miócitos ventriculares de rato. O aumento de $[Na^+]_i$ tende a tornar $E_{Na/Ca}$ mais negativo, o que reduziria a *driving force* para extrusão de Ca^{2+} (que gera uma corrente despolarizante), como observado por Martin *et al.* (2003), além de facilitar o modo reverso da troca (que gera uma corrente hiperpolarizante), principalmente durante a despolarização da membrana. Essa modificação de $E_{Na/Ca}$ *per se* tenderia a produzir encurtamento do AP com o aumento de freqüência (i.e., menor corrente despolarizante e maior corrente hiperpolarizante à medida que $[Na^+]_i$ é elvada), o que é o oposto do observado no presente estudo. Porém, essa mudança poderia, em tese, ser revertida posteriormente se a alteração inicial da *driving force* que leva a menor extrusão de Ca^{2+} resultasse em maior acumulação de Ca^{2+} no RS, e consequentemente, maior quantidade liberada. A $[Ca^{2+}]_i$ mais alta atingida durante a liberação do íon poderia modificar $E_{Na/Ca}$ para valores menos negativos, o que favoreceria o desenvolvimento de corrente despolarizante carreada pelo influxo de Na^+/efluxo de Ca^{2+}. Neste caso, poderia ocorrer prolongamento do PA com a frequência, acompanhado por aumento da $[Ca^{2+}]_{SR}$. Porém, encontramos aumento da APD sem alteração da $[Ca^{2+}]_{SR}$, o que indica que não deve ter ocorrido aumento da carga celular do íon, e que

torna pouco provável que aumento da I_{NCX} (despolarizante) com a freqüência seja o responsável pela relação positiva encontrada entre APD e frequência. Além disso, o aumento de $[Na^+]_i$ relatado por Despa *et al*. (2002) não foi instantâneo, mas demorou mais de 2 min para ser atingido, mesmo a altas frequências. No caso do presente trabalho, é pouco provável que apenas 10 pulsos condicionantes tenham sido suficientes para promover elevação significativa de $[Na^+]_i$.

O aumento da APD em miócito ventricular de ratos em resposta ao aumento da freqüência estimulatória foi atribuído por Shigematsu *et al.* (1997) à redução do recrutamento de canais que medeiam I_{to} com o encurtamento do intervalo diastólico. No ventrículo de rato, esta corrente é formada por 2 componentes distintos: um componente com rápida recuperação da inativação ($I_{to,f}$, constante de tempo de 20-40 ms) e um com recuperação lenta ($I_{to,s}$, constante de tempo de 1-3 s; Shigematsu, *et al.*, 1997; Wickenden *et al.*, 1999; Patel & Campbell, 2005; Bassani, 2006; Niwa & Nerbonne, 2010). Dada a lenta recuperação de $I_{to,s}$, seria razoável supor acumulação da inativação desta corrente com o aumento da freqüência, causando prolongamento do PA. Deve-se considerar que a densidade de I_{to} no miocárdio é cerca de 10 vezes maior no rato do que em outras espécies (Josephson *et al.*, 1984). Esta corrente é considerada como um dos principais responsáveis pelo curto PA observado em roedores (Josephson *et al.*, 1984), visto o acentuado prolongamento da fase de repolarização (particularmente do platô) do PA de camundongo que ocorre após *knockout* da proteínas que forma o poro do canal que medeia $I_{to,f}$ (Sah *et al.*, 2003). No entanto, $I_{to,s}$ participa com apenas 20-30% da corrente total em ventrículo esquerdo de rato (Apkon & Nerbonne, 1991; Wickenden *et al.*, 1999). Embora uma relação tenha sido proposta entre a proporção desses componentes da corrente e a resposta qualitativa da APD à freqüência estimulatória, ainda não foi possível confirmá-la (Patel & Campbell, 2005).

Fauconnier *et al*. (2003) demonstraram que a inibição de I_{to} com 4-AP foi capaz de prolongar o PA ventricular de rato, abolindo as diferenças no APD em freqüências mais altas, porém não suprimiu a diferença de APD observada em freqüências abaixo de 1 Hz. Isto indica que é possível que a acumulação da inativação de I_{to} contribua para o prolongamento do APD quando o comprimento de ciclo é pequeno, porém não seria suficiente para explicar totalmente as modificações observadas em toda a faixa de freqüência aqui estudada. Entretanto, deve-se observar que, no presente estudo, as modificações mais acentuadas no APD90 ocorreram a partir de 1Hz.

