

Antonio Nei Santana Gondim

**Mecanismos celulares responsáveis pela restituição da  
amplitude do transiente citosólico de cálcio em coração de  
mamífero**

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2014

ANTONIO NEI SANTANA GONDIM

**MECANISMOS CELULARES RESPONSÁVEIS PELA  
RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE  
CITOSÓLICO DE CÁLCIO EM CORAÇÃO DE MAMÍFERO**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia (Área de Concentração: Bioquímica).*

**ORIENTADORES:**

***Brian M. Hagen, Ph.D.***

University of Maryland at Baltimore, Baltimore, MD, EUA

***Jader dos Santos Cruz, Ph.D.***

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

BELO HORIZONTE

2014

ANTONIO NEI SANTANA GONDIM

**MECANISMOS CELULARES RESPONSÁVEIS PELA RESTITUIÇÃO DA  
AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE CÁLCIO EM  
CORAÇÃO DE MAMÍFERO**

Aprovado em 07/02/2014

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Dr. Jader dos Santos Cruz

Orientador - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

---

Dr. Brian M. Hagen

Orientador - University of Maryland at Baltimore, EUA

---

Dr. Dawidson Assis Gomes

Examinador Interno - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

---

Dr. Eduardo Antonio Conde Garcia

Examinador Externo - Universidade Federal de Sergipe, Brasil

---

Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Examinador Externo - Universidade Estadual de Campinas, Brasil

---

Dr. Danilo Roman Campos

Examinador Externo - Universidade de São Paulo, Brasil



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANTONIO NEI SANTANA GONDIM.**  
 Aos sete dias do mês de fevereiro de 2014 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Mecanismos celulares responsáveis pela restituição do transiente citoplasmático de cálcio em coração de mamífero", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jader dos Santos Cruz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Danilo Roman Campos (Universidade de São Paulo/RP), aprovado; Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Universidade Estadual de Campinas), aprovado; Dr. Eduardo Antonio Conde Garcia (Universidade Federal de Sergipe), aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Brian Hagen - Co-Orientador (University of Maryland / Baltimore), aprovado; Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2014.

  
 Dr. Danilo Roman Campos (Universidade de São Paulo/RP)

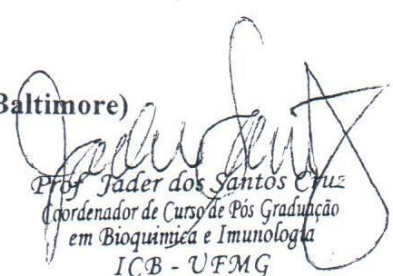
  
 Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Universidade Estadual de Campinas)

  
 Dr. Eduardo Antonio Conde Garcia (Universidade Federal de Sergipe)

  
 Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)

  
 Dr. Brian Hagen - Co-Orientador (University of Maryland / Baltimore)

  
 Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (UFMG)

  
 Prof. Jader dos Santos Cruz  
 Coordenador de Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

*Este trabalho foi realizado no Laboratory of Cardiac Biology, do Center of Biomedical Engineering and Technology, da University of Maryland School of Medicine, financiado pelo National Institute of Health - NIH (EUA), pela American Heart Association - AHA (EUA) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.*

*Para José e Cristina*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Jader Santos Cruz pela orientação ao longo da minha jornada no doutorado e por ser um exemplo de pesquisador, que sempre buscarei seguir;

Ao Dr. Brian M. Hagen, grande pesquisador, orientador e amigo, não somente por me orientar nesse trabalho, mas também por todo suporte dado para mim e minha família quando estávamos nos EUA;

Ao Dr. W.Jonathan Lederer, da escola de medicina da University of Maryland (EUA), renomado pesquisador e magnânimo homem, que me aceitou como seu aluno de doutorado na modalidade sanduiche. Minha estadia, como membro do seu grupo de pesquisa, mudou minha maneira de enxergar a ciência. Por isso lhe sou muito grato;

À minha esposa Luise e a meu filho Gustavo por sempre estarem ao meu lado ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por compreenderem e respeitarem os momentos em que precisei me ausentar;

Ao amigo e técnico do Laboratório de Membranas Excitáveis, José Narciso Fernandes, não somente pelo suporte profissional, mas principalmente pelos momentos de descontração que fizeram certamente o meu tempo de doutoramento passar mais rápido;

A todos os colegas do Laboratório de Membranas Excitáveis da Universidade Federal de Minas Gerais. Obrigado pelos excelentes momentos vividos;

Aos colegas do Center of Biomedical Engineering and Technology, da University of Maryland (EUA). Obrigado pelo suporte e ensinamentos;

À Universidade do Estado da Bahia, à University of Maryland at Baltimore, à Universidade Federal de Minas Gerais, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e técnico que permitiram a conclusão desse trabalho.



**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE ABREVIATURAS****RESUMO****ABSTRACT****SUMÁRIO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.1 ASPECTOS MECÂNICOS E ELÉTRICOS DO CORAÇÃO.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>1.2 ORGANIZAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR CARDÍACO.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>1.3 O CARDIOMÍOCITO E AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES ENVOLVIDAS NO ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO.....</b> | <b>24</b> |
| 1.3.1 O Sacolema e os túbulos transversos.....   | 25        |
| 1.3.2 Os miofilamentos contráteis.....   | 27        |
| 1.3.3 O retículo sarcoplasmático.....  | 30        |
| <b>1.4 O ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MIOCÁRDIO.....</b>   | <b>33</b> |
| 1.4.1 Os canais de $Ca^{2+}$ do tipo L.....  | 35        |
| 1.4.2 Os receptores de rianodina.....  | 39        |
| 1.4.3 Trocador $Na^{+}/Ca^{2+}$ .....  | 42        |
| 1.4.4 Bombas de $Ca^{2+}$ .....  | 44        |
| <b>1.5 EVENTOS DE <math>Ca^{2+}</math>.....</b>  | <b>48</b> |
| 1.5.1 Os <i>sparks</i> de $Ca^{2+}$ .....  | 49        |
| 1.5.2 Transientes e ondas de $Ca^{2+}$ .....   | 53        |
| 1.5.3 Eventos de $Ca^{2+}$ e arritmias cardíacas.....  | 54        |
| 1.5.4 Restituição da amplitude do transiente citosólico de $Ca^{2+}$ .....   | 55        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>4 MÉTODOS.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>4.1 ANIMAIS.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ESTOQUE.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>4.3 ISOLAMENTO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>4.4 MARCAÇÃO DOS CARDIOMÍOCIOS COM OS INDICADORES DE <math>Ca^{2+}</math>.....</b>                              | <b>63</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.5 MEDIDAS DOS TRANSIENTES DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> E FRAÇÃO DE ENCURTAMENTO CELULAR.....</b>  | <b>64</b>  |
| <b>4.6 ELETROFISIOLOGIA.....</b>   | <b>65</b>  |
| <b>4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>   | <b>66</b>  |
| 4.7.1 Ativação dos transientes de $\text{Ca}^{2+}$ .....   | 66         |
| 4.7.2 Restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ .....  | 66         |
| 4.7.3 Restituição da amplitude da corrente de $\text{Ca}^{2+}$ do tipo L.....  | 66         |
| 4.7.4 Restituição da amplitude e duração do potencial de ação.....   | 67         |
| 4.7.5 Medida da carga total de $\text{Ca}^{2+}$ no retículo sarcoplasmático.....   | 68         |
| 4.7.6 Efeito de inibidores da SERCA na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ .....  | 68         |
| 4.7.7 Efeito de moduladores dos RyRs na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ .....   | 69         |
| 4.7.8 Papel da conteúdo total de $\text{Ca}^{2+}$ do retículo sarcoplasmático na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ .....  | 69         |
| <b>4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>   | <b>71</b>  |
| <b>5.1 A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES.....</b>   | <b>71</b>  |
| <b>5.2 A RESTITUIÇÃO ELÉTRICA NÃO EXPLICA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> .....</b>   | <b>74</b>  |
| <b>5.3 A RECUPERAÇÃO DA INATIVAÇÃO DA <math>I_{\text{Ca,L}}</math> PRECEDE A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math>.....</b>   | <b>76</b>  |
| <b>5.4 A RECAPTAÇÃO DO <math>\text{Ca}^{2+}</math> PELA SERCA NÃO É O FATOR LIMITANTE PARA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> À TEMPERATURA FISIOLÓGICA.....</b> | <b>81</b>  |
| <b>5.5 A CARGA TOTAL DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO VERSUS A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> .....</b>                              | <b>86</b>  |
| <b>5.6 O ESTADO DE ATIVAÇÃO DO RYR CONTROLA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> .....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>103</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>113</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>114</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura do coração e sentido do fluxo sanguíneo através das câmaras e válvulas cardíacas.....  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Principais vias de geração e condução de estímulos elétricos em coração de mamífero.....   | 20 |
| <b>Figura 3.</b> Curvas e curso temporal do potencial de ação em diferentes regiões do coração.....   | 21 |
| <b>Figura 4.</b> Micrografia eletrônica dos discos intercalares mostrando as regiões correspondentes à <i>fascia adherens</i> (FA), <i>macula adherens</i> (MA) e <i>nexus</i> (N)..... | 23 |
| <b>Figura 5.</b> Esquemática simplificada mostrando a formação de um canal conectando o citoplasma de duas células adjacentes na junção comunicante.....                                | 24 |
| <b>Figura 6.</b> Ilustração dos túbulos t.....  | 26 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura do sarcômero no músculo estriado.....  | 28 |
| <b>Figura 8.</b> Estrutura do retículo sarcoplasmático nos cardiomiócitos ventriculares.....  | 31 |
| <b>Figura 9.</b> Microanatomia do retículo sarcoplasmático em células cardíacas.....  | 32 |
| <b>Figura 10.</b> Resumo do manejo intracelular de $Ca^{2+}$ nos cardiomiócitos.....  | 34 |
| <b>Figura 11.</b> Representação dos canais de $Ca^{2+}$ sensíveis à voltagem.....   | 36 |
| <b>Figura 12.</b> $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo.....   | 38 |
| <b>Figura 13.</b> Estrutural geral dos RyRs.....  | 41 |
| <b>Figura 14.</b> Representação da estrutura da SERCA.....  | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Representação esquemática simplificada da localização das diversas isoformas da SERCA no RS cardíaco.....   | 46 |
| <b>Figura 16.</b> Regulação da SERCA pelo PLB.....  | 48 |
| <b>Figura 17.</b> <i>Sparks</i> de $Ca^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares.....   | 50 |
| <b>Figura 18.</b> Restituição mecânica em músculo ventricular.....  | 56 |
| <b>Figura 19.</b> Amplitude do transiente de $Ca^{2+}$ regula a restituição mecânica e potenciação pós-extrassistólica em músculo ventricular.....                                      | 57 |
| <b>Figura 20.</b> Restituição de <i>sparks</i> de $Ca^{2+}$ em cardiomiócito ventricular de rato.....   | 58 |
| <b>Figura 21.</b> Transientes de $Ca^{2+}$ obtidos de cardiomiócitos ventriculares marcados com Fluo5-F.....  | 72 |
| <b>Figura 22.</b> Restituições mecânica e da amplitude do transiente de $Ca^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo.....  | 73 |
| <b>Figura 23.</b> Relação entre a fração de encurtamento celular e o pico do transiente de $Ca^{2+}$ .....  | 74 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 24.</b> A restituição elétrica e a restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo.....                                      | 75  |
| <b>Figura 25.</b> Traçados representativos do protocolo de pulso, da $I_{\text{Ca,L}}$ e do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ gravados simultaneamente.....                             | 77  |
| <b>Figura 26.</b> A recuperação da inativação da $I_{\text{Ca,L}}$ e a restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo..... | 78  |
| <b>Figura 27.</b> Mudanças na cinética da recuperação da inativação da $I_{\text{Ca,L}}$ não alteram a restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ .....              | 80  |
| <b>Figura 28.</b> Efeito de 60 nM de tapsigargina nos parâmetros do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ .....   | 82  |
| <b>Figura 29.</b> Efeito de 60 nM de tapsigargina sobre a carga total de $\text{Ca}^{2+}$ do RS.....  | 83  |
| <b>Figura 30.</b> Efeito da tapsigargina sobre o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares.....                   | 84  |
| <b>Figura 31.</b> Efeito de 2 $\mu\text{M}$ de CPA nos parâmetros do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ .....  | 85  |
| <b>Figura 32.</b> Efeito de 2 $\mu\text{M}$ de CPA sobre a restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares.....                                      | 86  |
| <b>Figure 33.</b> O conteúdo total de $\text{Ca}^{2+}$ no RS é o mesmo a 110, 200 e 500 ms após uma CICR.....   | 88  |
| <b>Figure 34.</b> Depleção local da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ em cardiomiócitos ventriculares.....   | 90  |
| <b>Figura 35.</b> Medidas de depleções da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ em cardiomiócitos ventriculares mantidos à temperatura fisiológica.....  | 92  |
| <b>Figura 36.</b> Efeito de 500 $\mu\text{M}$ de cafeína nos parâmetros do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ .....   | 94  |
| <b>Figura 37.</b> Efeito de 500 $\mu\text{M}$ de cafeína sobre a carga total de $\text{Ca}^{2+}$ do RS.....   | 95  |
| <b>Figura 38.</b> Efeito de 500 $\mu\text{M}$ de cafeína sobre a restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo.....       | 96  |
| <b>Figura 39.</b> Efeito de 100 $\mu\text{M}$ de cafeína no pico do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ .....   | 97  |
| <b>Figura 40.</b> 100 $\mu\text{M}$ de cafeína não altera a carga total de $\text{Ca}^{2+}$ do RS.....  | 98  |
| <b>Figura 41.</b> Efeito de 100 $\mu\text{M}$ de cafeína sobre a restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$ em cardiomiócitos ventriculares de camundongo.....                  | 99  |
| <b>Figura 42.</b> Tetracaína desvia a curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$ para a direita.....  | 100 |
| <b>Figura 43.</b> Efeito de 100 $\mu\text{M}$ de tetracaína sobre a carga total de $\text{Ca}^{2+}$ do RS.....  | 101 |

**Figura 44.** 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína desloca a curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  sem alterar a recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$ ..... 102

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>              | concentração de cálcio livre                                      |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>  | concentração de cálcio livre no citosol                           |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>RS</sub></b> | concentração de cálcio livre no lúmen do retículo sarcoplasmático |
| <b>AEC</b>                            | acoplamento excitação contração                                   |
| <b>AID</b>                            | domínio de interação da subunidade $\alpha$                       |
| <b>ATP</b>                            | trifosfato de adenosina   |
| <b>AV</b>                             | atrioventricular  |
| <b>CaM</b>                            | calmodulina   |
| <b>CaMKII</b>                         | cinase dependente de calmodulina do tipo II                       |
| <b>CASQ</b>                           | Calsequestrina  |
| <b>CASQ<sup>-/-</sup></b>             | Animais <i>knockout</i> para calsequestrina                       |
| <b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>              | canal de Ca <sup>2+</sup> do tipo L                               |
| <b>CBD</b>                            | domínio de ligação ao Ca <sup>2+</sup>                            |
| <b>CDF</b>                            | facilitação dependente de Ca <sup>2+</sup>                        |
| <b>CDI</b>                            | inativação dependente de Ca <sup>2+</sup>                         |
| <b>CBI</b>                            | solução tampão para isolamento celular                            |
| <b>CE<sub>50</sub></b>                | concentração que produz 50 % do efeito máximo                     |
| <b>CICR</b>                           | liberação de cálcio induzida pelo cálcio                          |
| <b>CPA</b>                            | ácido ciclopiazônico  |
| <b>CPVT</b>                           | taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica             |
| <b>cTnC</b>                           | troponina C cardíaca  |
| <b>cTnI</b>                           | troponina I cardíaca  |
| <b>cTnT</b>                           | troponina T cardíaca  |
| <b>CRU</b>                            | unidade liberadora de Ca <sup>2+</sup>                            |
| <b>DAD</b>                            | pós-despolarização tardia   |
| <b>EAD</b>                            | pós-despolarização precoce  |
| <b>ECG</b>                            | eletrocardiograma   |
| <b>E<sub>NCX</sub></b>                | potencial de equilíbrio para o NCX                                |
| <b>FA</b>                             | <i>fascia aderens</i>   |
| <b>FRS</b>                            | Retículo sarcoplasmático livre                                    |
| <b>GMPc</b>                           | monofosfato de guanosina cíclico                                  |
| <b>I<sub>Ca</sub></b>                 | corrente de cálcio  |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>I<sub>Ca,L</sub></b>             | corrente de cálcio do tipo L  |
| <b>I<sub>Na</sub></b>               | corrente de sódio   |
| <b>I<sub>Tl</sub></b>               | corrente transitória de entrada   |
| <b>IP<sub>3</sub>R</b>              | receptores de trifosfato de inositol  |
| <b>jRS</b>                          | retículo sarcoplasmático juncional  |
| <b>K<sub>d</sub></b>                | constante de dissociação  |
| <b>K<sub>on</sub></b>               | constantes de velocidade de associação  |
| <b>K<sub>off</sub></b>              | constantes de velocidade de dissociação   |
| <b>MA</b>                           | <i>macula adherens</i>  |
| <b>N</b>                            | <i>nexus</i>  |
| <b>[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub></b> | concentração intracelular de sódio livre  |
| <b>NCX</b>                          | trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>+2</sup> sarcolemal                                   |
| <b>njRS</b>                         | retículo sarcoplasmático não juncional  |
| <b>NO</b>                           | óxido nítrico   |
| <b>PA</b>                           | potencial de ação   |
| <b>Pi</b>                           | fosfato inorgânico  |
| <b>PKA</b>                          | quinase de proteína sensível ao AMPc  |
| <b>PLB</b>                          | fosfolambano  |
| <b>PLB<sup>-/-</sup></b>            | Animais <i>knockout</i> para fosfolambano   |
| <b>PMCA</b>                         | Ca <sup>+2</sup> -ATPase sarcolemal   |
| <b>Po</b>                           | Probabilidade de abertura   |
| <b>PPES</b>                         | potenciação pós-extrassistólica   |
| <b>P<sub>trig</sub></b>             | Probabilidade de ocorrência de um segundo <i>spark</i> de Ca <sup>2+</sup> na mesma CRU |
| <b>Q10</b>                          | coeficiente de temperatura  |
| <b>r<sup>2</sup></b>                | coeficiente de determinação   |
| <b>RE</b>                           | retículo endoplasmático   |
| <b>RNA<sub>m</sub></b>              | ácido ribonucléico mensageiro   |
| <b>RS</b>                           | retículo sarcoplasmático  |
| <b>RT<sub>50</sub></b>              | tempo para que 50% da repolarização do potencial de ação seja alcançada                 |
| <b>RT<sub>30</sub></b>              | tempo para que 30% da repolarização do potencial de ação seja alcançada                 |
| <b>RyR</b>                          | receptor da rianodina   |
| <b>RyR1</b>                         | receptor da rianodina do tipo 1   |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>RyR2</b>            | receptor da rianodina do tipo 2                          |
| <b>RyR3</b>            | receptor da rianodina do tipo 3                          |
| <b>SDR</b>             | desativação estocástica dos receptores de rianodina      |
| <b>SERCA</b>           | Ca <sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático      |
| <b>STs</b>             | segmento ST  |
| $\tau$                 | constante de tempo                                       |
| <b>TEA</b>             | tetraetilamônio  |
| <b>TG</b>              | tapsigargina   |
| <b>Tm</b>              | tropomiosina   |
| <b>Tn</b>              | troponina  |
| <b>t<sub>90</sub></b>  | tempo necessário para o decaimento de 90 % do transiente |
| <b>t<sub>1/2</sub></b> | tempo necessário para o decaimento de 50 % do transiente |
| <b>Túbulos T</b>       | túbulos transversos                                      |
| <b>UV</b>              | ultravioleta   |
| <b>VDI</b>             | inativação dependente de voltagem                        |



GONDIM, A.N.S. **Mecanismos celulares responsáveis pela restituição da amplitude do transiente citosólico de cálcio em coração de mamífero.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, ano: 2014.