Fauconnier *et al*. (2003) observaram ainda que as modificações da APD dependentes de freqüência foram suprimidas pelo bloqueio conjunto de I_{to} e I_{CaL}, pela adição de quelantes de Ca^{2+} ao meio intracelular e pela inibição da função do RS. Os autores observaram paralelismo entre o retardo da inativação de I_{CaL} e o prolongamento do AP com o aumento da freqüência. Observaram ainda que o aumento de APD em baixas freqüências causado por inibição da função do RS ou amortecimento das variações de $[Ca^{2+}]i$ associadas com a liberação de Ca^{2+} era similar ao aumento de APD causado pela elevação da freqüência. Com bases nestes resultados, os autores propuseram que I_{CaL} tenha um importante papel na determinação da APD em função da freqüência estimulatória, mais especificamente devido a modificações da cinética de inativação desta corrente, moduladas pela quantidade de Ca^{2+} liberado pelo RS (discutido em mais detalhe a seguir). Os autores ainda propuseram que a rápida repolarização promovida por I_{to} poderia contribuir para limitar o recrutamento de canais de Ca^{2+} em baixas freqüências, e assim reduzir a corrente despolarizante resultante durante o platô do PA, e portanto, a APD.

É fato conhecido que o curso temporal da inativação de I_{CaL} é governado não apenas pelo potencial de membrana , mas também pela interação de Ca^{2+} com um sítio localizado na região interna do canal, a qual acelera o processo de inativação (Hofer *et al*., 1997). Assim, é de se esperar que menor liberação de Ca^{2+} pelo RS resulte em menor influência do processo de inativação dependente de Ca^{2+}, levando assim a um prolongamento da inativação da corrente. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esta proposta. Na condição de AP-clamp, observou-se que o aumento da freqüência tornou o curso temporal de I_{CaL} mais lento e causou redução da FR.

A caracterização do efeito da freqüência estimulatória sobre o curso temporal do PA foi um passo importante, pois, como demonstrado neste trabalho, a variação da freqüência estimulatória apresentou efeito significativo sobre a APD. Com estes dados em mãos, foi possível montar os padrões estimulatórios de APC para cada freqüência de interesse, que simulavam a configuração do PA naquela mesma freqüência. Este foi um detalhe de nossa metodologia que certamente se refletiu em um grau de refinamento considerável dos experimentos. Como ilustrado na Figura 4.6, tanto o curso temporal, quanto a amplitude de pico de I_{CaL} mostraram considerável diferença dependendo da forma de onda do estímulo, i.e., pulso retangular ou APC. Este fato torna-se ainda mais relevante quando lembramos que ambos o pico e a taxa de ativação da corrente guardam relação positiva com a taxa de repolarização durante o PA e são importantes na

regulação da liberação de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1995a; Sah *et al.*, 2002). Além disso, o uso do APC permitiu uma estimativa mais realista do influxo de Ca^{2+}, e, portanto, maior confiabilidade na estimativa de FR.

5.4 Efeito da freqüência estimulatória sobre I_{CaL}

Nossos resultados indicaram que a variação da freqüência estimulatória teve um grande impacto sobre I_{CaL} evocada com APC, isto é, redução do pico da corrente (Figura 4.14) e aumento da τ_{ativ} e τ_{inat} (Figura 4.16) com o aumento da freqüência.

Há controvérsias quanto à influência da freqüência estimulatória sobre I_{CaL}. Muitos são os fatores que podem afetar os resultados, como por exemplo, a espécie, faixa de freqüência utilizada, temperatura de trabalho e a forma do pulso utilizado para registro da I_{CaL}. Enquanto alguns autores demonstraram ausência de efeito da freqüência sobre o pico da I_{CaL} (Parilak *et al.*, 2009), outros reportaram redução do pico da I_{CaL} com o aumento da freqüência (Li *et al.*, 1999; Antoons *et al.*, 2002), como observado no presente trabalho. Vale ressaltar que, no estudo de Antoons *et al.* (2002), a redução do pico de I_{CaL} foi atribuída à recuperação incompleta da inativação dos canais após intervalos diastólicos iguais ou inferiores a 1 s. É possível que este mecanismo contribua para relação negativa entre o pico de I_{CaL} e a freqüência estimulatória, observada no presente estudo. Por outro lado, é provável que a modificação da APD dependente da freqüência possa também ter um papel importante no estabelecimento desta relação. Sah *et al.* (2002), estimulando miócitos ventriculares de rato com formas de onda semelhantes ao AP, observaram que a simples redução da taxa de repolarização (especialmente da fase anterior ao platô), sem alteração da freqüência estimulatória, era suficiente para causar redução do pico de I_{CaL} e prolongamento de sua cinética de ativação e inativação, como observado aqui, com estimulação por APC com formas de onda características de frequências mais altas (*i.e.*, APs com repolarização mais lenta). Assim como descrito por Parilak *et al.* (2009), observou-se no presente trabalho que o aumento da freqüência tornou mais lenta tanto a fase de ativação quanto a fase de inativação de I_{CaL}.

Um ponto de discordância entre os presentes resultados e a literatura é a integral temporal de I_{CaL} ($\int I_{CaL}$), que representa a quantidade total de Ca^{2+} transportada para o interior da célula por esta corrente. Neste trabalho, detectou-se uma redução desta integral com o aumento da freqüência (Figura 4.17). Por outro lado, alguns autores relatam aumento desta variável, atribuído principalmente ao aumento da constante de tempo de inativação de I_{CaL} (Kocic *et al.*, 2001; Antoons el al., 2002; Carmeliet, 2004). É

possível que esta discrepância possa ser explicada pela diferença de formas de onda estimulatória e dos efeitos da freqüência sobre o pico e curso temporal de I_{CaL}, já que em todos os trabalhos citados utilizaram-se pulsos retangulares de tensão com a mesma duração em todas as freqüências**.**

Bouchard *et al.* (1995) registraram I_{CaL} usando a técnica de *action potential clamp* usando formas de onda de PA com duas durações diferentes. Quando os miócitos foram estimulados com PA de maior duração, houve redução do pico da I_{CaL}, e da taxa de inativação, ambos compatíveis com os resultados apresentados neste trabalho. Porém estes mesmos autores relatam aumento da $\int I_{CaL}$. Neste caso, o aumento da taxa de inativação de I_{CaL} parece ter sido mais significativa que a redução do pico para o cálculo da $\int I_{CaL}$, ao contrário do que foi apresentado neste trabalho.

De modo geral, pode-se identificar 2 possíveis mecanismos pelos quais a redução do intervalo diastólico poderia promover diminuição da amplitude de I_{CaL}:

a) uma influência direta, que poderia afetar a disponibilidade de canais do tipo L ativáveis (*e.g.*, recuperação incompleta da inativação). Porém, este mecanismo não explicaria o aumento da constante de tempo de ativação da corrente;

b) uma influência indireta, por meio da alteração da APD, particularmente da fase de repolarização inicial. Embora não tenham sido detectadas variações na APD20, observou-se que a elevação da freqüência aumentou significativamente o tempo de repolarização para 0 mV (Tabela 4.3), valor de Vm no qual o pico de I_{CaL} é máximo (Figura 4.13). Em valores de Vm mais positivos, a ativação é máxima, porém a *driving force* para o influxo de Ca^{2+} é menor. Quanto mais lentamente a membrana se repolariza do valor de pico do PA para cerca de 0 mV, mais canais ativados sofrerão transição para o estado inativado antes que Vm atinja o valor ótimo, o que explicaria não só o prolongamento da fase de ativação, como também contribuiria para a redução do pico da corrente. Estas últimas alterações então levariam a redução da liberação de Ca^{2+} pelo RS, o que, por sua vez, prolongaria o a fase de inativação de I_{CaL}.

É importante que estudos futuros analisem a importância de cada um desses tipos de influência na relação entre a amplitude de I_{CaL} e o intervalo diastólico.