## RESUMO

Em corações estimulados a uma frequência constante, quando uma contração é induzida entre os batimentos regulares (contração extrassistólica), a amplitude da mesma é geralmente menor do que aquela observada no batimento prévio. A amplitude da contração extrassistólica será maior quanto mais longo for o intervalo entre ela e a contração prévia. Esse fenômeno é denominado de restituição mecânica. De fato, diversos trabalhos têm associado a restituição mecânica com o aumento gradativo da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, deste modo, a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante evento no controle da fisiologia cardíaca. O objetivo geral do presente trabalho foi investigar os mecanismos celulares envolvidos na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo, mantidos à temperatura fisiológica. Usando a técnica de *patch-clamp* associada à microscopia confocal, foi constatado que a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  não se deve à restituição elétrica do miocárdio, uma vez que tanto a restituição da amplitude do potencial de ação cardíaco, quando a recuperação da inativação da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, apresentaram um curso temporal mais rápido do que aquele observado para a restituição da amplitude da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. De modo interessante, medidas das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) e no lúmen do RS ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ ) mostraram que, mesmo após a completa recuperação dos estoques luminais de  $\text{Ca}^{2+}$ , a amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda não se encontra plenamente restituída. Os resultados aqui obtidos sugerem que o estado refratário dos receptores de rianodina (RyR2) pode ser um importante mecanismo no controle desse processo celular, uma vez que a manipulação das propriedades de *gating* desses canais altera significativamente o curso temporal para a restituição da amplitude do transiente citosólico global de  $\text{Ca}^{2+}$  em coração de mamífero. Em sumário, esse trabalho mostra que a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  não é pura e simplesmente uma função da taxa de recuperação da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , sugerindo a existência de um mecanismo no qual o estado de ativação dos RyR2 desempenha papel fundamental.

GONDIM, A.N.S. **Cellular mechanisms responsible for the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude restitution in mammalian heart.** Ph.D. thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Graduate program in Biochemistry and Immunology, year: 2014.

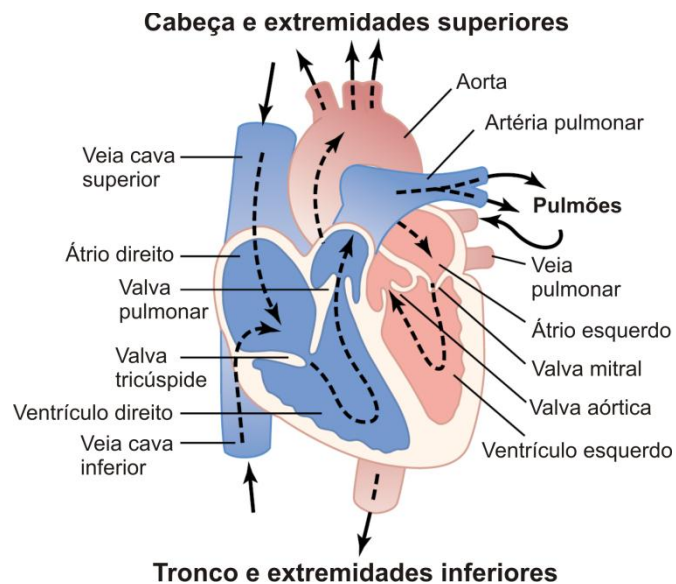
## ABSTRACT

When an extra-beat (extra-systolic contraction) is triggered in hearts cycling at a constant rate the resultant contraction is usually reduced in comparison. The amplitude of the extra-systolic contraction increases with the stimulus interval (time between normal and extra-systolic contraction), a phenomenon known as mechanical restitution. Mechanical restitution is thought to be the consequence of reduced sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  release and reduction of the subsequent cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) transient during this restitution period. Thus, restitution (or refractoriness) of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient is an important inherent mechanism in cardiac physiology. The aim of this study was to investigate the cellular mechanisms involved in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient restitution in mouse ventricular cardiomyocytes at physiological temperature. Simultaneous patch-clamp and confocal microscopy measurements showed that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient refractoriness was not due cardiac electrical restitution, since both action potential amplitude and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current recover much faster than the SR  $\text{Ca}^{2+}$  release restitution. Interestingly, measurements of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients and intra-SR  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ ) depletions revealed that  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  recovers to steady-state diastolic levels at a time where  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient restitution is still observed. Additionally, pharmacological manipulation of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  SR release channel (ryanodine receptors, RyR2) could significantly shift restitution curves, while minor inhibition of SR/ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase could not. Taken together, these results suggest that the ability to subsequently activate an  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient does not simply track with  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  refilling and also suggest the existence of time-dependent mechanism that induces a RyR2 refractory state.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS MECÂNICOS E ELÉTRICOS DO CORAÇÃO

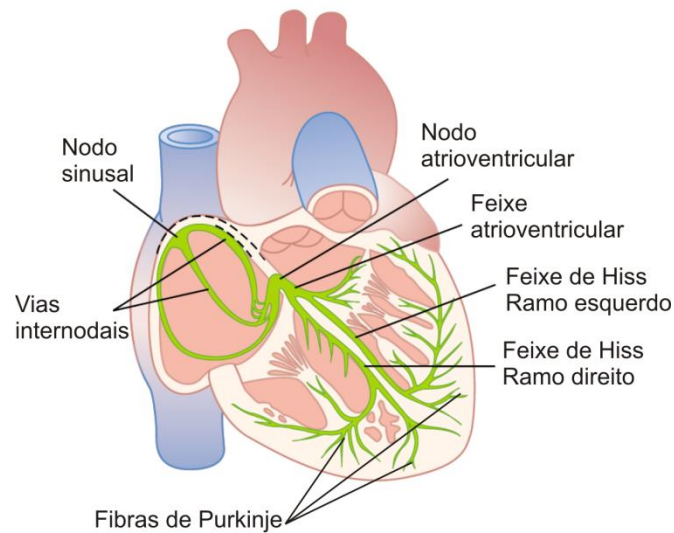
O coração funciona como uma bomba cuja função é aspirar e ejetar sangue a fim de suprir as demandas metabólicas do corpo. A figura 1 mostra que esse órgão é formado por duas bombas em série: uma delas impulsiona o sangue para a circulação pulmonar, onde as trocas de oxigênio e dióxido de carbono ocorrem (representada didaticamente pela cor azul), e a outra, por sua vez, propulsiona o sangue para as demais regiões do organismo (ressaltada pela coloração vermelha). Cada uma dessas bombas é composta por duas cavidades, sendo que a função mecânica principal é assumida pelos ventrículos. Os átrios, por sua vez, atuam como câmaras de compensação que estabilizam a pressão venosa pulmonar durante as variações do retorno venoso e da demanda ventricular. Para que essa função seja adequadamente exercida, diversos mecanismos de controle, sejam eles de natureza mecânica, elétrica, ou mesmo neuroendócrina, convergem para que esse órgão atue pronta e harmonicamente (BERNE et al., 2000).



**Figura 1.** Estrutura do coração e sentido do fluxo sanguíneo através das câmaras e válvulas cardíacas. Modificado de Guyton e Hall (2006).

De um modo geral, a atividade contrátil cardíaca é precedida e controlada por impulsos elétricos gerados em regiões especializadas do miocárdio, sendo então propagados para as demais regiões que compõem o coração. As células marca-passo são responsáveis por

promover o automatismo do órgão, a partir da geração espontânea e repetitiva de potenciais de ação, os quais se propagam por todo órgão a fim de comandar a atividade cardíaca. Tais células localizam-se principalmente nos nódulos (sinusal e atrioventricular) e também nas bordas do anel valvular, podendo, todavia, ser encontradas em qualquer região do tecido cardíaco. O miocárdio, por ser um tecido muscular que, além de apresentar capacidade inotrópica, especializou-se também em conduzir sinais elétricos de modo rápido e sustentado, propaga o estímulo gerado pelas células marca-passo para as demais regiões do órgão, evento que precede e dispara a atividade mecânica. O principal marca-passo do coração é o nódulo sinusal, o qual se situa na parede póstero-látero-superior do átrio direito, próximo à desembocadura da veia cava superior. Em virtude da conexão direta das fibras sinusais com as atriais, os potenciais de ação gerados naquela estrutura são prontamente propagados para a parede atrial, difundindo-se rapidamente para ambos os átrios. O coração funciona como um sincício (CONDE-GARCIA, 1998), pois nele o impulso elétrico encontra uma resistência relativamente pequena para ser conduzido de célula à célula. Nesse tecido, a velocidade de propagação dos impulsos elétricos varia entre 60 e 80 cm/s. O anel valvular, região onde se encontram ancoradas as válvulas do coração, é constituído por tecido elétrico não excitável, ou seja, que não é capaz de gerar nem propagar estímulos elétricos. Deste modo, a única via normal para que o impulso elétrico despolarizante alcance os ventrículos está localizada no nódulo atrioventricular. No interior dessa estrutura, a onda elétrica propaga-se a uma velocidade relativamente baixa (1 a 10 cm/s). Daí por diante, ela segue através do feixe de His e dos seus ramos (com velocidade de condução entre 100 a 300 cm/s), alcançando então as fibras de Purkinje. De acordo com Boyden et al. (2010), essas últimas, apesar de musculares, são compostas por células que se tornaram especializadas em conduzir potenciais de ação com grande velocidade e presteza, iniciando, com isso, a atividade mecânica ventricular. A figura 2 resume as principais vias de geração e condução de estímulos elétricos no coração.

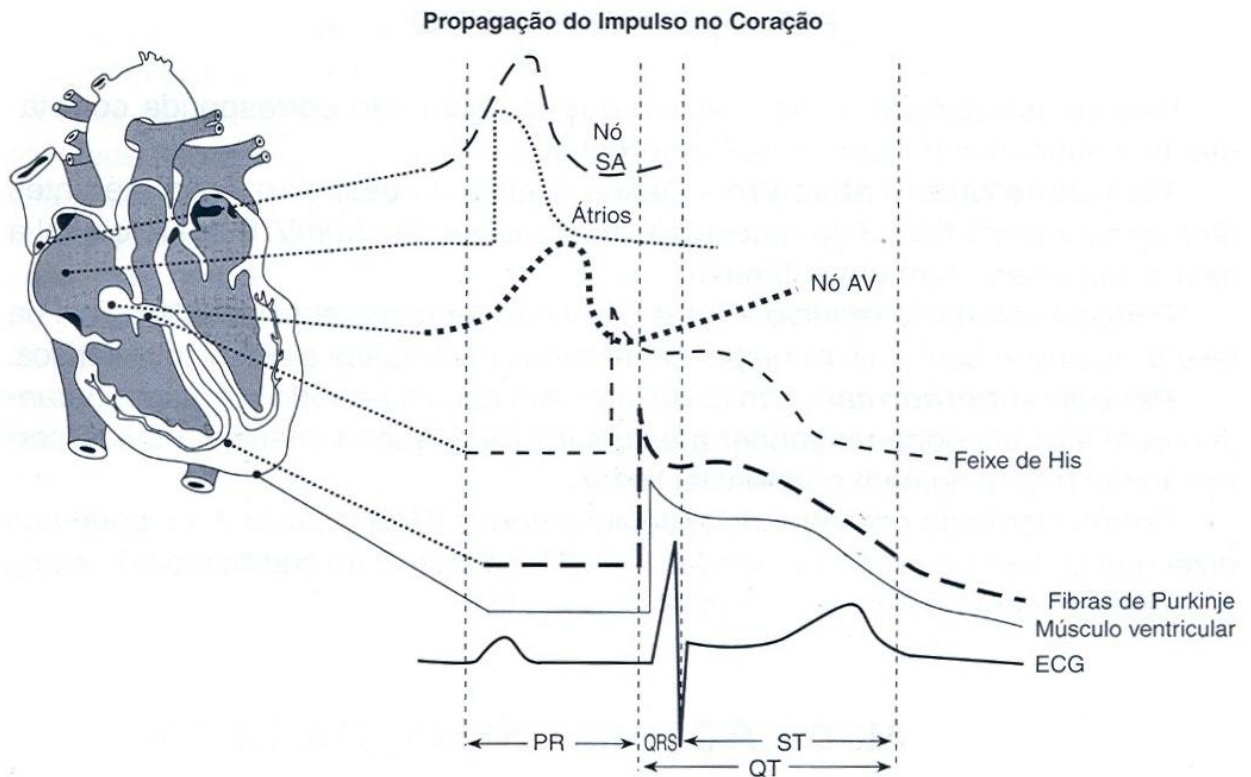


**Figura 2.** Principais vias de geração e condução de estímulos elétricos em coração de mamífero. Modificado de Guyton e Hall (2006).

À medida que o impulso cardíaco propaga-se através do coração, são criadas condições para que os potenciais elétricos, dos pontos situados nos tecidos em volta do coração, sejam alterados. Com isso, estabelecem-se correntes elétricas que alteram os potenciais elétricos na superfície do corpo. Assim, eletrodos colocados sobre a epiderme podem captar as diferenças de potencial geradas em virtude da atividade elétrica cardíaca. O registro gráfico dessas alterações é chamado de eletrocardiograma (ECG). Segundo Selkurt (1985), um traçado eletrocardiográfico clássico contém as ondas P, T e o complexo QRS. A onda P é constituída pela soma das despolarizações atriais. O complexo QRS é formado por três ondas distintas: Q, R e S. A formação desse complexo deve-se aos potenciais gerados quando os ventrículos despolarizam-se, enquanto que a onda T representa a repolarização ventricular. O registro das diversas ondas do ECG só é possível porque o estímulo elétrico propaga-se para as diferentes regiões do coração em cursos temporais distintos, sendo assim, tais eventos não se sobrepõem no traçado. Os potenciais de ação são primeiramente gerados e propagados nos tecidos atriais e então sofrem um considerável atraso ao serem conduzidos pelos nodo e feixe atrioventriculares, único caminho para que o estímulo elétrico alcance os ventrículos (SANCHES e MOFFA, 2001).

Na figura 3 pode-se observar a representação da propagação do potencial de ação ao longo dos diversos tecidos cardíacos e a contribuição dos mesmos para a formação do traçado eletrocardiográfico típico (traçado inferior da figura 3). Dele pode ser obtido informações importantes a respeito da atividade cardíaca, tal como o intervalo PR (PRi), que representa a

medida do tempo entre o princípio da ativação atrial (onda P) e o início da ativação ventricular (onda Q). Em humanos, esse intervalo geralmente varia de 0,12 a 0,20 segundos e, grande parte desse tempo, envolve a passagem do impulso através do sistema de condução atrioventricular (AV). Prolongamentos patológicos do segmento PR estão associados aos distúrbios da condução AV (SANCHES e MOFFA, 2001; SELKURT, 1985). O segmento ST (STs) é a parte do traçado eletrocardiográfico compreendida entre o final da despolarização ventricular (ponto j, onde termina o complexo QRS) e o começo da sua repolarização (onda T). O tempo compreendido do início do complexo QRS até o final da onda T é chamado de intervalo QT. Ele representa o tempo total da sístole elétrica ventricular e está intimamente correlacionado à duração média do potencial de ação dos miócitos ventriculares (CONDE-GARCIA, 1998).

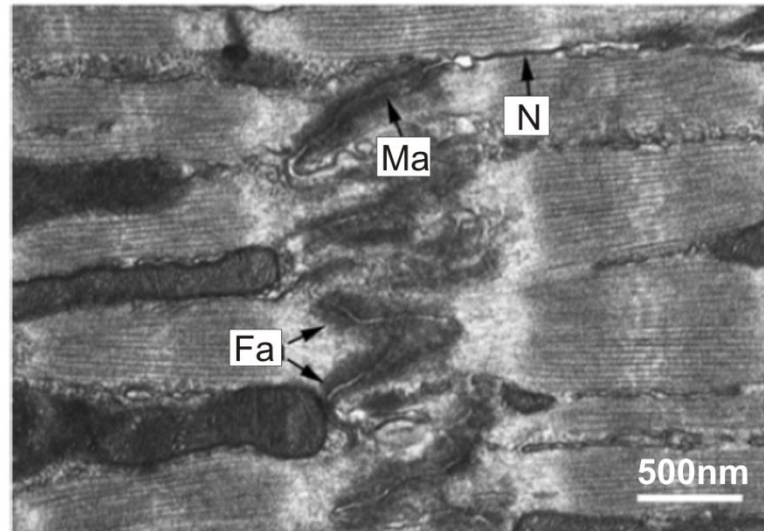


**Figura 3.** Curvas e curso temporal do potencial de ação em diferentes regiões do coração. A curva inferior mostra que a atividade elétrica gerada e propagada pelos diferentes tecidos miocárdicos contribui para o formato do traçado eletrocardiográfico (ECG). Modificado de Sanches e Moffa (2001).

## 1.2 ORGANIZAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR CARDÍACO

O coração é um órgão elétrico e também mecânico. Seu músculo apresenta uma estrutura bem diferenciada quando comparado com outros tecidos excitáveis. Como registrado por Conde-Garcia (1998), Van Breemen (1953), usando a técnica de microscopia eletrônica, mostrou que o músculo cardíaco é constituído por células individualizadas, mas que estão intimamente acopladas entre si, o que permite que o órgão funcione como um sincício. Trabalhos posteriores trouxeram conhecimentos adicionais quando identificaram que as células do coração estavam conectadas por membranas juncionais que eram dotadas de regiões especializadas, tanto para a fixação mecânica, como para a transmissão de corrente elétrica (ROTHSCHUH, 1950, 1951; SJÖSTRAND et al., 1958). Tais regiões posteriormente ficaram conhecidas como discos intercalares.

Os discos intercalares são regiões altamente organizadas que, além de contribuírem para a transmissão da corrente elétrica ao longo do miocárdio, também desempenham uma importante função na manutenção da integridade estrutural do tecido cardíaco. À luz da microscopia eletrônica, os discos intercalares apresentam algumas estruturas, tais como mostradas na figura 4: *fascia adherens*, desmossomos (*macula densa* ou *macula adherens*), *nexus* e regiões não-diferenciadas. Nessa figura pode-se observar que as regiões da *fascia* e da *macula adherens* são eletrodensas e apresentam, com nitidez, um espaço extracelular entre as membranas apostas. Os *nexi*, no entanto, são segmentos curtos, também densos, mas neles não se distingue nitidamente uma separação entre as membranas juncionais, dando a impressão de se tratar de uma única membrana (SHEIKH et al., 2009). Ainda de acordo com Sheikh et al. (2009), os desmossomos e a *macula adherens* são complexos juncionais cuja principal função (ou pelo menos a mais aparente) é a de manutenção do contato físico célula-célula. Diversas proteínas especializadas que se localizam preferencialmente nessas junções têm a incumbência de promover a aderência inter e intracelular.



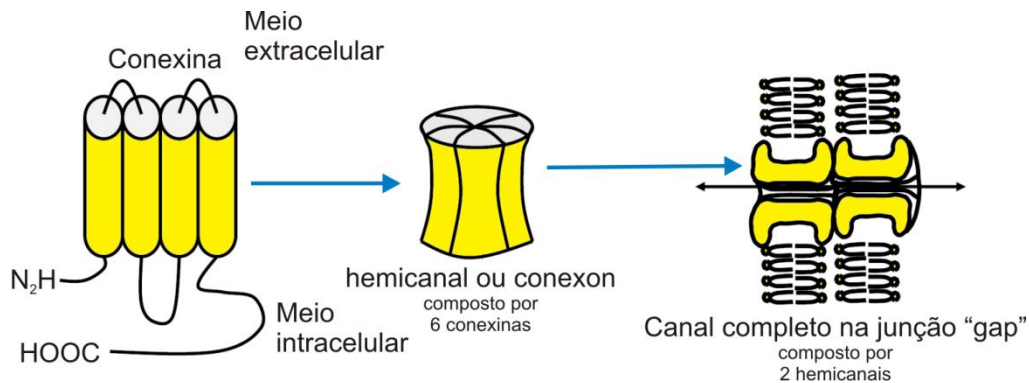
**Figura 4.** Micrografia eletrônica dos discos intercalares mostrando as regiões correspondentes à *fascia adherens* (FA), *macula adherens* (MA) e *nexus* (N). Modificado de Sheikh (2009).

Os *nexi*, ou junções comunicantes como também são conhecidos, são o sítio de baixa impedância entre as células, permitindo que o sinal elétrico seja propagado para todo o tecido excitável. Estudos realizados em junções comunicantes isoladas de fígado de mamífero, usando a técnica de difração de raios X (HERZBERG e JOHNSON, 1988), indicaram que as estruturas de ligação entre as células muito se assemelhavam a um cilindro oco com 75Å de comprimento, com diâmetro externo entre 50 e 60 Å, e com um diâmetro interno de aproximadamente 20 Å, permitindo a passagem de substâncias com até 12 Å de diâmetro. Para a formação do cilindro (ou canal) encontrado na junção comunicante, cada célula contribui com um hemicanal (ou *conexon*), formando com isso uma estrutura protéica complexa por onde íons e moléculas de pequena massa molecular (< 1000Da) podem trafegar (ver figura 5). Cada *conexon*, por sua vez, é constituído por seis monômeros de *conexina*. Atualmente cerca de 20 isoformas de *conexinas* foram relatadas em humanos e camundongo. Apesar da grande diversidade gênica, pouca variação estrutural é relatada entre os membros dessa família de proteínas, por exemplo, todas as isoformas de *conexina* apresentam quatro domínios transmembranares, com suas terminações amino e carboxi voltadas para o meio intracelular, tal como ilustrado na figura 5. Todavia, é de grande valia ressaltar que as diferentes isoformas distinguem-se substancialmente no que diz respeito às suas propriedades biofísicas, tal como a condutância do canal unitário (JANSEN et al., 2010).

Das diversas isoformas de *conexinas* expressas no músculo cardíaco, três se destacam como as mais abundantes, a saber: Cx40, Cx43 e Cx45. Cx40 é primariamente expressa no



tecido atrial, mas também pode ser encontrada em algumas partes do sistema especializado de condução elétrica do miocárdio, tais como o nodo atrioventricular, o feixe de Hiss e o sistema de condução ventricular. Cx45 está preferencialmente localizada no nodo sinusal, no nodo atrioventricular, e nos feixe e ramos de Hiss. Cx43 é a conexina mais abundante do coração, sendo encontrada nos miócitos atriais e ventriculares, além de ser bastante expressa nas partes distais do sistema de condução cardíaco. Acredita-se que o gradiente de expressão das distintas isoformas de conexinas nos tecidos cardíacos seja, em parte, responsável pelas diferenças observadas na velocidade de propagação do estímulo elétrico ao longo das distintas regiões do miocárdio, contudo essa afirmação ainda continua sendo matéria de debate no meio acadêmico (JANSEN et al., 2010, SALAMEH e DHEIN, 2013).



**Figura 5.** Esquemática simplificada mostrando a formação de um canal conectando o citoplasma de duas células adjacentes na junção comunicante. Modificado de Salameh e Dhein (2013).

### 1.3 O CARDIOMÍOCITO E AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES ENVOLVIDAS NO ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

O processo que sincroniza a ativação elétrica à atividade mecânica nas células musculares cardíacas é chamado de acoplamento excitação-contracção (AEC). Nesse processo, o  $Ca^{2+}$ , funcionando como um segundo mensageiro intracelular, tem destacada importância e é essencial para a atividade mecânica do órgão por ativar os miofilamentos, os quais são responsáveis pela geração da força de contracção. Logo, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade elétrica e contrátil desse órgão, é necessário lançar um olhar mais aprofundado sobre a estrutura microanatômica e também sobre a fisiologia celular das principais estruturas do cardiomiócito envolvidas no manejo intracelular de  $Ca^{2+}$ . As células

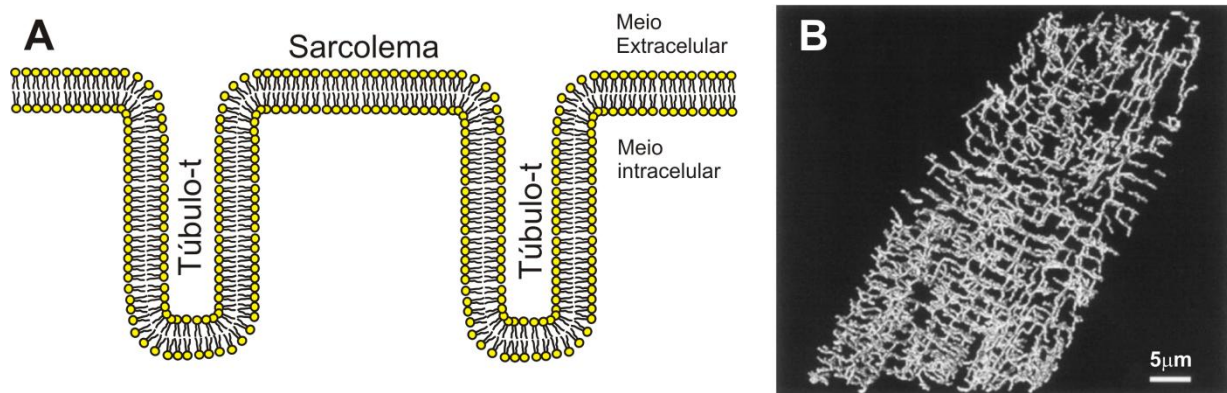
cardíacas apresentam muitos componentes que são comuns a quase todos os tipos de células, todavia alguns deles recebem nomes especiais, por exemplo, a membrana plasmática é chamada de **sarcolema**; o citoplasma, de **sarcoplasma**; e o retículo endoplasmático liso, de **retículo sarcoplasmático** (BERS, 2001). Neste capítulo, a estrutura e as funções das principais estruturas celulares envolvidas nas atividades elétrica e mecânica cardíacas serão brevemente apresentadas.

### 1.3.1 O sarcolema e os túbulos transversos

O sarcolema envolve continuamente todo o cardiomiócito formando, com isso, uma barreira seletivamente permeável que controla precisamente o transporte de substâncias entre os meios intra e extracelular. Como ilustrado na figura 6A, ao longo do sarcolema da célula miocárdica, podem ser observadas invaginações irregulares de cerca de 200 nm de diâmetro (variando entre 40 e 400nm). Estudos realizados na década de 1950 (PORTER e PALADE, 1957; ANDERSSON-CEDERGREN, 1959), usando-se a técnica de microscopia eletrônica, sugeriram que tais invaginações fizessem parte da estrutura do retículo sarcoplasmático nas fibras musculares estriadas e, pelo fato dessas estruturas terem mostrado-se tubulares e perpendiculares ao eixo longitudinal da fibra, Andersson-Cedergren (1959) denominou-as de túbulos (ou sistemas) transversos (túbulos t). Mais tarde, Peachey (1965) sugeriu que os túbulos t fossem, na verdade, estruturas contínuas com o sarcolema e que as mesmas teriam papel crucial no controle da atividade contrátil muscular. Em 1969, Fawcett e McNutt confirmaram essa hipótese e demonstraram, em fibras cardíacas, que de fato os túbulos t são extensões do sarcolema responsáveis por estabelecer contatos especializados com o retículo sarcoplasmático. Fawcett e McNutt também mostraram que essas estruturas não são estritamente transversas, mas sim preferencialmente longitudinais e oblíquas, dados que foram confirmados por estudos mais recentes (SOELLER e CANNELL, 1999; BROCHET et al., 2005; WAGNER et al., 2012). Incoerências semânticas à parte, o fato é que os túbulos t são encontrados em células ventriculares de todas as espécies de mamíferos investigadas até o momento. Todavia, dependendo da espécie estudada, as células atriais podem ou não apresentar tais estruturas (DIBB, 2013, BERS, 2001; BRETTE e ORCHARD, 2003).

Soeller e Cannell (1999), usando a técnica de microscopia confocal de 2-fótons, conseguiram reconstruir tridimensionalmente a rede de túbulos t em cardiomiócitos ventriculares de rato e concluíram que a maior parte do sarcolema (cerca de 64%) é encontrada nas invaginações dos túbulos t (ver figura 6B). É importante salientar que as células cardíacas,

especialmente as ventriculares, possuem dimensões maiores do que a grande maioria dos outros tipos celulares encontrados nos diferentes tecidos do organismo. Para se ter uma idéia, um cardiomiócito ventricular possui, em média, 140  $\mu\text{m}$  de comprimento x 30  $\mu\text{m}$  de largura x 12  $\mu\text{m}$  de profundidade, podendo variar discretamente entre espécies, pela idade e por condições patológicas distintas (BERS, 2001). Deste modo, o papel mais intuitivo dos túbulos t é o de aproximar a membrana celular, e conseqüentemente as proteínas nela ancoradas, às organelas mais internas do cardiomiócito, tais como o retículo sarcoplasmático, as miofibrilas e as mitocôndrias. Isso quer dizer que as substâncias transportadas ou até mesmo produzidas pela membrana celular encontram, através dos túbulos t, um caminho mais rápido e seguro para modular diversos processos e estruturas intracelulares. Nesse trabalho, assim como em diversos outros encontrados na literatura especializada (BROCHET et al., 2005; SCRIVEN et al., 2013), o conjunto formado pelo sarcolema e suas invaginações (os túbulos t) será, a partir de então, chamado de plasmalema.



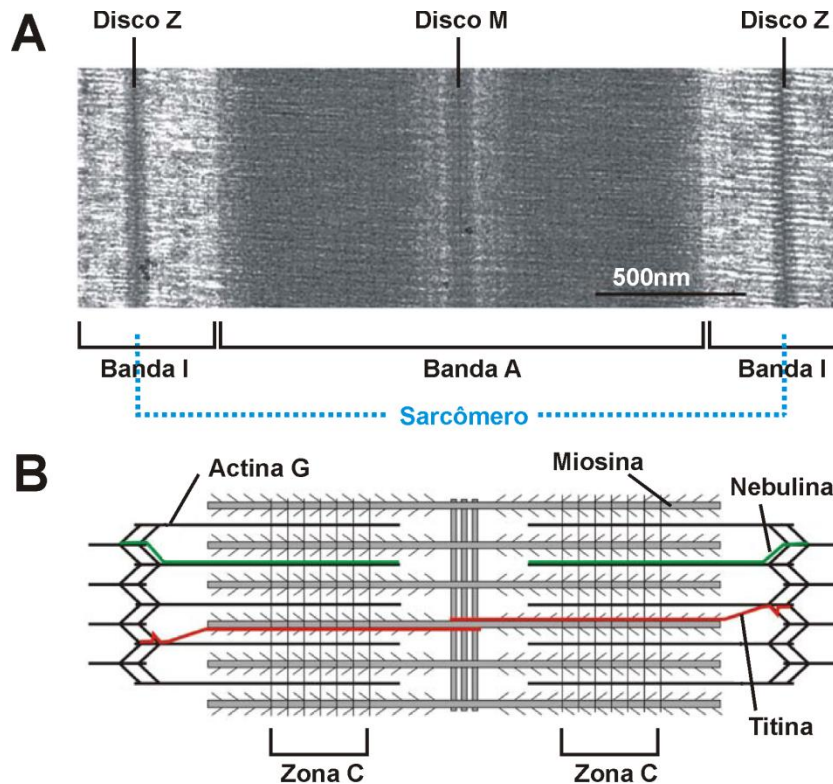
**Figura 6.** Ilustração dos túbulos t. **A)** representação do sarcolema e das suas invaginações formando os túbulos t (nenhuma proteína ou carboidrato é mostrado nessa representação, apenas a bicamada lipídica) e **B)** Imagem tridimensional obtida de um cardiomiócito de rato que demonstra o sistema de túbulos t. Em **B)** a estrutura tridimensional foi obtida através de reconstrução de camadas pela técnica de microscopia confocal de 2-fótons. Modificada de Soeller e Cannell (1999).

Atualmente sabe-se que os túbulos t desempenham papel crucial no controle das atividades elétrica e mecânica cardíacas. Geralmente, para que a contração ocorra no cardiomiócito, é necessário que a membrana celular gere e propague um potencial de ação (PA), que é uma variação rápida e intensa do potencial elétrico encontrado através da membrana celular das células excitáveis. Essa alteração do potencial de membrana é

responsável por ativar canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem que estão presentes no plasmalema, porém preferencialmente localizados nos túbulos t (BRETTE et al., 2006). A ativação desses canais faz com que a membrana celular torne-se subitamente permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual, por sua vez, entrará nas células cardíacas pelo processo de difusão simples, já que esse íon encontra-se mais concentrado do meio extracelular. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , que nos cardiomiócitos ocorre principalmente através dos canais encontrados nos túbulos t, é responsável por iniciar a liberação de mais íons Ca que se encontram armazenados do lúmen do retículo sarcoplasmático (RS). Para tanto, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula é responsável por estimular os receptores de rianodina (RyRs) encontrados na região do RS justaposta ao túbulo t. Esses últimos, quando ativados, permitem que o  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no lúmen do RS seja liberado para o citosol. Tanto o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular, quanto aquele liberado pelo RS, contribuem para o aumento na concentração sarcoplasmática desse íon, sendo responsáveis pela ativação dos miofilamentos contráteis e, conseqüentemente, pela sístole cardíaca (BERS, 2008). Mais adiante voltar-se-á a discutir, com um pouco mais de profundidade, os aspectos estruturais que fazem com que os túbulos t, em proximidade com regiões específicas do RS, desempenhem um papel crucial no controle da fisiologia celular cardíaca dos mamíferos.

### 1.3.2 Os miofilamentos contráteis

O miócito cardíaco possui miofibrilas semelhantes às aquelas encontradas no músculo esquelético (BERS, 2001). Essas, são estruturas protéicas que apresentam diâmetro de 1 a 2  $\mu\text{m}$  e que se dispõem longitudinalmente à fibra muscular. Ao microscópio óptico, as mesmas aparecem com estriações transversais, devido à alternância de faixas claras e escuras. Ao microscópio de polarização, a faixa escura é anisotrópica, tendo, por isso, recebido o nome de banda A. Ela é formada por uma trama de filamentos grossos (~15 nm de diâmetro) e pela superposição lateral de filamentos grossos e finos (~7 nm de diâmetro). A faixa clara, ou banda I, é isotrópica, consistindo de filamentos finos e proteínas que formam a linha Z, região onde os filamentos delgados estão ancorados. O padrão estriado da miofibrila deve-se à repetição de unidades iguais, chamadas sarcômeros (CONDE-GARCIA, 1998; BERS, 2001). Cada sarcômero é precisamente formado pelas miofibrilas e pelas proteínas associadas existentes entre duas linhas Z. Eles contém uma banda A e duas semi-bandas I (figura 7).



**Figura 7.** Estrutura do sarcômero no músculo estriado. **A)** Micrografia eletrônica de um sarcômero mostrando, em corte longitudinal, suas bandas A e I, discos ou linhas Z e M, e as zonas C. **B)** Ilustração de um sarcômero onde podem ser observadas, de modo simplificado, algumas proteínas encontradas nos miofilamentos contráteis. Modificado de Luther (2009).

Os filamentos finos são compostos por moléculas protéicas de actina,  $\alpha$ -actina, troponinas, tropomiosina e nebulina. A actina, seu principal componente, apresenta-se na forma de polímeros longos (actina F) formados por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcidas uma sobre a outra, em dupla hélice. Cada cadeia de monômeros globulares de actina G é ancorada à linha Z e possui uma região que interage com a miosina. A  $\alpha$ -actina, um homodímero de orientação antiparalela com formato de bastão, encontrado em quase todas as células, possui uma função extremamente importante, uma vez que a mesma é responsável por ancorar os polímeros de actina G aos discos Z. Cada molécula de  $\alpha$ -actina presente, no homodímero, possui um sítio de ligação à actina G na região amino terminal e um sítio EF (homólogo à calmodulina) na região carboxi terminal, atribuindo-se a esse último a sensibilidade dessa proteína ao  $\text{Ca}^{2+}$  (somente nas isoformas não-musculares). O fato do homodímero de  $\alpha$ -actina conter 2 regiões EF, sendo uma em cada extremidade, faz com que dois polímeros de actina G sejam ancorados em extremidades opostas ao eixo central do disco Z (LUTHER, 2009).