5.5 Efeito da freqüência estimulatória sobre o transiente de Ca^{2+} e FR

O conceito e a metodologia para o cálculo de FR foram propostos em um trabalho pioneiro de Bassani *et al.* (1993). Porém, segundo esta metodologia, que exige intervenção farmacológica, a FR é calculada para uma contração estimulada após uma pausa de cerca de 90 segundos. Isto torna esta abordagem inviável para uso no presente estudo. Desta maneira, optou-se por utilizar uma técnica alternativa, proposta por Shannon *et al.* (2000) e Ginsburg *et al.* (2004), que tem como principal vantagem a possibilidade de estimar FR em *steady-state*, por meio do registro simultâneo de I_{CaL} e $[Ca^{2+}]_i$. Com esta abordagem, foi possível analisar o efeito da alteração da freqüência estimulatória sobre a FR e determinar a relação FR-freqüência.

Os presentes resultados mostram a existência de uma relação negativa entre a amplitude dos transientes de Ca^{2+} e a freqüência estimulatória. Vale lembrar que a relação $\Delta[Ca^{2+}]_i$-freqüência é uma questão controversa na literatura. Primeiramente, esta relação depende de inúmeros fatores, como espécie, faixa de freqüência, temperatura e condições fisiopatológicas, entre outros (e.g., Schouten & Keurs., 1886; Frampton *et al.*, 1991; Layland *et al.*, 1999; Pieske *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000; Antoons *et al.*, 2002). Além disso, existem relatos na literatura de relação $\Delta[Ca^{2+}]_i$-freqüência positiva e negativa em um mesmo tipo de preparação (miócito ventricular de rato, Frampton *et al.*, 1991; Antoons *et al.*, 2002; Bassani *et al.*, 2009). Tanto Frampton *et al.* (1991), quanto Bassani *et al.* (2009) observaram que, nos casos em que esta relação foi positiva, a $[Ca^{2+}]_{RS}$ aumentou com a freqüência, e quando esta relação foi negativa, a $[Ca^{2+}]_{RS}$ permaneceu constante. No presente estudo, também se observou queda de amplitude dos transientes de Ca^{2+} e de FR sem que a $[Ca^{2+}]_{RS}$ fosse reduzida pelo aumento de freqüência. Como $[Ca^{2+}]_{RS}$ é um importante determinante de FR (Bassani *et al.*, 1995a), este resultado indica que outro fator, que não a $[Ca^{2+}]_{RS}$, foi responsável pela menor liberação de Ca^{2+} do RS a freqüências mais elevadas.

O mecanismo mais provável para redução de FR com o aumento de freqüência parece ser o "gatilho" do processo de liberação: I_{CaL}. Como exposto anteriormente, observamos que a amplitude de pico desta corrente foi reduzida com o aumento da frequência, o que *per se* já seria esperado resultar em diminuição da FR (Bassani *et al.*, 1995a). Além disso, observamos que a constante de tempo de ativação de I_{CaL} foi significativamente aumentada pelo aumento de freqüência. A cinética da fase de ativação

de I_{CaL} foi mostrada ser de grande importância para a sincronização dos eventos unitários de liberação de Ca^{2+} do RS: Sah *et al.* (2002) observaram uma importante correlação positiva entre o tempo de pico de I_{CaL} e a latência dos eventos de liberação, o que implica em redução do sincronismo de liberação (e da eficiência do processo de acoplamento excitação-contração) associado a prolongamento da fase de ativação da corrente. Como discutido anteriormente neste capítulo, não só redução do pico, mas também prolongamento da fase de ativação de I_{CaL} pode ser gerado por diminuição da taxa de repolarização da membrana (particularmente até 0 mV), determinada pela forma de onda estimulatória (Sah *et al*., 2002; 2003). No presente trabalho, esta taxa foi menor para frequências mais altas, em concordância com o prolongamento observado do AP. Assim, a utilização de APC no presente estudo permitiu revelar alterações de I_{CaL} compatíveis com a redução de FR detectada, que seriam esperadas em condições fisiológicas, sob as quais parece haver modulação da forma de onda do PA.

Um outro possível mecanismo candidato à depressão do acoplamento excitação-contração seguindo curtos intervalos diastólicos seria a recuperação incompleta da disponibilidade dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS (Sham *et al*., 1998). É sabido que há um aparente aumento da capacidade de liberação de Ca^{2+} à medida que o intervalo diastólico é aumentado, mesmo quando não ocorre aumento da amplitude de I_{CaL} e de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Bers *et al*., 1993). Esta refratariedade da liberação de Ca^{2+} do RS, com recuperação dependente do tempo, tem sido proposta contribuir para a redução de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ com a freqüência, além das alterações de I_{CaL} (Antoons *et al*., 2002; Dibb *et al*., 2007), e poderia em tese ser um dos mecanismos responsáveis pela redução de FR observada no presente trabalho. Porém, estudos adicionais são necessários para esclarecer esta questão.

5.6 Considerações Fisiopatológicas

A relação negativa entre a FR e a freqüência apresentada neste trabalho é um resultado inédito na literatura. Embora outros autores tenham proposto anteriormente a existência dessa relação negativa (*e.g.*, Maier *et al*., 2000; Antoons *et al*., 2002), esta é a primeira vez que esta proposta foi confirmada experimentalmente. Esta relação é compatível com a relação $\Delta[Ca^{2+}]_i$-freqüência e/ou força-freqüência negativas, frequentemente observadas no miocárdio de roedores (e.g., Koch-Weser & Blinks, 1963; Schouten & Keurs., 1986).

No miocárdio humano, embora haja redução do pico de I_{CaL}, ocorre redução da APD com o aumento de freqüência (Li *et al*., 1999), e as relações força-freqüência e $[Ca^{2+}]_{RS}$-freqüência têm sido descritas como positivas (Pieske *et al*., 1999). Contudo, na condição de insuficiência cardíaca, embora não haja reversão da relação APD-freqüência (Sipido *et al*., 1998), a elevação de $[Ca^{2+}]_{RS}$ com o aumento de freqüência é abolida, e a relação força-freqüência passa a ser negativa (Sipido *et al*., 1998; Pieske *et al*., 1999; Chaudhary *et al*., 2004), como mostrado na Figura 5.2. Isto aponta para a depressão de FR com a freqüência nesta situação, como proposto por Sipido *et al.* (1998), devido à supressão de I_{CaL}, durante aumento da freqüência. Na ausência de insuficiência cardíaca, o aumento de $[Ca^{2+}]_{RS}$ poderia compensar a queda do influxo com o incremento da freqüência, de modo a permitir manutenção da FR. No entanto, na insuficiência cardíaca, a falha em responder ao aumento de freqüência com maior acumulação de Ca^{2+} no RS resultaria em redução da FR. Este quadro é bem semelhante ao observado no presente estudo, em ventrículo de rato.

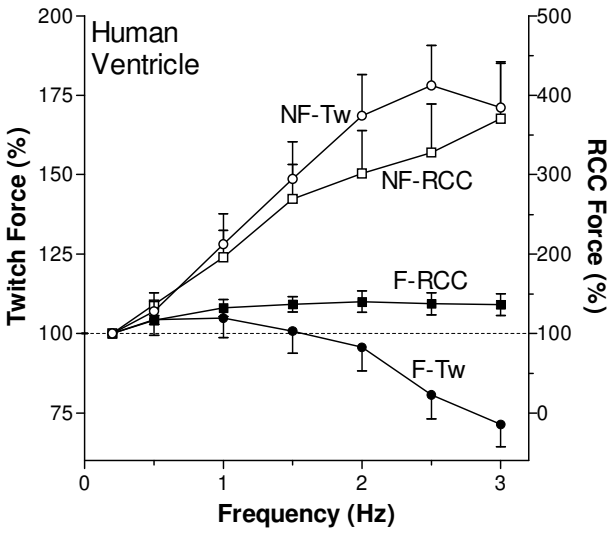

Figura 5.2 - Relação força-freqüência em músculo cardíaco humano. Efeito da freqüência no *twitch* (*twitch* force %) e RCC (RCC *Force* %) do músculo normal (símbolos não-preenchidos, NF-Tw e NF-RCC) e músculo do coração insuficiente (símbolos preenchidos, F-Tw e F-RCC). RCC- *rapid cooling contracture* (mod. de Pieske *et al*., 1999).

Apesar das marcantes diferenças dependentes de espécie na ausência de insuficiência cardíaca, o modelo do roedor pode ser útil para investigar mecanismos celulares básicos que causam impacto no acoplamento excitação contração. Uma melhor

compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeito da freqüência estimulatória pode contribuir para o entendimento de alterações fisiopatológicas que ocorrem no miocádio humano doente.