Outras proteínas estão associadas à actina G, tais como: a tropomiosina (Tm) e o complexo das troponinas, as quais são essenciais para a regulação da ativação dos miofilamentos contráteis. A troponina (Tn) é uma proteína heterotrimérica composta por produtos de três genes distintos: 1) troponina cardíaca C (cTnC), que é o sítio de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) troponina cardíaca I (cTnI), que cobre o sítio que permite a interação da actina com a miosina e 3) troponina cardíaca T (cTnT), que é uma proteína que se liga fortemente à tropomiosina. Essa última, por sua vez, é uma molécula longa com cerca de 40 nm de comprimento, contendo duas cadeias polipeptídicas, que se dobras em forma de hélice (De TOMBE, 2003). A nebulina (750-850 kDa) é uma proteína cuja função parece estar associada à regulação do comprimento dos filamentos de actina no músculo esquelético, porém parece ser expressa em pequena quantidade no músculo cardíaco. Nesse último encontra-se também uma proteína de aproximadamente 107 kd, homóloga à nebulina, a qual é denominada de nebulite, que desempenha papel semelhante àquela da nebulina encontrada na musculatura esquelética (LUTHER, 2009; KAZMIERSKI et al., 2003).

Os filamentos grossos são formados pela associação de moléculas de miosina, uma proteína com peso molecular de 450 kDa, composta por duas cadeias entrelaçadas, que terminam numa região globular. A hidrólise enzimática da miosina pela tripsina a divide em duas partes: uma leve, formada por grande porção de sua cauda (meromiosina leve, PM = 140 kDa) e outra mais pesada (meromiosina pesada, PM = 340 kDa), que contém a região globular. Com o prosseguimento da hidrólise, a meromiosina pesada é partida em duas subunidades, S1 e S2, com peso molecular de 120 kDa e 60 kDa, respectivamente. A região S1 corresponde à região globular propriamente dita, possuindo atividade ATPásica e sendo, portanto, a ATPase miosínica. Essa subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica pesada e duas cadeias polipeptídicas leves. A cadeia pesada constitui o corpo da enzima (ATPase miosínica), posto que a sua remoção leva à perda da atividade de hidrólise de ATP. Também uma dessas cadeias leves é fosforilável, o que pode alterar a velocidade de hidrólise do ATP. A associação das moléculas de miosina forma o filamento grosso, estando as cabeças sempre voltadas para a linha Z. Projetam-se para fora do tronco do filamento, assemelhando-se à cabeça de uma flecha, e correspondem às projeções dos filamentos grossos em direção aos filamentos finos (VASSALLO e STEFANON, 1999). As regiões da “cabeça” de moléculas de miosinas, projetadas lateralmente a partir do filamento, são chamadas de pontes cruzadas e contêm o sítio de ligação da actina com o ATP (BERNE et al., 2000). Projetando-se do disco M até o disco Z (metade de um sarcômero) e associada aos filamentos de miosina encontra-se a titina, uma grande proteína (3000 kDa) que parece estar

envolvida com a manutenção do padrão das estriações do músculo (LINKE e FERNANDEZ, 2002; GRANZIER e LABEIT, 2002).

A relação entre as propriedades biomecânicas do sarcômero cardíaco e o comportamento mecânico do coração é complexa. Ela é determinada não só pela orientação e densidade dos constituintes das fibras musculares (parâmetros espaciais), mas também pelo ritmo de ativação e relaxamento das fibras cardíacas (parâmetros temporais) (De TOMBE, 2003).

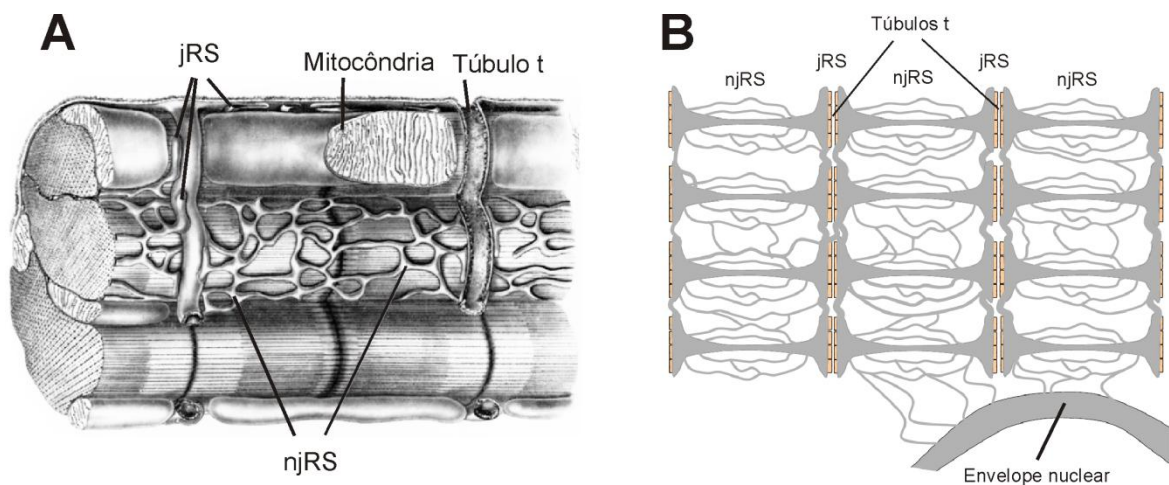
A geração de força muscular é função do número de pontes cruzadas entre a miosina e os filamentos delgados. Um estado de alta energia livre ocorre depois da hidrólise do ATP e da ligação dos seus subprodutos com a miosina, a fim de formar o complexo miosina-ADP-Pi que apresenta elevada afinidade pelo sítio de interação com a actina. Se nessa situação tal sítio estiver disponível, ocorrerá uma ligação rápida das cabeças da miosina com a actina, formando, inicialmente, um ângulo de 90 graus. Quando o ADP e Pi se desligam do complexo inicial, a energia livre da miosina alcança seu nível mais baixo, o que produz uma mudança conformacional na sua ligação com o filamento fino, fazendo com que o ângulo de interação seja reduzido para 45 graus. Essas mudanças produzem uma força no filamento delgado e movimentação em direção ao centro do sarcômero. A fosforilação da troponina I e a ligação de uma molécula de ATP à cabeça de miosina fazem com que a afinidade da miosina pela actina seja reduzida e, por isso, permite que as pontes cruzadas desconectem-se dos filamentos delgados. Isso leva a um novo ciclo de geração de força ou então cria as condições para que se instale o processo de relaxamento (BERNE et al., 2000).

### 1.3.3 O retículo sarcoplasmático

O retículo sarcoplasmático (RS) é uma organela intracelular continuamente envolta por membrana, que se projeta ao longo de todo cardiomiócito na forma de uma rede altamente interconectada. Nas células musculares esqueléticas, a principal função dessa estrutura é a de armazenar, liberar e recaptar íons de  $Ca^{2+}$  durante cada ciclo contrátil. Com uso da técnica de microscopia eletrônica, Porter e Palade (1957) mostraram, em fibras cardíacas de rato (e também em outras fibras estriadas), que o RS distribuí-se em torno das miofibrilas e que projeta regiões especializadas na direção dos discos Z. Próximo às linhas Z dos sarcômeros, o RS forma estruturas em formato de U (com a abertura voltada para o disco Z), com grande proximidade física com o que se conhece hoje como túbulos t. Em 1965, estudando fibras musculares esqueléticas de anfíbio, Peachey foi o primeiro investigador a sugerir que os túbulos



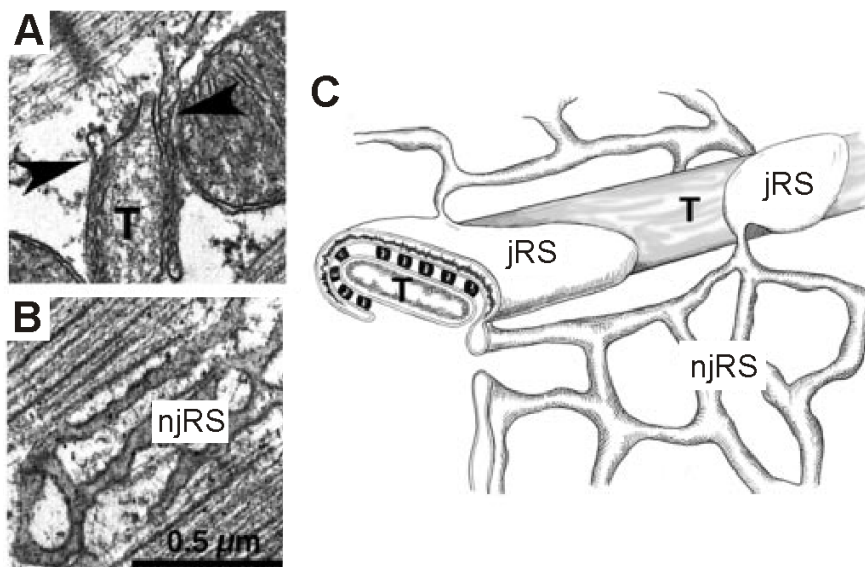
t fossem, na verdade, estruturas envoltas por uma membrana diferente daquela encontrada no RS. Propôs também que os túbulos t faziam parte do plasmalema e que desempenhavam importante função no controle da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. Essas idéias foram mais tarde comprovadas por Fawcett e McNutt (1969), os quais demonstraram que a membrana dos túbulos t era uma estrutura contínua com o sarcolema (e não com o RS) e que o RS era composto basicamente por duas regiões distintas, a saber: 1) regiões justapostas ao plasmalema, as quais foram denominadas de cisternas subsarcolemais (atualmente conhecidas como RS juncional - jRS) e 2) regiões que, na forma de uma extensa e difusa rede, envolvem as miofibrilas e as mitocôndrias, sendo conhecidas como RS não juncional (njRS) (ou como RS livre - FRS), por não se manterem próximas ao plasmalema (BERS e SHANNON, 2013). A figura 8A mostra o diagrama clássico proposto por Fawcett e McNutt (1969) para representar as principais estruturas do cardiomiócito, dentre elas o RS. Já a figura 8B ilustra as interconexões luminais transversais e longitudinais do RS, sugerindo que o mesmo funcione tal como um sincício, inclusive sendo contínuo também com o envelope nuclear. Neste texto adotar-se-ão os termos jRS e njRS para representar as distintas regiões do RS. Em células cardíacas de coelhos, o jRS e o njRS ocupam, respectivamente, 2 e 2,2% do volume citoplasmático (BROCHET, et al., 2005).



**Figura 8.** Estrutura do retículo sarcoplasmático nos cardiomiócitos ventriculares. **A)** Diagrama clássico proposto por Fawcett e McNutt (1969) e **B)** diagrama que mostra as conexões luminais transversais e longitudinais do retículo sarcoplasmático apresentado por Bers e Shannon (2013).



Experimentos utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o jRS está, de fato, justaposto ao plasmalema, porém preferencialmente localizado em proximidade aos túbulos t. Esses últimos, por sua vez, distribuem-se ao longo dos discos Z, além de apresentarem túbulos longitudinais cuja incumbência é interconectar túbulos t adjacentes (OGATA e ARAKI, 1994). O conjunto formado pela justaposição do plasmalema e do jRS é conhecido como díade, logo, nele (na díade), duas membranas distintas estão anatomicamente dispostas "frente a frente" sendo separadas apenas por um "subespaço" de aproximadamente 15 nm, conhecido como fenda diádica (SCRIVEN et al., 2013). Brochet et al. (2005) chegaram a conclusão de que o jRS possui apenas 30 nm de espessura, com um formato semelhante ao de uma panqueca que contorna os túbulos t em aproximadamente 500 nm e que cada jRS faz, em média, 4 conexões com o njRS adjacente (ver figura 9). Esses mesmos pesquisadores estimaram que o diâmetro interno do jRS seja em torno de 590 nm, com um volume luminal de ~0,008 fL.



**Figura 9.** Microanatomia do retículo sarcoplasmático em células cardíacas. **A)** Micrografia eletrônica de seção longitudinal de tecido ventricular cardíaco mostrando um túbulo t (T) envolto pelo jRS, onde as flechas indicam a continuidade entre o jRS e o njRS, **B)** Micrografia eletrônica de seção longitudinal de tecido ventricular cardíaco mostrando o njRS distribuindo-se ao longo das miofibrilas e **C)** Diagrama que mostra as conexões entre o jRS, njRS e túbulos t (T). Modificado de Brochet et al. (2005).

Um evento chave no AEC dos músculos cardíaco e esquelético é a rápida e intensa liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no lúmen do RS, sob controle do plasmalema (sarcolema e

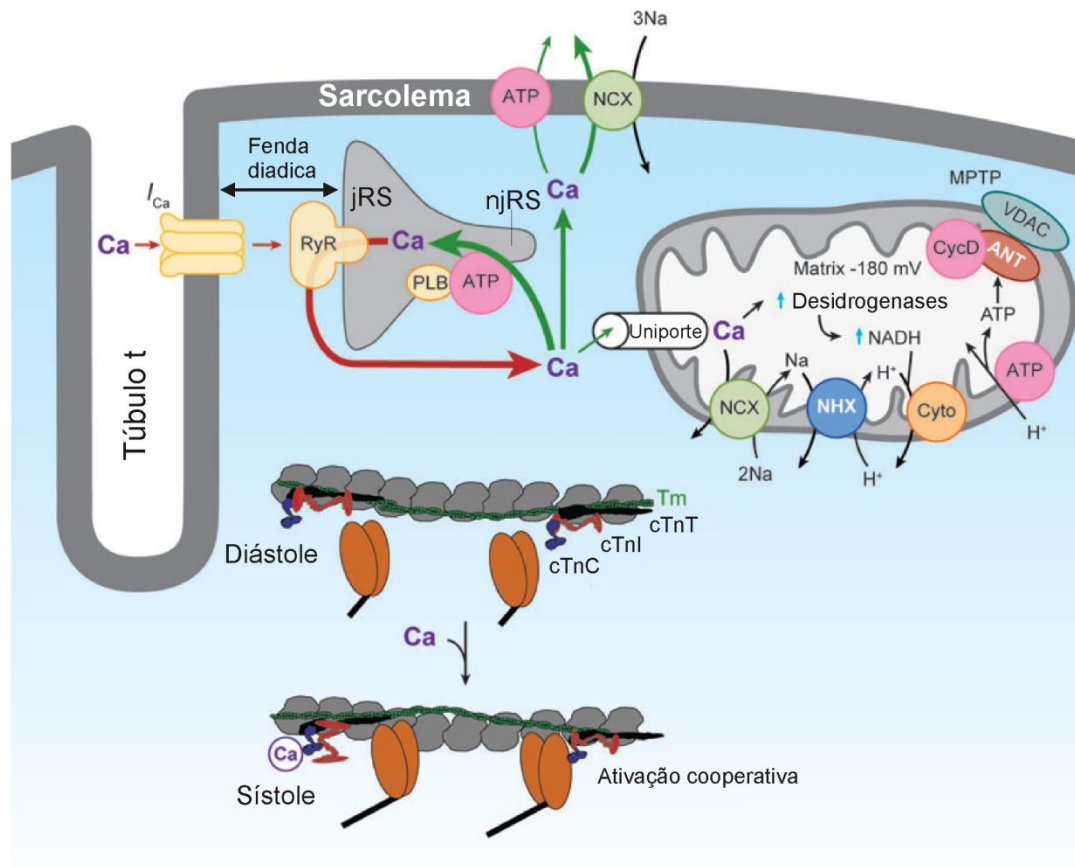
túbulos t). Para que isso aconteça, interações funcionais entre as membranas do meio externo (plasmalema) e aquela que envolve o RS são indispensáveis. De maneira simplificada, tais interações ocorrem por meio de dois canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a saber: 1) os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L localizados na membrana externa e 2) os receptores de rianodina (RyRs), também conhecidos como canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , encontrados na membrana do RS. A compreensão da geometria e da topologia dessas membranas musculares, somada ao conhecimento da relação espacial entre as diversas moléculas envolvidas no AEC, são etapas indispensáveis para a compreensão dos mecanismos envolvidos no manejo da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) e, conseqüentemente, da atividade mecânica e elétrica cardíaca. Deste modo, o próximo capítulo será dedicado ao AEC e aos seus mecanismos moleculares.

#### 1.4 O ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MIOCÁRDIO

A sinalização desempenhada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  é uma das ferramentas celulares mais versáteis utilizada para controlar diversos processos fisiológicos. Grandes e momentâneas oscilações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  são responsáveis por governar eventos que culminam na contração muscular, na locomoção celular, como também na liberação neuroendócrina. Por outro lado, pequenas e sustentadas modificações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  modulam eventos relacionados à expressão gênica ou até mesmo à apoptose (LEDERER e CHENG, 2008). Um dos melhores exemplos de tais sistemas oscilatórios ocorre no tecido do coração, pois ele regula as variações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que controlam cada batimento cardíaco. O  $\text{Ca}^{2+}$ , no miócito cardíaco, necessita de um dinâmico e delicado balanço, criado por múltiplos sistemas de interação celular que podem ser regulados por moduladores fisiológicos (BERRIDGE, 2003).

O  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel fisiológico crucial no músculo cardíaco. Uma das funções desse íon é a importante tarefa de sincronizar a atividade elétrica do coração com o evento mecânico cardíaco, processo esse denominado de acoplamento excitação-contração (AEC). Durante o PA cardíaco, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem, preferencialmente os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, são ativados, levando à uma corrente de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em função de seu gradiente eletroquímico. O  $\text{Ca}^{2+}$  que entra nas células cardíacas, pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, tem pelo menos duas funções imediatas: 1) contribuir para a elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  global e 2) aumentar a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na fenda diádica, o que induz a ativação dos RyRs, levando, com isso, à liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  que se encontra armazenado no RS. Tal processo é conhecido como liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR, sigla do inglês *calcium induced calcium release*).

Tanto o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, quanto aquele liberado pelo RS, via CICR, contribuem para o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , necessário para ativar a maquinaria contrátil celular. Para que o relaxamento ocorra, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  deve retornar ao seu nível basal. Segundo Bers (2008, 2002, 2001), a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ocorre com o auxílio de pelo menos quatro proteínas transportadoras distintas, a saber: 1) a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA, do inglês *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium ATPase*), 2) o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal (NCX, do inglês *Na-Ca exchanger*), 3) a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal (PMCA, do inglês *plasma membrane calcium ATPase*) e 4) o uniporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ . Entre esses mecanismos de transporte, os dois primeiros têm papel mais significativo. O ciclo do  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito ventricular mostra-se resumido na figura 10.



**Figura 10:** Resumo do manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos. Após o PA, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são ativados levando a uma corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) de entrada. Essa corrente faz com que a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumente, principalmente no subespaço da fenda diádica. Os RyRs reconhecem a elevação local da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , aumentando a sua probabilidade de abertura, o que leva a um efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (do lúmen do jRS para o citosol). O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do jRS, somado ao  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente

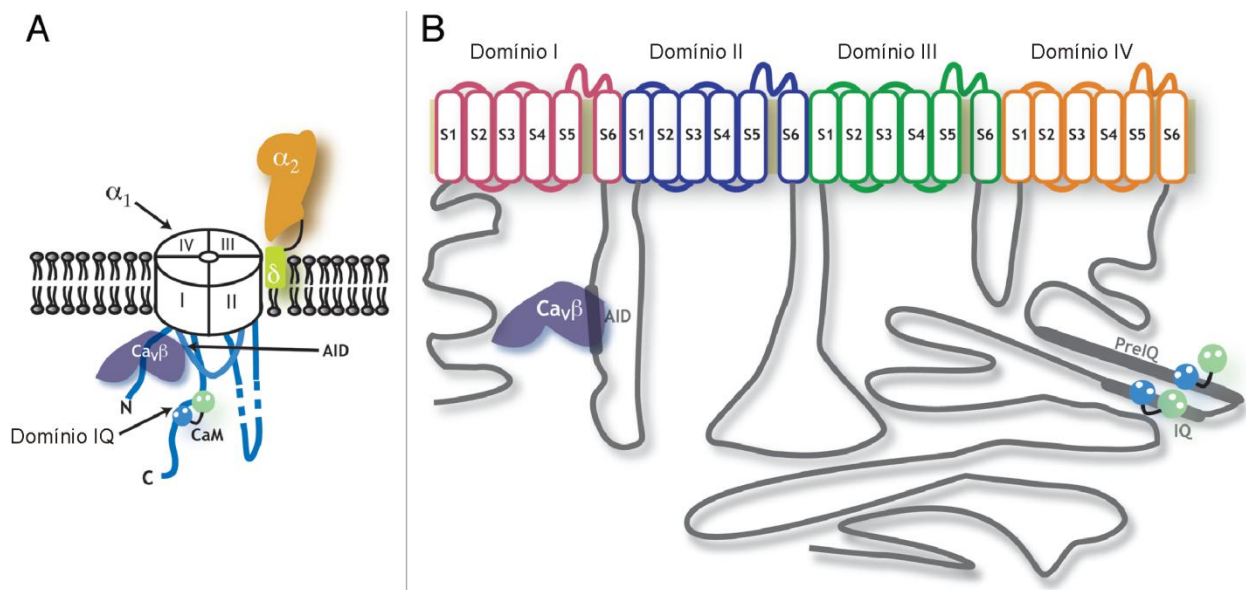
da  $I_{Ca}$ , contribuem para o aumento global da concentração citosólica desse íon. O  $Ca^{2+}$  então liga-se à cTnC, ativando os miofilamentos contráteis e promovendo a sístole. Essa figura mostra também os quatro principais mecanismos de redução da  $[Ca^{2+}]_i$ , sendo eles o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), a SERCA 2a (destacada em cor rosa na membrana do RS), a bomba de  $Ca^{2+}$  sarcolemal (destacada em cor rosa no sarcolema) e o uniporte mitocondrial de  $Ca^{2+}$ . Juntos, esses mecanismos contribuem para que a  $[Ca^{2+}]_i$  retorne ao nível diastólico, promovendo, com isso, a dissociação do  $Ca^{2+}$  ligado à cTnC e induzindo o relaxamento. Modificado de Bers (2008).

#### 1.4.1 Os canais de $Ca^{2+}$ do tipo L

Os canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem são a principal via de entrada de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos. As células cardíacas expressam duas classes desses canais, a saber: canal do tipo L (*high-voltage activated, large and long lasting current*) e do tipo T (*tiny, transient current, and low-voltage activated channel*). O primeiro, com condutância de 15 a 25 pS, apresenta ativação máxima em voltagens próximas a 0 mV e exerce importante função no AEC; o segundo, com condutância de 8 pS, possui pico de ativação em voltagens próximas a -50 mV e possui menor relevância no AEC das células cardíacas (CONDE-GARCIA, 1998; ALEXANDER e PETERS, 1999). Os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo T são mais prevalentes no coração em desenvolvimento (e também do neonato), onde parecem exercer uma função fisiológica mais evidente. Eles praticamente desaparecem do miocárdio ventricular após o nascimento, todavia mantêm-se presentes nas células marca-passo, nas quais desempenham importante função no controle e manutenção da automaticidade cardíaca. Muito embora os canais do tipo T não contribuam para o AEC do coração desenvolvido, algumas evidências experimentais apontam que os mesmos possuem importante papel no curso de algumas doenças cardiovasculares (CRIBBS, 2010). Neste trabalho serão enfocados apenas os aspectos estruturais e funcionais dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L.

O canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L é um complexo protéico, de estrutura quaternária, formado por uma subunidade  $\alpha 1$ , responsável pela formação do poro por onde o  $Ca^{2+}$  transita, agregado à algumas subunidades acessórias ( $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$ ,  $\gamma$ ). Até o momento, foram identificados sete tipos distintos de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, os quais são classificados pelos genes que codificam a subunidade  $\alpha 1$  ( $Ca_v1.1$  -  $Ca_v1.4$  e  $Ca_v2.1$  -  $Ca_v2.3$ ). Em condições normais (não patológicas), os cardiomiócitos ventriculares adultos expressam somente a subunidade  $Ca_v1.2$   $\alpha 1_C$ . A

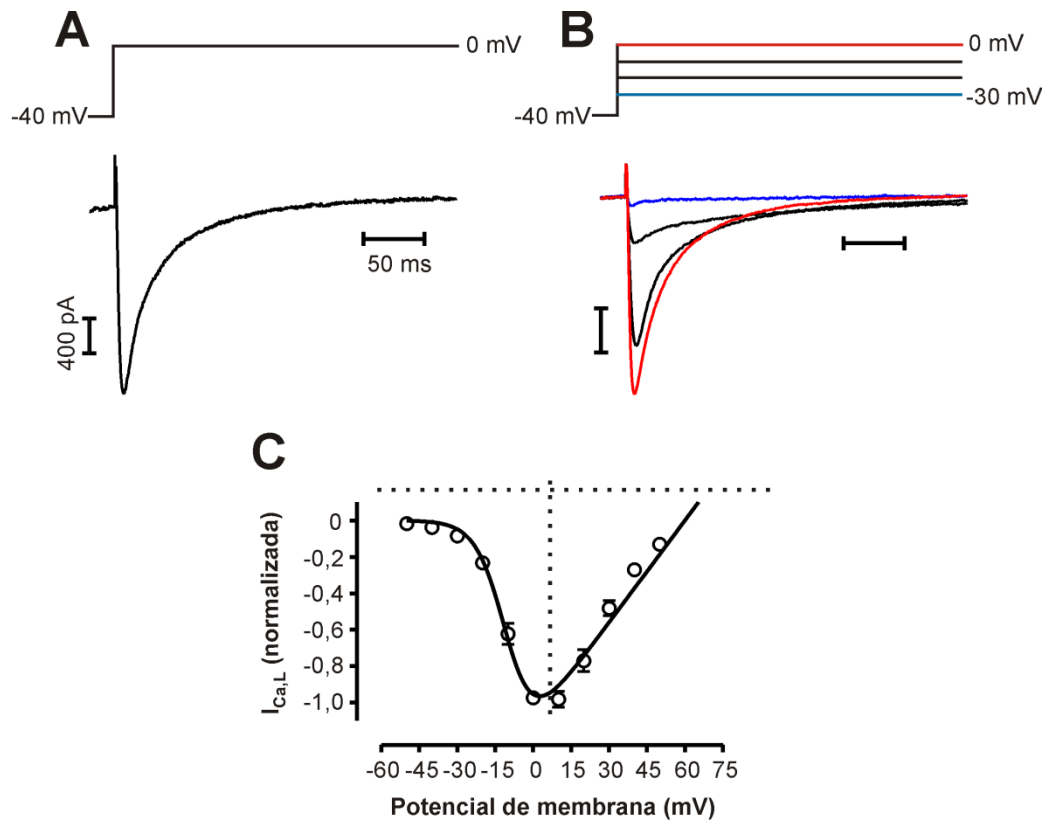
subunidade  $\alpha_{1C}$  contém 4 domínios homólogos (I - IV), cada um deles é constituído por seis segmentos transmembranares (S1 - S6), os quais (os domínios) são conectados por alças intracelulares, sendo agrupados pelas terminações citosólicas amino e carboxi terminais. O segmentos S1-S4 de cada um dos domínios compreendem o sensor de voltagem do canal, enquanto que os segmentos S5-S6 são responsáveis pela formação do poro (figura 11). Após a transcrição do pré-RNAm da subunidade  $\alpha_{1C}$ , o mesmo deve sofrer processamento (*splicing*) para que os íntrons sejam removidos, formando, com isso, o RNAm maduro, o qual será posteriormente traduzido. Uma série de *splicings* alternativos é possível quando se trata da subunidade  $\alpha_{1C}$ , indicando a existência de diversas variantes do  $\text{Ca}_v1.2$ . Embora o significado funcional no coração ainda não esteja claro, a expressão heteróloga vem mostrando discretas diferenças biofísicas de diversas variantes da subunidade  $\alpha_{1C}$  (SHAW e COLECRAFT, 2013). As outras subunidades dos  $\text{Ca}_v1.2$  são referidas como auxiliares ou acessórias. A coexpressão das subunidades acessórias junto com a subunidade principal geralmente aumenta o número de canais funcionais na membrana celular. Essa coexpressão também modifica as constantes de tempo de *gating*, além de deslocar os valores de voltagens envolvidos na ativação e inativação do canal no estado estacionário (HILLE, 2001).



**Figura 11.** Representação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem. **A)** Diagrama representando o  $\text{Ca}_v$ . Nela pode ser observada a junção dos quatro domínios homólogos da subunidade  $\alpha_1$ , formando com isso o poro do canal, além das subunidades acessórias  $\beta$ ,  $\alpha_2\beta$  e calmodulina (CaM). Também estão destacados o domínio IQ, local da subunidade  $\alpha_1$  onde a CaM é fixada, e também o AID (domínio de interação da subunidade  $\alpha$ , do inglês  $\alpha$  interaction

*domain*), local da subunidade  $\alpha 1$  onde a subunidade  $\beta$  é ancorada. **B)** Topologia da subunidade  $\alpha 1$  formadora do poro. Modificado de Findeisen e Minor (2010).

Durante a diástole, um intenso gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  é mantido através do sarcolema dos cardiomiócitos. A  $[\text{Ca}^{2+}]$  extracelular gira em torno de 2 mM, o que faz com que a mesma seja aproximadamente 20.000 vezes maior do que a concentração citosólica desse íon, que no repouso é mantida em torno de 0,1  $\mu\text{M}$ . Deste modo, mudanças na condutância do sarcolema ao  $\text{Ca}^{2+}$ , desencadeadas primariamente por modificações do estado condutor do  $\text{Ca}_v1.2$ , podem acarretar em alterações significativas no manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como pode ser visto na figura 12B, a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) começa a ser ativada em potenciais de membrana superiores a -40 mV, com seu valor máximo para ativação entre 0 a 10 mV e potencial de reversão em torno de 60 a 70 mV, apresentando assim uma curva corrente-voltagem em forma de sino (figura 12C). Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L podem ser encontrados em três estados condutivos, a saber: Modo 0 ou nulo, no qual os canais estão indisponíveis para serem abertos; Modo 1 (modo de atividade normal), no qual podem ser observadas espaçadas aberturas de breve duração; e Modo 2, que apresenta uma alta probabilidade de abertura, resultando em uma longa abertura com fechamentos pontuais ao longo da mesma. O desvio do equilíbrio para o Modo 2 pode ser obtido por fosforilação do canal, por agonistas farmacológicos, pelas coexpressão de algumas subunidades acessórias e, principalmente, por uma despolarização intensa da membrana celular (SHAW e COLECRAFT, 2013; BENITAH et al., 2010).



**Figura 12.**  $I_{Ca,L}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** O painel superior mostra o protocolo de voltagem que manteve a célula a um potencial de membrana de -40 mV e logo em seguida um pulso retangular despolarizante, que levou a voltagem de membrana para 0 mV (com duração de 300 ms), foi aplicado, evocando com isso a  $I_{Ca,L}$ , a qual é caracterizada por um pico negativo de corrente seguido por uma inativação relativamente lenta, tal como ilustrado no painel inferior. **B)** Série de pulsos superpostos onde a célula foi mantida a -40 mV e logo em seguida pulsos despolarizantes de -30 a 0 mV (passos de 10 mV e 300ms de duração) foram aplicados. Nela pode-se observar que a corrente começa a ser observada em valores de potencial de membrana superiores a -30 mV (traço azul), alcançando o seu valor máximo em 0 mV (traço vermelho). **C)** Relação corrente normalizada-voltagem para a  $I_{Ca,L}$ , mostrando a curva característica em formato de sino, com o potencial de reversão em torno de 60mV.  $I_{Ca,L}$  obtida de cardiomiócitos ventriculares de camundongo pela técnica de *patch clamp*. Fonte: dados pessoais não publicados.

Durante a despolarização sustentada (figura 12A) pode ser observado que a  $I_{Ca,L}$  alcança, de modo relativamente rápido (~10 ms), o seu valor máximo (pico), sofrendo, logo em seguida, uma inativação (ou decaimento) de curso temporal relativamente lento. Dois mecanismos distintos são responsáveis pela inativação da  $I_{Ca,L}$ , a saber: 1) inativação

dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDI, do inglês *calcium-dependent inactivation*) e 2) inativação dependente de voltagem (VDI, do inglês *voltage-dependent inactivation*) (BREHM e ECKERT, 1978; KASS e SANGUINETTE, 1984). Muito embora esses dois mecanismos contribuam para a inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$ , durante o PA cardíaco, em condições fisiológicas, a CDI parece ser mais relevante. Sendo assim, a CDI funciona como um sistema de retroalimentação negativa induzido pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e pelo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS, facilitando a transição dos  $\text{Ca}_v1.2$  do Modo 2 para o Modo 0. A calmodulina (CaM), agregada à terminação carboxi na porção intracelular da estrutura do  $\text{Ca}_v$  (figura 11), é a proteína responsável por reconhecer mudanças locais na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induzindo com isso a CDI (BENITAH, 2010). Tanto o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula através do  $\text{Ca}_v$ , quanto aquele liberado pelo RS pela CICR, são responsáveis pelo aumento local da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , facilitando a interação desse íon com a CaM e promovendo, com isso, a CDI. Deste modo, alterações na carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pode, indiretamente, influenciar na quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula via  $I_{\text{Ca,L}}$  a cada batimento cardíaco. Paradoxalmente, a CaM também é responsável por mediar um sistema de retroalimentação positiva no  $\text{Ca}_v$ , denominado de facilitação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDF, do inglês *Calcium-dependent facilitation*) (FINDEISEN e MINOR, 2010). Acredita-se que a CDF é o mecanismo responsável pelo efeito inotrópico positivo observado após o aumento da frequência cardíaca. Uma das hipóteses sugeridas para explicar a CDF está relacionada com a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS em cada batimento cardíaco. Quando a frequência cardíaca é elevada, a carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS reduz significativamente, o que diminui a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado e disponível para induzir a CDI, deslocando os canais encontrados no Modo 1 para o Modo 2, aumentando assim a  $I_{\text{Ca,L}}$ .

#### 1.4.2 Os receptores de rianodina

No músculo cardíaco, os receptores de rianodina (RyRs, do inglês *ryanodine receptors*) funcionam como canais iônicos, presentes na membrana do RS, permitindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado nessa organela seja prontamente liberado para suprir as demandas celulares. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS, via RyR, contribui para a elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , necessária para a ativação dos miofilamentos contráteis, durante cada ciclo cardíaco. Diferentemente dos  $\text{Ca}_v1.2$ , os RyRs são canais controlados por ligante. Nesse caso, um dos ligantes fisiológicos que modula os RyRs é o próprio  $\text{Ca}^{2+}$ . No receptor de RyR existem vários sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  (e demais íons divalentes), com diferentes afinidades e cinéticas de ligação, localizados tanto na estrutura do canal voltada para o sarcoplasma, quanto naquela orientada para o lúmen do RS, os quais reconhecem de modo preciso as mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]$  local, alterando, com isso, a probabilidade

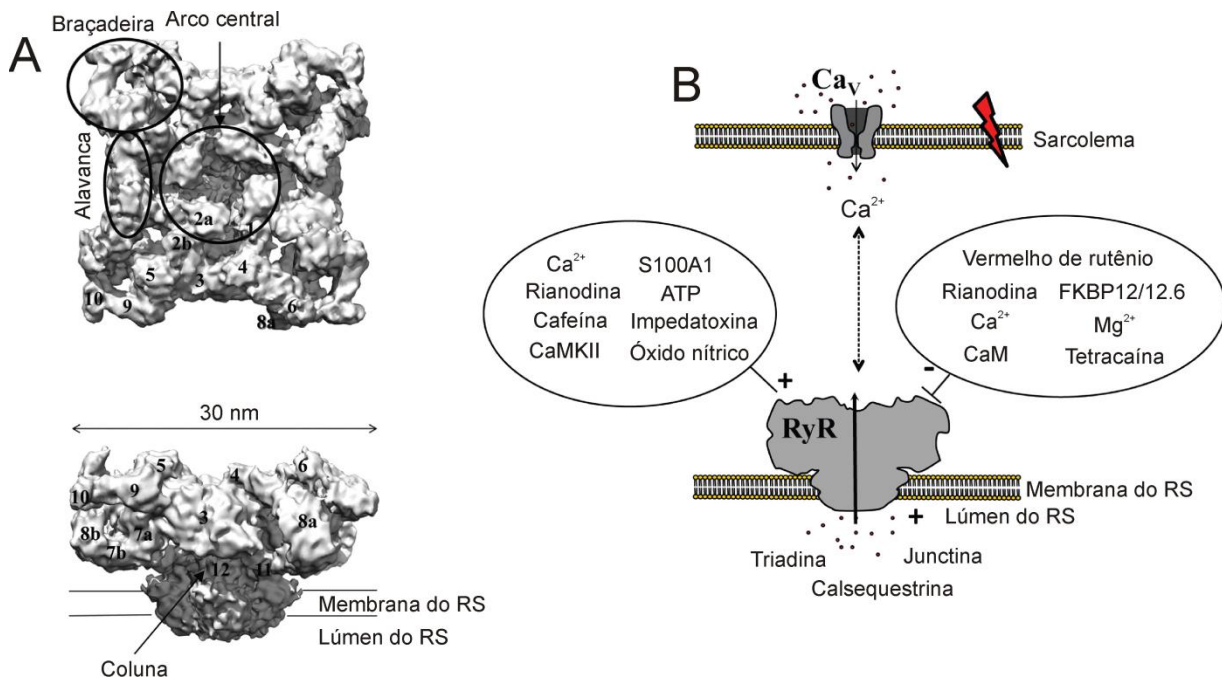


de abertura do RyR. Tais receptores receberam esse nome por serem modulados pela rianodina, um alcalóide proveniente da planta sul-americana *Ryania speciosa* (NIGGLI et al., 2013).