5.7 Conclusões

O objetivo principal neste trabalho foi determinar a relação entre a liberação fracional de Ca^{2+} do RS e a freqüência estimulatória. Nossos resultados indicam que esta relação é negativa, ou seja, FR é reduzida com o aumento da freqüência, o que provavelmente é o fenômeno subjacente à relação força-freqüência negativa amplamente relatada no miocárdio de roedores. Este é um dado inédito na literatura, e acreditamos que possa contribuir para o entendimento dos efeitos da freqüência sobre os processos celulares dependentes de Ca^{2+}, em especial o acoplamento excitação-contração.

Os resultados apresentados sugerem que a relação negativa entre a FR e a freqüência se deve principalmente a modificações de I_{CaL}, que é o principal *trigger* de liberação de Ca^{2+} do RS durante o acoplamento excitação-contração. Tais modificações incluem redução do pico e prolongamento do curso temporal de ativação da corrente, que foram demonstrados previamente como capazes de diminuir a eficiência da liberação de Ca^{2+} do RS. Essas modificações em I_{CaL} podem ser decorrentes do prolongamento da repolarização durante o PA, observado com o aumento de freqüência no presente estudo, e/ou do acúmulo de inativação de canais de Ca^{2+} do tipo L com a diminuição do intervalo diastólico. No entanto, um papel da recuperação dependente do tempo da refratariedade dos canais de Ca^{2+} do RS não pode ser descartada.

6 Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res* 97(12):1314-22, 2005.

Antoons G, Mubagwa K, Nevelsteen I, Sipido KR. Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and [Ca(2+)](i) transients in mouse ventricular myocytes. *J Physiol*. 543(Pt 3):889-98, 2002.

Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 97(5):973-1011, 1991.

Attwell D, Cohen I, Eisner DA. The effects of heart rate on the action potential of guinea pig and human ventricular muscle. *J Physiol* 313: 439-461, 1981

Aubert AE, Ramaekers D. Neurocardiology: the benefits of irregularity. The basics of methodology, physiology and current clinical applications. *Acta Cardiol* 54:107-20, 1999.

Barry, PH & Diamond, JM. Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties of membranes. *J. Membrane Biol* 3:93-122, 1970.

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol. 265*: 533-540, 1993a.

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

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol. 460*: 603-621, 1993b.

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Calibration of indo-1 and resting intracellular $[Ca]_i$ in

intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys J. 68*: 1453-1460, 1995b.

Bassani JWM, Costa ET, Rocha-e-Silva M. A portable microprocessor-based triggering device for cardiac muscle electrical stimulation. *Braz J Med Biol Res* 23(1):87-91, 1990.

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

Bassani RA. Transient outward potassium current and Ca^{2+} homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Braz J Med Biol Res* 39(3):393-403, 2006.

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

Bassani RA & Bassani JWM. Reduced responsiveness to noradrenaline in isolated rat atria exposed to hyperosmotic solutions. *Gen Pharmac. 22*: 151-157, 1991.

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

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

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca transport reduce $[Ca]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol. 453*: 591-608, 1992.

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

Bassani RA & Bers DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of

intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J. 68*: 2015-2022, 1995.

Bassani RA, Ricardo RA, Bassani JWM. The mechanism of negative staircase in rodent myocardium. *Biol Res* 42 (suppl A): R-56, 2009.

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

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

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

Bers DM, Bassani RA, Bassani JW, Baudet S, Hryshko LV. Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J Mol Cell Cardiol*. 25(9):1047-57, 1993.

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

Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circ Res* 76: 790-801, 1995

Boyett, MR, Jeewell BR. A study of the factors responsible for rate-dependent shortening of the action potential in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 285: 359-380, 1978

Bowditch HP. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Mathematisch-Physische Klasse* 23: 652-689, 1871. [*On the peculiarities of excitability which the fibers of cardiac muscle show*].

Braveny P, Kruta V. Dissociation de deux facteurs: Restitution et potentiation dan l'action de l'intervalle sur l'amplitude de la contraction du myocarde. *Arch Int Physiol Biochim* 66: 633-652, 1958.

Carmeliet E. Intracellular Ca^{2+} concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium* 35: 557–573, 2004.

Carvalho BM, Bassani RA, Franchini KG, Bassani JWM. Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol* 291(4):H1803-13, 2006.