Nos mamíferos são encontradas três isoformas de RyRs, a saber: RyR do tipo 1 (RyR1), predominantemente encontrado no músculo esquelético; RyR do tipo 2 (RyR2), expresso no miócito cardíaco; e RyR do tipo 3 (RyR3), preferencialmente localizado no cérebro. Os três tipos de RyRs apresentam sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional muito semelhantes (aproximadamente 70 %), sendo que todos eles são formados por uma complexa estrutura protéica macromolecular composta pelo conjunto de 4 subunidades idênticas (homotetrâmero), cada uma pesando cerca de 565 kDa, totalizado aproximadamente 2,2 MDa. Muito embora o  $\text{Ca}^{2+}$  seja o principal ligante e modulador desse canal, no músculo esquelético esses íons não são absolutamente necessários para ativação do RyR1. Já está bem estabelecido que existe um contato físico entre o RyR1 e o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L presente naquele tecido ( $\text{Ca}_v1.1$ ), de modo que quando um PA é gerado e propagado pelo sarcolema da fibra muscular esquelética, alterações na estrutura tridimensional do  $\text{Ca}_v1.1$  induzem, diretamente, uma mudança conformacional do RyR1, iniciando, com isso, a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS mesmo na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Porém é importante ressaltar que nem todos os RyR1 estão em contato com o  $\text{Ca}_v1.1$ , de tal modo que esses receptores são ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelos RyR1 vizinhos (via CICR) (REBBECK et al., 2013).

No músculo cardíaco, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura falharam em demonstrar uma conexão física direta entre o  $\text{Ca}_v1.2$  e o RyR2 (SCRIVEN et al., 2013). Nesse tecido (de modo semelhante ao músculo esquelético), as evidências apontam que os RyR2 estão organizados em macroestruturas denominadas de *clusters*. Um estudo recentemente realizado por Baddeley e colaboradores (2009), usando uma técnica de microscopia óptica de alta resolução (resolução de cerca de 30nm, bem maior do que a resolução máxima da microscopia confocal que é de aproximadamente 200nm), na qual cada tetrâmero de RyR2 pôde ser identificado, apontou que o *cluster* é composto por, em média, 14 homotetrâmeros, um número bem inferior ao que se pensava anteriormente (75 - 100 RyRs/*cluster*), todavia o número real de RyR2 em cada *cluster* parece ser uma questão ainda em aberto (CHENG e LEDERER, 2008, SCRIVEN et al., 2013). Baddeley e colaboradores (2009) ainda demonstraram que o diâmetro dos *clusters* é de aproximadamente 110 nm, sendo os mesmos separados uns dos outros, centro a centro, por uma distância de 310 nm. Esse valor cai para 50 nm quando a distância inter-*clusters* é medida de borda à borda. Foi também observado que os *clusters* cardíacos são topograficamente menos organizados do que se pensava anteriormente.

A figura 13A mostra uma reconstrução do tetrâmero de RyR1, criada a partir de dados obtidos pela técnica de crio-microscopia eletrônica. Apesar dessa imagem ter sido oriunda de receptores extraídos e purificados de músculo esquelético, a semelhança estrutural entre todos os tipos de RyRs permite extrapolar tais achados para o coração. Os RyRs possuem formato de cogumelo, com grande parte de sua estrutura voltada para o citosol (cerca de 80% do volume), uma pequena parte orientada para lúmen do RS, sendo ambas conectadas e sustentadas por robustas "colunas" moleculares (ver figura 13A, painel inferior). É importante ressaltar que a porção citosólica do RyR não é uma estrutura rígida e estática, ao contrário, possui cavidades intramoleculares que são preenchidas com solvente, fornecendo uma importante flexibilidade conformacional. Para facilitar a compreensão estrutural do RyR, algumas regiões receberam nomes específicos (ver figura 13A, painel superior), tais como: arco central (do inglês *central rim*), braçadeira (do inglês *clamp*) e alavanca (do inglês *handle*). As porções globulares são identificadas com números e são conhecidas como sub-regiões. A sub-região 6, localizada na braçadeira do receptor, é responsável por realizar a interação RyR-RyR, importante para a formação e manutenção do *cluster*. Como a região da braçadeira parece se mover muito durante a abertura-fechamento do RyR, acredita-se que a atividade de um único RyR pode influenciar a propriedade de *gating* dos receptores vizinhos que estão em contato direto com ele (cooperatividade positiva) (VAN PETEGEM, 2012).



**Figura 13.** Estrutura geral dos RyRs. **A)** Reconstrução do RyR com dados obtidos por crio-microscopia eletrônica, ilustrando a parte superior do canal (painel superior) e lateral do mesmo

(painel inferior). Nelas pode-se observar diversas regiões do RyR. **B)** Ilustração do RyR e dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_V$ ) presentes em duas membranas distintas, mostrando algumas moléculas ou substâncias que modulam esses receptores. O raio vermelho indica a geração de propagação do PA, antes da ativação do  $\text{Ca}_V$ . Modificado de Van Petegem (2012).

O poro do RyR é formado pela junção de 6 a 8 segmentos transmembranares, provenientes de cada molécula do homotetrâmero. Deste modo, pode-se perguntar por que o RyR possui uma estrutura tão grande e complexa, sendo que o poro por onde o  $\text{Ca}^{2+}$  transita é algo relativamente pequeno. A resposta para essa pergunta pode estar relacionada com a modulação desses receptores. Como o  $\text{Ca}^{2+}$  é um segundo mensageiro intracelular que governa atividades relacionadas desde a contração celular até a expressão gênica, sua liberação pelo RS/RE deve ser minuciosamente controlada. Como ilustrado na figura 13B, diversos moduladores fisiológicos (e algumas drogas) estão diretamente envolvidos no controle da atividade dos RyRs. De modo importante, a maioria desses moduladores pode apresentar efeitos antagônicos, uma vez que os mesmos podem atuar em diferentes sítios de ligação, sendo que cada um deles apresenta cinética de ligação e constantes de dissociação ( $K_d$ ) distintas para a mesma substância, como é o caso do próprio  $\text{Ca}^{2+}$ . A probabilidade de abertura dos RyRs depende gradativamente da  $[\text{Ca}^{2+}]$  na fenda diádica, logo, acredita-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  ligue-se a um sítio específico do canal, ativando-o. Sendo assim, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L é a principal via de ativação do RyR no coração, porém não é a única (discutir-se-á mais adiante que os RyRs podem ser ativados espontaneamente). A sensibilidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  desses canais, que é inferida pela  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  necessária para aumentar em 50 % ( $\text{CE}_{50}$ ) a probabilidade de abertura dos RyRs, pode ser manipulada por diversos moduladores fisiológicos (ATP, FKBP12/12.6,  $\text{Mg}^{2+}$ , CaM, CaMKII, fosfodiesterases, NO, etc) e farmacológicos (rianodina, cafeína, tetracaína, vermelho de rutênio, entre outros). Modificações químicas nos RyRs, tais como fosforilação (via PKA ou CaMKII) ou oxidação/redução (via NO ou espécies reativas de oxigênio) também participam ativamente do controle da atividade desses canais (NIGGLI et al., 2013).

#### 1.4.3 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Uma vez que a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é elevada para promover a sístole cardíaca, ou até mesmo para controlar quaisquer outros processos celulares locais ou globais, a concentração desse íon deve retornar aos seus valores basais para que a diástole seja promovida. Diversos

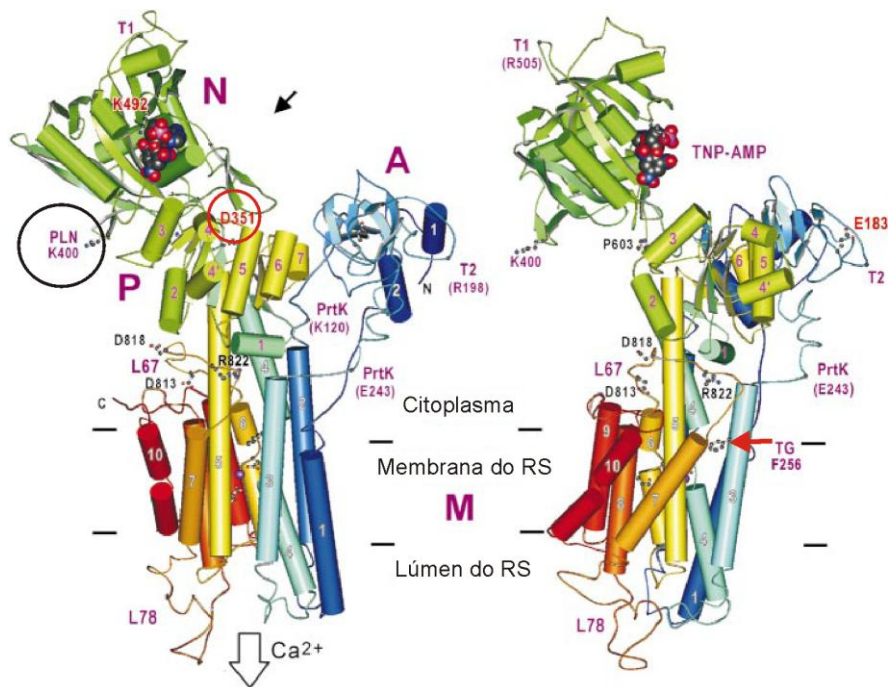
mecanismos contribuem para manter a  $[Ca^{2+}]_i$  em níveis relativamente baixos, sendo o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) uma das proteínas transportadoras mais relevantes nesse processo. Encontrado no plasmalema e na membrana de diversas organelas intracelulares, o NCX é uma proteína transportadora do tipo antiporte que, geralmente, usa a energia acumulada pelo gradiente eletroquímico do  $Na^+$ , armazenada através da membrana, para remover o  $Ca^{2+}$  do citosol. Até então três isoformas de NCX foram identificadas em mamíferos (NCX1-3), sendo o NCX1 encontrado preferencialmente no músculo cardíaco. O NCX é constituído por uma região transmembrana (11 a 12 domínios transmembranares), com uma grande alça intracelular, sendo essa última importante para ativação desse transportador, uma vez que a mesma agrega os dois domínios do tipo C2, a saber: CBD1 e CBD2; que juntos formam o sítio de ligação ao  $Ca^{2+}$  (CHEN e LI, 2012).

O NCX é um transportador que geralmente carrega o efluxo de 1  $Ca^{2+}$  em troca do influxo de 3  $Na^+$  (modo direto), todavia o NCX pode funcionar de modo reverso, se a  $[Na^+]_i$  estiver elevada, ou se o potencial de membrana estiver menos negativo. Logo, o potencial de equilíbrio para o NCX ( $E_{NCX}$ ) corresponderá a 3 vezes o potencial de equilíbrio do  $Na^+$  ( $3E_{Na}$ ) menos o potencial de equilíbrio do  $Ca^{2+}$  ( $E_{Ca}$ ), o qual, em condições fisiológicas, é algo em torno de -70 mV. Potenciais de membrana mais negativos do que o  $E_{NCX}$  favorecem o NCX a trabalhar no modo direto, todavia o contrário será observado para potenciais acima do  $E_{NCX}$ . Na realidade fisiológica do cardiomiócito, as  $[Na^+]_i$  e  $[Ca^{2+}]_i$  mudam em função do tempo, o que induz alterações no valor do  $E_{NCX}$ . Todavia, durante o repouso (diástole) das células cardíacas, essas concentrações são mantidas relativamente constantes e, como o potencial de membrana gira em torno de -80 mV, o NCX opera em modo direto, sendo, com isso, o principal removedor de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos (KIMURA et al., 2009, CHEN e LI, 2012). É importante salientar que o NCX é eletrogênico, uma vez que a cada ciclo, duas cargas positivas são transportadas para um sentido da membrana ( $1Ca^{2+}$ ), enquanto que três cargas positivas percorrem caminho oposto ( $3Na^+$ ), promovendo o influxo ou efluxo de uma carga elétrica por ciclo, a depender do modo de operação do NCX. Sendo assim, quando o NCX funciona no modo direto, uma corrente de influxo pode ser claramente observada, o que contribui para a despolarização da membrana. Diversos dados da literatura apontam que tais correntes são potencialmente arritmogênicas e estão diretamente envolvidas em eventos tais como a pós-despolarização tardia (DAD, do inglês *delayed after-depolarization*) ou a pós-despolarização precoce (EAD, do inglês, *early after-depolarization*).

#### 1.4.4 Bombas de $\text{Ca}^{2+}$

As bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (ou  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases), encontradas nas membranas celulares externas ou internas do cardiomiócito, desempenham papel crucial na manutenção do gradiente químico de  $\text{Ca}^{2+}$  ao longo dos diversos compartimentos celulares. As bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  pertencem à família de ATPases do tipo P, ou seja, elas transferem um grupo fosfato, proveniente do ATP, para um resíduo aspartil em sua estrutura, formando um intermediário de elevada energia que, por sua vez, é essencial para que o transporte seja realizado. No coração, dois tipos principais de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases do tipo P podem ser encontrados: 1) a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA, do inglês *sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) e 2) a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da membrana plasmática (PMCA, do inglês *plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*). Além das diferenças posicionais, uma vez que a PMCA localiza-se preferencialmente na membrana celular enquanto que a SERCA é encontrada na membrana do RS/RE, ambos os tipos de ATPases apresentam também diferenças bioquímicas, físico-químicas, farmacológicas e funcionais entre si (PRASAD et al., 2004). De acordo com Bers (2001), a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  transportado do citoplasma para o meio extracelular pela PMCA é relativamente pequena quando comparada, por exemplo, ao montante removido pelo NCX durante cada ciclo cardíaco. Sendo assim, pelo fato da PMCA apresentar participação discreta no AEC cardíaco, esse tipo de ATPase não será focado no presente trabalho.

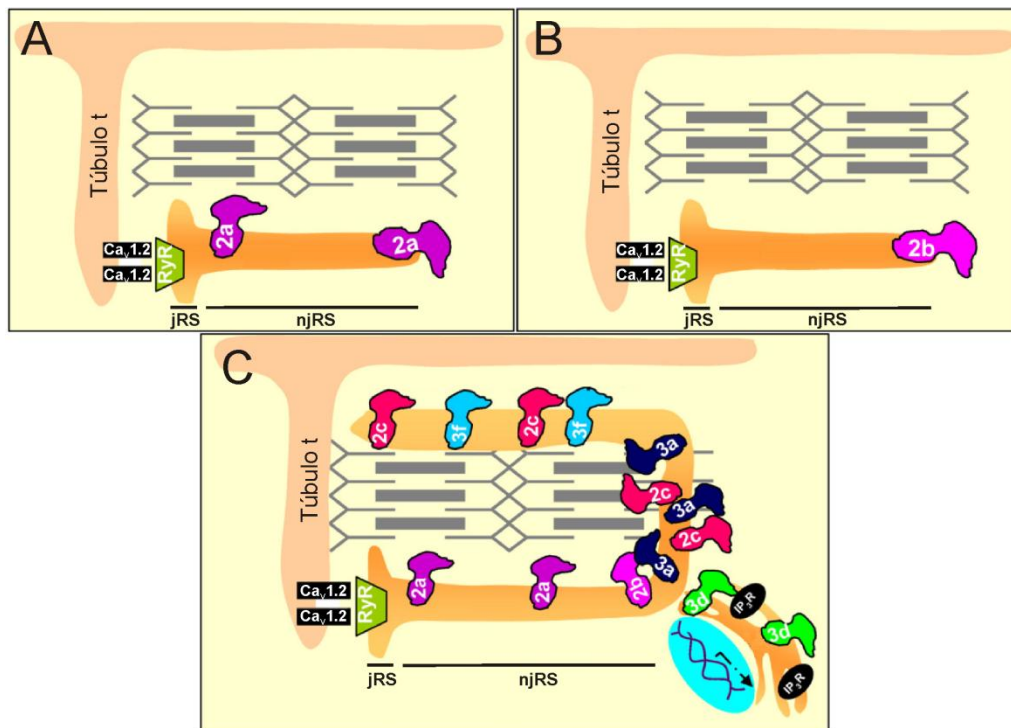
Localizada na membrana do RS/RE e responsável por restaurar e/ou manter os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior dessa organela, a SERCA é constituída por 4 domínios funcionais, a saber: 1) domínio de ligação ao nucleotídeo (N), 2) domínio de fosforilação (P), 3) domínio atuador (A) e 4) domínio transmembrana (M). Os domínios N, P e A são voltados para o citoplasma e formam a cabeça da bomba. Atualmente está bem estabelecido que a reação de catálise realizada pela SERCA inicia-se quando 2 íons de Ca e uma molécula de ATP ligam-se em regiões relativamente distantes. O sítio de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  situa-se dentro do domínio M, enquanto que o ATP liga-se ao domínio N, o qual esta voltado para o citosol. Após a ligação dessas substâncias, acredita-se que ocorre uma reorganização dos domínios N e P, estimulados pela alteração conformacional do domínio A, o que aproxima o grupo fosfato  $\gamma$  do ATP ao resíduo D351 (no domínio P), facilitando a formação da fosfoenzima intermediária necessária para a catálise do transporte (ESPINOSA-FONSECA e THOMAS, 2011). A figura 14 mostra a estrutura da SERCA purificada de músculo esquelético, com base em dados de cristalografia de raio-x.



**Figura 14.** Representação da estrutura da SERCA. Nessa figura as  $\alpha$ -hélices estão representadas por cilindros e as folhas beta por setas. Nela, as cores mudam gradativamente da região amino (azul) para a região carboxiterminal (vermelho). Os domínios estão marcados por A, P, D e M. O domínio M é formado por 10  $\alpha$ -hélices transmembranares (M1-10), sendo que o sítio de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$  situa-se entre as hélices M4, M5, M6 e M8. A figura da esquerda está orientada de modo que a alfa-hélice M5 esteja paralela ao plano da folha de papel. A figura da direita foi girada em  $50^\circ$ , tomando como eixo central a hélice M5. Em ambas imagens pode-se observar a região no domínio N, onde o ATP liga-se (próximo ao resíduo K492). Nesse mesmo domínio observa-se a região de interação com o fosfolambano (PLN, próximo ao resíduo K400). Na figura da esquerda está ressaltado, por um círculo vermelho, o sítio D531, que sofre fosforilação. Na figura da direita é possível visualizar a região de ligação da tapsigargina (TG, próxima ao resíduo F256). Modificado de Toyoshima et al. (2000).