Chaudhary KW, Rossman EI, Piacentino V 3rd, Kenessey A, Weber C, Gaughan JP, Ojamaa K, Klein I, Bers DM, Houser SR, Margulies KB. Altered myocardial Ca^{2+} cycling after left ventricular assist device support in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*. 44(4):837-45, 2004.

Despa S, Islam MA, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular $[Na^+]$ and Na^+ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J Physiol. 539*: 133-143, 2002.

Dibb KM, Eisner DA, Trafford AW. Regulation of systolic $[Ca^{2+}]_i$ and cellular Ca^{2+} flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca^{2+}, L-type Ca^{2+} current and diastolic $[Ca^{2+}]_i$. *J Physiol*. 585(Pt 2):579-92, 2007.

Fauconnier J, Bedut S, Le Guennec JY, Babuty D, Richard S. Ca^{2+} current-mediated regulation of action potential by pacing rate in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 57: 670-80, 2003.

Ferraz, SA. Estimativa do influxo de cálcio por meio de canais tipo L em miócitos cardíacos isolados de ratos neonatos e adultos.. Tese de doutoramento. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. UNICAMP, 2003.

Frampton JE, Harrison SM, Boyett MR, Orchard CH. Ca^{2+} and Na^+ in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol* 261:C739-50, 1991.

Ginsburg KS & Bers DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol. 556*: 463-

480, 2004.

Ginsburg, KS, Weber CR, Bers DM. Control of Maximum Sarcoplasmic Reticulum Ca Load in Intact Ferret Ventricular Myocytes . Effects of Thapsigargin and Isoproterenol. *J Gen Physiol. 111*: 491-504, 1998.

Gomes, PAP. Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: Medição de [Ca] e limiar de estimulação. Tese de doutoramento. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. UNICAMP, 1997.

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

Gómez AM, Kerfant BG, Vassort G. Microtubule Disruption Modulates Ca^{2+} Signaling in Rat Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 86;30-36, 2000.

Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science 276*: 800-806, 1997.

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

Havlicekova Z, Tonhajzerova I, Jurko A Jr, Jesenak M, Durdik P, Nosal S, Zelenak K, Antosova M, Banovcin P. Cardiac autonomic control in adolescents with primary hypertension. *Eur J Med Res* 14 Suppl 4:101-3, 2009.

Hess P. Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review. *Can J Physiol Pharmacol.* 66(9):1218-23, 1988.

Hilgemann DW. Extracellular calcium transients at single excitations in rabbit atrium measured with tetramethylmurexide. *J Gen Physiol*, 87: 707-735, 1986.

Hirakow R, Gotoh T, Watanabe T. Quantitative studies on the ultrastructural differentiation and growth of mammalian cardiac muscle cells. I. The atria and ventricles of the rat. *Acta anat.* 108:144-152, 1980.

Hofer GF, Hohenthanner K, Baumgartner W, Groschner K, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C. Intracellular Ca^{2+} inactivates L-type Ca^{2+} channels with a Hill coefficient of approximately 1 and an inhibition constant of approximately 4 microM by reducing channel's open probability. *Biophys J*. 73(4):1857-65, 1997.

Hoffman BF, Bindler E, Suckling EE. Post-extrasistolic potentiation of contraction in cardiac muscle. *Am J Physiol* 185: 95-102, 1956.

Horn R & Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92(2):145-59, 1988.

Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ Res*. 54(2):144-56, 1984.

Koch-Weser J, Blinks JR. The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacol Rev* 5: 601-52, 1963.

Kocic I, Hirano Y, Hiraoka M. Rate-dependent changes in action potential duration and membrane currents in hamster ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 443:353-61, 2001.

Layland J, Kentish JC. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$-frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol* 276: H9–H18, 1999

Lewis MJ. Heart rate variability analysis: a tool to assess cardiac autonomic function. *Comput Inform Nurs* 23: 335-41, 2005.

Li, GR, Yang B, Feng J, Bosch RF, Carrier M, Nattel S. Transmembrane Ica contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. *Am J Physiol* 276: H98-H106, 1999

Maier LS, Bers DM, Pieske B. Differences in Ca^{2+}-handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2249–2258, 2000.

Meissner G, Rios E, Tripathy A, Pasek DA. Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *J Biol Chem*. 272(3):1628-38, 1997.

Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-31, 1992.

Neher E, Sakmann B. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258(3):705-29, 1976.

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375(2):219-28, 1978.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? Circ Res 89(11):944-56, 2001.

Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I(to)) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol*. 48:12-25, 2010.

Olivetti G, Anversa P, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ. Res.* 46: 503-512, 1980.

Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33(5):851-72, 2001.

Parilak LD, Taylor DG, Song Y, Burkart T, Shryock JC, Curtis AB, Knot HJ. Contribution of

frequency-augmented inward Ca2+ current to myocardial contractility. *Can J Physiol Pharmacol*. 87(1):69-75, 2009.

Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol*. 569(Pt 1):7-39, 2005.

Penna LB, Bassani RA. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. *Stress* 13(1):73-82, 2010.

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res. 85*: 38-46, 1999.

Puglisi JL, Yuan W, Bassani JW, Bers DM. Ca(2+) influx through Ca(2+) channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. *Circ Res.* 85(6):e7-e16, 1999.

Ricardo RA, Oliveira PX, Bassani RA, Bassani JWM. Compact cell image projector: application to study the relationship between stimulus interval and contraction amplitude in isolated rat cardiomyocytes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 22(2):151-160, 2006.

Ricardo RA, Bassani RA, Bassani JWM. Osmolality- and Na^{+} -dependent effects of hyperosmotic NaCl solution on contractile activity and Ca^{2+} cycling in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 455(4):617-26, 2008.

Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel ß subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 533: 119-125, 2001.

Sah R, Ramirez RJ, Backx PH. Modulation of Ca(2+) release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-

contraction coupling. *Circ Res*. 90(2):165-73, 2002.

Sah R, Ramirez RJ, Oudit GY, Gidrewicz D, Trivieri MG, Zobel C, Backx PH. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I(to)). *J Physiol*. 546(Pt 1):5-18, 2003.

Satoh H, Delbridge IMD, Blatter IA, Bers DM. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys. J*. 70: 1494-1504, 1996.

Schouten VJ & Keurs HE. Role of Ica and Na^{+}/Ca^{2+} exchange in the force-frequency relationship of rat heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 23(9):1039-50, 1991.

Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H. Termination of Ca^{2+} release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(25):15096-101, 1998.

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

Shattock MJ, Bers DM. Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256:C813-22, 1989.

Shi CX, Wang YH, Dong F, Zhang YJ, Xu YF. Transmural L-type calcium current in a pressure-overloaded mouse model with heart failure. *Sheng Li Xue Bao*. 59(1):19-26, 2007.

Shigematsu S, Kiyosue T, Sato T, Arita M. Rate-dependent prolongation of action potential duration in isolated rat ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 92: 23-28, 1997.

Sipido KR, Stankovicova T, Flameng W, Vanhaecke J, Verdonck F. Frequency dependence of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in human ventricular myocytes from end-stage heart failure. *Cardiovasc Res*. 37(2):478-88, 1998.

Stein PK, Kleiger RE. Insights from the study of heart rate variability. *Annu Rev Med* 50: 249-61, 1999.

Trafford AW, Sibbring GC, Díaz ME, Eisner DA. The effects of low concentrations of caffeine on spontaneous Ca release in isolated rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* 28: 269-276, 2000

Varro A, Negretti N, Hester SB, Eisner DA. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 423: 158-60, 1993.

Vornanen M. Contribution of sarcolemmal calcium current to total cellular calcium in postnatally developing rat heart. *Cardiovasc. Res*. 32: 400-410, 1996.

Wang L, Duff HJ. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circ Res.*81(1):120-7, 1997.

Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R, Backx PH. Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K+ current in rat ventricle. *Am J Physiol*. 276(5 Pt 2):H1599-607, 1999.

Wohlfahrt B. Analysis of mechanical alternans in rabbit papillary muscle. Acta Physiol *Scand* 115: 405-414, 1982.

Woodworth RS. Maximal contraction, “staircase” contraction, refractory period, and compensatory pause of the heart. *Am J Physiol* 8: 213-249, 1902.

Yasuma F, Hayano J. Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? *Chest* 125: 683-90, 2004.

Zaniboni M, Cacciani F, Salvarani N. Temporal variability of repolarization in rat ventricular myocytes paced with time-varying frequencies. *Exp Physiol.* 92(5):859-69, 2007.