Três tipos de SERCA (SERCA1-3), codificadas por famílias de genes distintos (ATP2A1-3), podem ser encontradas em mamíferos. Cada família pode apresentar diversas isoformas, diferenciadas por letras minúsculas ao final da abreviação. A isoforma SERCA2a é a mais abundante no músculo cardíaco, chegando a representar cerca de 50% das proteínas totais encontradas na membrana do RS. Além da SERCA2a, o coração também expressa a SERCA2b em menor quantidade. Evidências mais recentes sugerem que as isoformas SERCA2c, SERCA3a, d e f também podem participar do manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos

cardiomiócitos. Cada uma dessas proteínas possui localização diferenciada ao longo do RS e, juntas, elas são a segunda maior fonte de consumo de ATP, ficando atrás apenas da Na/K ATPase. A SERCA2a parece estar localizada nas proximidades do jRS e também ao longo do njRS, enquanto que a SERCA2b e os demais subtipos observados no coração parecem estar restritas à membrana do njRS. Tal organização sugere que os sítios de recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  estão relativamente distantes daqueles responsáveis pela liberação desse íon, tal como ilustrado na figura 15 (DALLY et al., 2010).



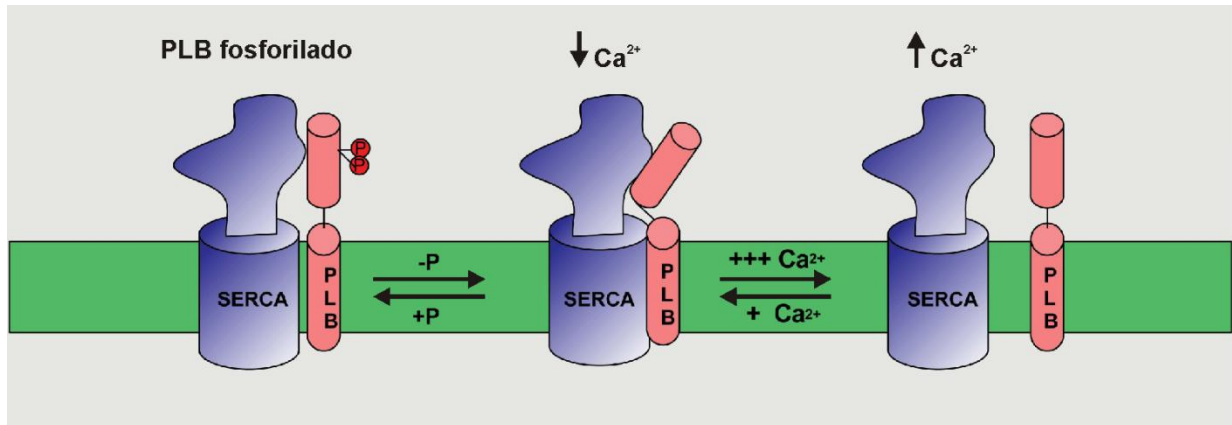
**Figura 15.** Representação esquemática simplificada da localização das diversas isoformas da SERCA no RS cardíaco. **A)** A SERCA2a possui distribuição mais heterogênea ao longo do njRS, pode ser inclusive observada em regiões próximas ao jRS. **B)** A SERCA2b localiza-se em regiões do njRS próximas à linha z. **C)** Mostra a distribuição das diversas isoformas de SERCA no RS. As SERCA2c e 3f parecem localizar-se preferencialmente nas regiões próximas ao sarcolema, enquanto que as SERCA2b e 3a distribuem-se nas regiões do njRS transversais ao eixo mais longo do cardiomiócito. Sugere-se que a SERCA3d seja restrita ao envelope nuclear, junto com receptores de trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Modificado de Dally et al. (2010).

Por ser um importante mecanismo de controle do manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , a atividade da SERCA é modulada por diversas vias, as quais podem aumentar ou diminuir a sua

atividade catalítica ou até mesmo a afinidade dessa enzima pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Um dos mais importantes mecanismos de controle da atividade da SERCA é realizado com o auxílio de uma proteína conhecida como fosfolambano (PLB). O PLB é constituído por 52 aminoácidos, sendo altamente expresso no coração na forma de monômeros ou tetrâmeros, porém, é encontrado em baixa quantidade nos outros tecidos musculares. Além de ter a função de reconhecer alterações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e controlar a afinidade da SERCA pelo  $\text{Ca}^{2+}$  em função disso, essa proteína é também uma das responsáveis pelo efeito inotrópico positivo observado após a ativação da via  $\beta$ -adrenérgica no coração de mamífero (PERIASAMY et al., 2008). Isso se deve ao fato do PLB ser alvo de fosforilação pelas proteínas cinases dependente de AMPc (PKA) e dependente de calmodulina do tipo II (CaMKII), ambas ativadas pela via adrenérgica nos cardiomiócitos (como também por outras vias).

Quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  encontra-se em níveis diastólicos ( $\sim 150$  nM), os monômeros de PLB interagem com a SERCA, reduzindo a afinidade dessa enzima pelo  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Deste modo, a baixa  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , somada a uma reduzida afinidade da SERCA pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , podem diminuir drasticamente a velocidade de transporte durante a diástole cardíaca. Todavia, após uma CICR, é observado um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suficiente para fazer com que o complexo PLB-SERCA se dissocie, aumentando a atividade de transporte dessa bomba. Tais mecanismos são independentes de PKA ou CaMKII, sendo função principalmente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Todavia, a fosforilação do PLB pela PKA e/ou CaMKII (além de outras cinases) também promove a dissociação entre o complexo PLB-SERCA, aumentando significativamente o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do RS (figura 16). Na prática, quando a SERCA não sofre inibição pelo PLB, observa-se um maior transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o lúmen do RS, o que leva a um aumento da carga desse íon nessa organela. Essa elevação no estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  faz com que a quantidade liberada desse íon, durante cada ciclo cardíaco, seja aumentada (PERIASAMY et al., 2008). Tal hipótese é reforçada pelo fato de animais geneticamente modificados, que não expressam o PLB (PLB<sup>-/-</sup>), apresentarem força de contração aumentada em relação àqueles que expressam essa proteína, uma vez que quanto maior o montante de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado a cada evento cardíaco, maior será a ativação dos miofilamentos contráteis. É ainda importante ressaltar que os animais PLB<sup>-/-</sup> também perdem parcialmente o efeito inotrópico positivo evocado pela ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no coração, indicando que a fosforilação do PLB, pela PKA e/ou CaMKII, é uma importante via regulatória da atividade da SERCA (LI et al., 2000; LUO et al., 1996).





**Figura 16.** Regulação da SERCA pelo PLB. O PLB desfosforilado liga-se à SERCA, inibindo o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (painel do meio). O complexo PLB-SERCA é desfeito pela fosforilação do PLB por cinases específicas (painel da esquerda) ou pelo aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (painel da direita). Modificado de Periasamy et al. (2008).

### 1.5 EVENTOS DE $\text{Ca}^{2+}$

Diversos compartimentos celulares que são delimitados por bicamadas lipídicas geralmente apresentam, através de suas membranas, um gradiente de concentração para o  $\text{Ca}^{2+}$ . No sarcoplasma, por exemplo, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é mantida a um nível relativamente baixo (cerca de 150 nM), quando comparada ao meio extracelular ou até mesmo ao lúmen do RS. Um conjunto de fatores trabalha harmonicamente para que a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  seja mantida em níveis reduzidos, incluindo a PMCA e o NCX, ambos presentes na membrana celular, os quais são responsáveis por transportar o  $\text{Ca}^{2+}$  para fora da célula; a SERCA e o transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , que removem o  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcoplasma para o interior do RS e das mitocôndrias, respectivamente (BERS, 2001).

Os canais iônicos e as demais proteínas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando ativos, funcionam como uma fonte desses íons para determinada região (ou domínio) de destino, ou mesmo como uma via de escoamento de volta para o compartimento de origem, criando, com isso, um gradiente de concentração dinâmico de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, que pode sofrer variações de modo discreto e probabilístico ao longo do tempo. Um exemplo dessas variações discretas da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pode ser observado após a abertura dos  $\text{Ca}_v1.2$  presentes no sarcolema, fazendo com que esse íon entre na célula seguindo seu gradiente eletroquímico, aumentando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local. Proteínas transportadoras seletivas para o  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser encontradas na membrana dos diversos compartimentos celulares. É importante citar que tais proteínas, como por exemplo os

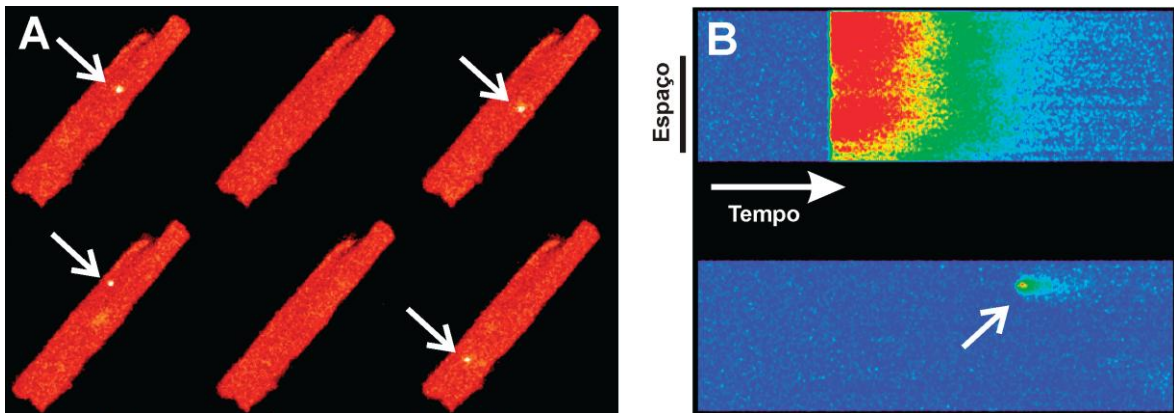
canais para  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ , RyR e  $\text{IP}_3\text{R}$ ), não se encontram permanentemente abertos e permeáveis, tendo sua probabilidade de abertura controlada por diversos fatores, incluindo voltagem, pH, temperatura, estiramento mecânico, ligantes intra e extracelulares, além de espécies reativas de oxigênio (CHENG e LEDERER, 2008).

Quando modificações transitórias da  $[\text{Ca}^{2+}]$  ocorrem em regiões com dimensões restritas, por exemplo as sub-regiões do RS e a fenda diádica (entre outras), as mesmas são denominadas de transientes microscópicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . O transiente microscópico de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser influenciado por diversos fatores, tal como a intensidade do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos seus canais, os tampões intracelulares que tendem a reduzir a  $[\text{Ca}^{2+}]$  livre, a velocidade de difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e no lúmen do RS, além da própria restrição espacial para que a difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorra. Pode-se então definir eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  como qualquer modificação do gradiente da  $[\text{Ca}^{2+}]$ , ocorrida entre os compartimentos celulares, seja essa modificação restrita a um determinado espaço (local) ou não (global) (BERS, 2008).

Normalmente, os eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  são detectados e estudados utilizando-se indicadores fluorescentes sensíveis à essas alterações. Indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  são compostos quimioluminescentes que mudam suas propriedades de absorção e/ou emissão de luz quando estão ligados a esse íon, de tal modo que mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]$  podem ser acompanhadas em tempo real. Existem diversos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  disponíveis no mercado, cada um deles com propriedades físicas e químicas distintas. Eles diferem-se basicamente pelo seu tamanho, pela solubilidade em água, pela afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (medida pela constante de dissociação,  $K_d$ ), pela velocidade com que se ligam e desligam ao  $\text{Ca}^{2+}$  (medidas pelas constantes de velocidade de associação e dissociação,  $K_{on}$  e  $K_{off}$ , respectivamente) e pelos seus espectros de excitação/emissão.

### 1.5.1 Os *sparks* de $\text{Ca}^{2+}$

Utilizando-se o indicador adequado, pode-se observar que, em miócitos cardíacos isolados e não estimulados, os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  são caracterizados por um aumento local (de pelo menos duas vezes o valor basal) na fluorescência emitida pelo indicador, causado por uma elevação transitória da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  numa área restrita do citosol, como demonstrado na figura 17. Os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  apresentam outras características, a saber: 1) o pico de sua fluorescência ocorre em  $\sim 10$  ms e é cessado com outros 20 a 30 ms, 2) estão restritos a uma área no citosol de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$  de diâmetro, ocupando um volume próximo de 8 fL (CHENG et al., 1993; CHENG e LEDERER, 2008).



**Figura 17.** *Sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares. **A)** *Sparks* espontâneos de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidos de cardiomiócitos quiescentes (não estimulados, marcados com seta branca) a partir de imagens bidimensionais (1 *frame*/segundo). **B)** Evento de  $\text{Ca}^{2+}$  global (transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) evocado após um potencial de ação e gravado por linha de varredura (painel superior) e um evento local (*spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneo, painel inferior) ressaltado também por uma seta branca (frequência de aquisição de 500Hz). Ambas imagens foram obtidas pela técnica de microscopia confocal, usando o indicador Fluo-3. Modificado de Cheng e Lederer (2008).

Os *sparks* são eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  que parecem surgir de uma região específica conhecida como unidade liberadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRU, do inglês *calcium release unit*) ou *cluster*. Uma CRU é constituída por um grupo de RyR2 (6 - 20) organizados principalmente na membrana do jRS (BADDELEY et al., 2009). Uma maneira clássica de evocar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  por uma CRU é a própria elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local, uma vez que os RyRs são ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. No AEC do coração, a liberação simultânea de  $\text{Ca}^{2+}$  por diversas CRUs, ou seja, a soma espacial e temporal de vários *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  é, em grande parte, responsável pelo aumento global da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que leva à contração muscular. O principal gatilho responsável por esse processo é o aumento transitório da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local, induzido pela entrada desse íon na célula através dos  $\text{Ca}_v1.2$ , ativados geralmente durante o PA. No miócito cardíaco, a maioria (cerca de 70%) dos  $\text{Ca}_v1.2$  está estrategicamente localizada nos túbulos t, a uma distância muito pequena (em torno de 15 nm) da CRU, o que facilita muito a ocorrência do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  e posteriormente da CICR durante o PA. O conjunto formado pelos  $\text{Ca}_v1.2$ , pela CRU e pelo pequeno espaço que os separam (fenda diádica) é conhecido como *couplon*. Apesar da probabilidade de ocorrência do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  ser drasticamente aumentada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula via  $\text{Ca}_v1.2$  no *couplon*, tais eventos podem ocorrer espontaneamente. Isso porque existe uma pequena probabilidade dos RyR2 abrirem-se ao acaso, mesmo que a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diastólica esteja muito baixa

(BROCHET et al., 2012). Ademais, os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos parecem ser idênticos aos *sparks* espontâneos, apresentando duração e amplitude semelhantes (CHENG e LEDERER, 2008).

Dados da literatura têm mostrado que existe uma correlação direta entre a carga de  $\text{Ca}^{2+}$  (quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado no lúmen) no RS e a frequência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneos. Especula-se que essa elevação na frequência dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  seja um fator compensatório importante para aumentar o vazamento do  $\text{Ca}^{2+}$  presente no lúmen do RS, diminuindo, com isso, o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  para valores próximos aos basais naquela organela. Em outras palavras, quanto maior a carga de  $\text{Ca}^{2+}$  presente no RS, mais sensibilizados ficam os RyRs, facilitando a geração de um evento espontâneo de  $\text{Ca}^{2+}$  (CHENG et al., 1993; ZIMA et al., 2010). A frequência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneos, observados em uma célula cardíaca, varia entre aproximadamente 50 a 5.000 eventos/célula, a cada segundo. Além da carga de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS, outros fatores podem alterar a frequência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , tais como: a qualidade das células cardíacas após o processo de isolamento, a idade do animal e também a sua condição patológica. Algumas drogas (tal como a cafeína) aumentam a sensibilidade dos RyR2 ao  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, o que leva a um aumento transitório na frequência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Outras substâncias, tal como a tetracaína, diminuem a sensibilidade e a probabilidade de abertura dos RyR2 e, com isso, reduzem a frequência desses eventos (CHENG e LEDERER, 2008; GYORKE et al., 1997; RAMAY et al., 2011).

Em teoria, os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  poderiam durar continuamente, uma vez que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos RyR2, presentes na CRU, tenderia a estimular (e sustentar) ainda mais a ativação dos mesmos pelo mecanismo de retroalimentação positiva. Entretanto, os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  são efêmeros, uma vez que surgem e desaparecem em cerca de 30 ms. Apesar dos mecanismos envolvidos na ativação do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  estarem muito bem descritos, aqueles responsáveis por seu término ainda são matéria de grande debate. Alguns possíveis mecanismos propostos para explicar o término dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  são: 1) depleção local dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, 2) atrito estocástico, 3) adaptação/inativação dos RyR2 induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e 4) decaimento da indução (do inglês *induction decay*). Diversas evidências têm mostrado que, durante a ocorrência de um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma depleção parcial e local dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no jRS é também registrada, a qual ocorre em concomitância espacial e temporal com o próprio *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa depleção, denominada de *blink* de  $\text{Ca}^{2+}$  por Brochet et al. (2005), pode ser um dos fatores responsáveis pelo cessamento do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrado no jRS, após esse evento, pode não ser suficiente para sustentar o fluxo desse íon através dos RyR2. Assim sendo, para que o *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  possa ocorrer novamente (na

mesma CRU), em sua plena magnitude, os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do jRS devem, em teoria, ser repostos. Já a hipótese do atrito estocástico tenta explicar o término do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  de modo probabilístico. Essa teoria prevê que após a ocorrência do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  via CICR, existe uma probabilidade de que cada RyR2 ativado se feche aleatoriamente, porém ao mesmo tempo. A probabilidade de que todos RyR2 fechem-se sincronicamente diminui drasticamente com o aumento do número de RyR2 na CRU, de tal modo que é pouco provável que essa hipótese tenha relevância fisiológica (STERN, 1992, NIGLLI, 2011). Na inativação do RyR2 induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do RS, pelo RyR2, exerceria uma retroalimentação negativa, inibindo o canal. Experimentos em cardiomiócitos permeabilizados (FABIATO, 1985) sugeriram que esse tipo de mecanismo pode ser importante para o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sham et al. (1998) também observaram que a inativação do RyR2 era o principal fator responsável pelo encerramento da CICR local. Todavia é importante salientar que resultados de outros grupos indicam que, caso a inativação exista, o seu curso temporal é tão lento (na ordem de segundos) que não poderia explicar a rápida duração de um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  (NIGLLI, 2011). A adaptação é um mecanismo que está relacionado com a redução da probabilidade de abertura dos RyR2 após a exposição a um rápido e sustentado aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , todavia os RyR2 ainda são capazes de ser ativados caso a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcance valores mais elevados. Por também se tratar de um mecanismo de curso temporal lento ( $\tau$  de aproximadamente 1,5 s), é pouco provável que contribua para o término dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições fisiológicas. Vale ressaltar que, tanto a inativação, quanto a adaptação, são mecanismos que foram estudados principalmente em RyR2 artificialmente inseridos em bicamadas lipídicas, o que elimina o controle de proteínas presentes no interior do RS e que, sabidamente, modulam a atividade desses receptores, tais como a calsequestrina (CSQ), junctina e triadina. Deste modo, a real contribuição da inativação/adaptação *in situ* parece ser uma questão em aberto. O mecanismo de decaimento da indução foi recentemente proposto pelo grupo liderado por Cannell (CANNELL et al., 2013; LAVER et al., 2013), o qual usou medidas obtidas de canal unitário (da atividade do RyR2) e novos modelos matemáticos. Esses autores sugerem que um grande fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via um único RyR2 ativado na CRU é capaz de aumentar a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local, induzindo a ativação dos receptores adjacentes e aumentando o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse aumento de efluxo leva a uma depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do jRS (em torno de 80 %), diminuindo gradativamente o efluxo desse íon, o que leva a uma redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  local (na fenda diádica), induzindo a desativação dos RyRs. Esse mecanismo vem ganhando força atualmente (KONG et al., 2013). Apesar da grande diversidade de mecanismos propostos para explicar o término dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , é possível

que, em condições fisiológicas, a finalização desse evento de  $\text{Ca}^{2+}$  seja causada não somente por apenas um deles, mas sim pela soma de todos.

### 1.5.2 Transientes e ondas de $\text{Ca}^{2+}$

De modo diferente dos *sparks* e dos *blinks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais acontecem em regiões espacialmente restritas no cardiomiócito, os transientes e as ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  são eventos globais. No AEC do músculo cardíaco, grande parte do  $\text{Ca}^{2+}$  necessário para ativação dos miofilamentos contráteis é proveniente dos estoques presentes no RS. Para que o  $\text{Ca}^{2+}$  do RS seja eficientemente liberado para o citosol, muitas (se não todas) CRUs devem ser ativadas harmonicamente para, com isso, promover o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  global necessária para que a contração ocorra. Já está bem aceito pela comunidade científica que os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , evocados em cada CRU, são eventos elementares, que quando somados espacial e temporamente, promovem o aumento  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  necessário para o AEC do coração. Como esse aumento é transitório, uma vez que o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico é transportado para fora da célula, ou bombeado de volta para o RS, o mesmo é denominado de transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Uma vez que o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no AEC é função soma dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , fica intuitivo concluir que muitos moduladores da contratilidade cardíaca atuam alterando a frequência, a amplitude e a duração dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos. A exemplo disso, podemos citar os agonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, os quais aumentam a frequência, magnitude e modificam os parâmetros cinéticos dos *sparks* (CHENG e LEDERER, 2008; BROCHET et al., 2005)

Os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser evocados de três modos distintos, a saber: 1) pela abertura de um ou mais  $\text{Ca}_v$  em um *couplon*, 2) pela abertura espontânea dos RyR2 em uma CRU ou 3) pela abertura dos RyR2 em uma CRU em resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por outras CRUs adjacentes. Os dois primeiros mecanismos geram eventos conhecidos como *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  primários, no terceiro mecanismo há a geração de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  secundários, ou seja, *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos pelo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  adjacentes. Dependendo de uma questão de probabilidade de ocorrência dos eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ , pode-se interpretar o fenômeno de sinalização exercida por esse íon segundo uma hierarquia: o *quark* de  $\text{Ca}^{2+}$  é o evento caracterizado pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  por um único RyR2 em uma CRU, sem contudo evocar um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneo. O *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  primário, que é aquele gerado em uma única CRU, pode levar a ativação de CRUs adjacentes formando, com isso, os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  secundários. A partir do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  primário, somado a alguns *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  secundários, observa-se um evento conhecido como *macrospark* de  $\text{Ca}^{2+}$  (ou *spark* composto). Quando os

*sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  primários recrutam um número grande de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  secundários, porém sem evocar uma liberação maciça de  $\text{Ca}^{2+}$  para citosol, tal evento é denominado de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  abortadas (do inglês *aborted waves*). Já as ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorrem quando uma liberação maciça de  $\text{Ca}^{2+}$  é observada (CHENG e LEDERER, 2008).

### 1.5.3 Eventos de $\text{Ca}^{2+}$ e arritmias cardíacas

Apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento dos diversos tipos de arritmias cardíacas, o custo para o tratamento e o número de mortes causadas por essas disfunções continuam elevados, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento. Em pacientes com disfunção estrutural cardíaca, principalmente aquelas resultantes de distúrbios isquêmicos (tal como infarto agudo do miocárdio), as arritmias são a principal causa de morte sendo, portanto, um importante problema de saúde pública. As arritmias são caracterizadas por uma modificação no ritmo cardíaco normal sem justificativa fisiológica, as quais podem ser causadas por: 1) um aumento na excitabilidade da membrana celular, levando ao surgimento de taquicardias induzidas por ganho de automaticidade ou atividade de gatilho; 2) um defeito na formação do impulso elétrico no nodo sinoatrial, o que geralmente causa a bradicardia sinoatrial, pausa sinoatrial ou a síndrome bradi-taquicárdica e 3) uma redução na condução normal célula-célula levando, com isso, a um bloqueio do sistema de condução cardíaco ou a uma redução da propagação do sinal elétrico em determinadas regiões do miocárdio (ROKITA e ANDERSON, 2012).

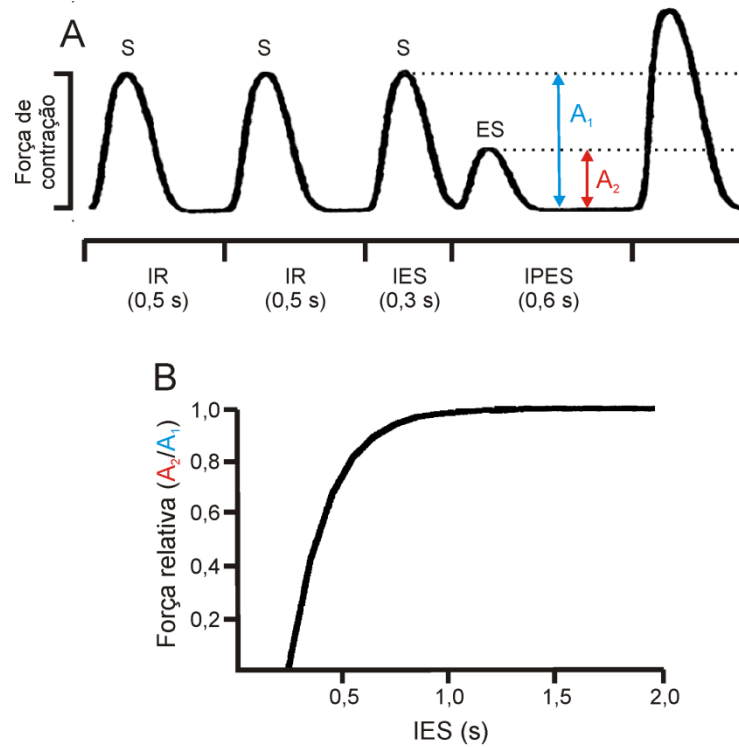
Apesar de existirem diversos tipos de arritmias, muitos daqueles descritos até o momento estão associados a algum tipo de alteração no manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi discutido nos capítulos anteriores que, em condições fisiológicas, o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado durante um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneo não é, na maioria das vezes, capaz de ativar *clusters* adjacentes (ou seja, de iniciar uma CICR maciça), sendo assim, o *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  fica restrito a um pequeno volume citosólico (CHENG et al., 1993). Todavia, em algumas condições especiais, como quando o RS está sobrecarregado com  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado durante um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  isolado pode estimular outros *clusters* adjacentes, induzindo, assim, o surgimento de *sparks* secundários em sua vizinhança, o que gera uma onda de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode se propagar ao longo do cardiomiócito (WILLIAMS et al., 1992; CHENG et al.; 1993, KELLER et al., 2007). Evidências apontam que, após a geração e propagação de uma onda de  $\text{Ca}^{2+}$ , correntes de membrana ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser observadas. Essas correntes parecem exercer um papel relevante na arritmogênese cardíaca (KASS et al., 1978, ZYGMUNT e GIBBONS, 1992; ZYGMUNT et al.,

1998; COLQUHOUN et al., 1981, POGWIZD et al., 2001; SCHLOTTHAUER e BERS, 2000), uma vez que, somadas, levam a geração de uma corrente transitória de entrada ( $I_{Ti}$ , do inglês *transient inward current*), que pode resultar em eventos arritmogênicos conhecidos como pós-despolarização precoce (EAD, do inglês *early afterdepolarization*) e pós-despolarização tardia (DAD, do inglês *delayed afterdepolarization*). Ambas, EAD e DAD, são capazes de gerar aberrações na atividade elétrica cardíaca ou até mesmo o surgimento de extrassístoles. Até onde se sabe, as correntes que contribuem para a  $I_{Ti}$  são: a corrente NCX, a corrente de  $Cl^-$  ativada por  $Ca^{2+}$  e/ou a corrente não seletiva para cátions ativada por  $Ca^{2+}$  (ZYGUMUNT e GIBBONS, 1992; ZYGUMUNT et al., 1998; COLQUHOUN et al. 1981). A primeira delas (corrente NCX) parece ser a principal fonte contribuidora para a  $I_{Ti}$  (POGWIZD et al., 2001; SCHLOTTHAUER e BERS, 2000).

#### 1.5.4 Restituição da amplitude do transiente citosólico de $Ca^{2+}$

Está bem estabelecido na literatura que a atividade contrátil do miocárdio varia em função da frequência cardíaca. Em alguns modelos animais (tais como homem, cabra, coelho, cobaia, furão) essa relação parece ser positiva, ou seja, quanto maior a frequência de estimulação, maior a tensão desenvolvida pelo músculo, quando dentro dos limites fisiológicos de cada modelo experimental. Já os roedores de pequeno porte (tais como rato e camundongo) parecem apresentar uma relação força-frequência inversa. Todavia, em corações estimulados a uma frequência constante, quando uma contração é induzida entre os batimentos regulares (contração extrassistólica), observa-se que a amplitude da mesma é geralmente menor do que a do batimento prévio (ver figura 18). A amplitude da contração extrassistólica será maior quanto mais longo for o intervalo de tempo entre ela e a contração prévia. Esse fenômeno clássico observado no músculo cardíaco é denominado de **restituição mecânica**. A figura 18 também mostra um outro evento clássico da contratilidade miocárdica. Nela pode ser observado que após uma contração prematura (extrassístole, ES), o batimento seguinte é frequentemente potenciado, sendo mais intenso do que os batimentos sistólicos (S) prévios. Esse fenômeno é conhecido como potenciação pós-extrassistólica (PPES) e também é dependente do intervalo extrassistólico (IES). De modo geral quando menor o IES, maior será a potenciação observada na contração seguinte (SEED e WALKER, 1988).

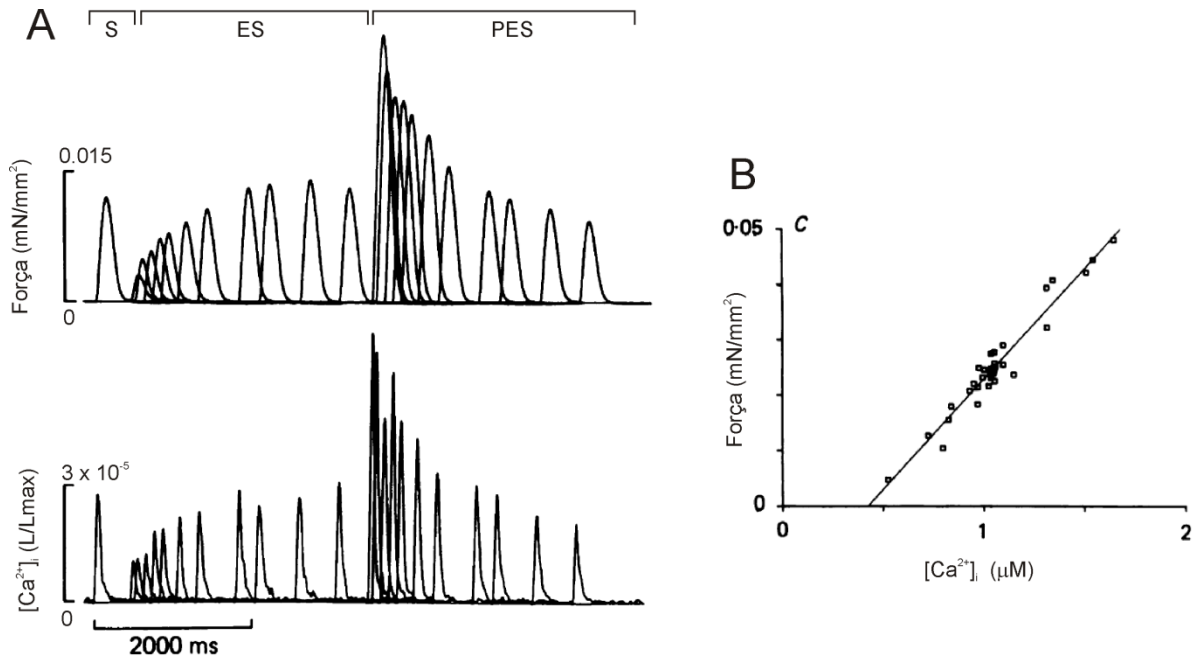




**Figura 18.** Restituição mecânica em músculo ventricular. **A)** Registros de força de contração isométrica mostrando batimentos cardíacos evocados por estímulos elétricos com intervalos regulares (IR) de 0,5 s e uma extrasístole evocada por um intervalo extrasistólico (IES) de 0,3 s. Nela pode ser observado que a amplitude da extrasístole é menor do que o batimento regular. Também pode ser visto que a contração após a extrasístole, evocada por um estímulo de intervalo pós-extrasistólico (IPES) de 0,6 s, é potenciada. **B)** Curva de restituição mecânica mostrando que quanto maior for o IES maior será a amplitude da extrasístole. Modificado de Suzuki et al. (1998).

De acordo com Bers (2001), a força de contração cardíaca possui correlação direta com a  $[Ca^{2+}]_i$ . De fato, diversos trabalhos têm associado a restituição mecânica com o aumento gradativo da liberação de  $Ca^{2+}$  pelo RS, a medida que o intervalo entre os batimentos é aumentado (WIER e YUE, 1986, SEED e WALKER, 1988, HOIT et al., 2000). Deste modo, a restituição da amplitude do transiente intracelular de  $Ca^{2+}$  é um importante fenômeno no controle do funcionamento do coração. Na figura 19 pode ser observado o experimento clássico realizado por Wier e Yue (1986) onde foram medidas simultaneamente a contratilidade do músculo papilar de furão (figura 19A, painel superior) e a  $[Ca^{2+}]_i$  (painel inferior). Nesse experimento o miocárdio foi estimulado a cada 2000 ms (cerca de 20 pulsos) e então uma extrasístole com intervalo variando de 450 a 3000 ms foi induzida. É possível observar com

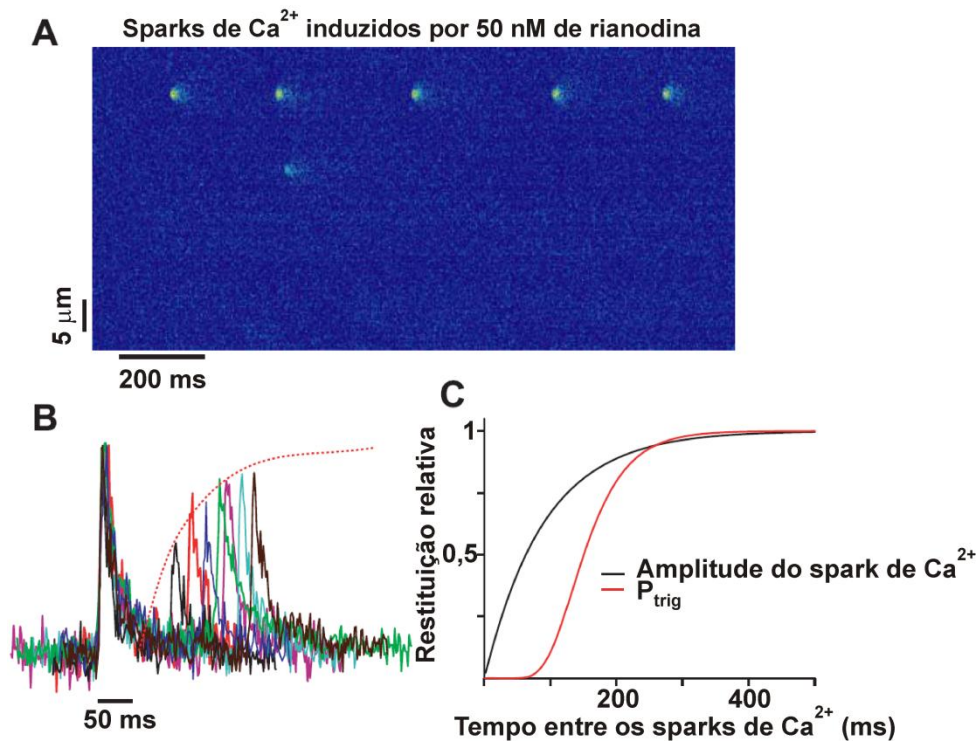
clareza que a força de contração e a amplitude do transiente citoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam a medida que o IES é elevado. Também pode-se notar, como esperado, exatamente o contrário para a PPES. A figura 19C sugere que a força gerada é diretamente proporcional à  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (ver mais detalhes na legenda da figura).



**Figura 19.** Amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  regula a restituição mecânica e potenciação pós-extrassistólica em músculo ventricular. **A)** O painel superior mostra restituição mecânica em músculo papilar observada pela sobreposição dos batimentos extrassistólicos (ES). Nesses mesmos traçados pode ser visto a potenciação dos batimentos pós-extrassistólicos (PES). O batimento regular está descrito como S (de sístole). O painel inferior mostra os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  registrados simultaneamente com a força de contração, a partir da injeção do indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  (aequorina) no tecido cardíaco. **B)** Relação entre a força de contração e a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Modificado de Wier e Yue (1986).

De uma maneira geral a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  tem sido estudada em dois níveis celulares distintos, a saber: local e global. Os estudos ao nível local buscaram investigar a restituição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  nos eventos espacialmente restritos (e nesse caso não propagados) conhecidos como *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ . É importante salientar que existe uma grande barreira metodológica nesse tipo de abordagem experimental, uma vez que a frequência basal de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células cardíacas saudáveis é muito baixa durante a diástole. Para driblar essa dificuldade, Sobie e colaboradores (2005) desenvolveram um

protocolo onde os cardiomiócitos eram expostos à rianodina em baixa concentração (50nM), um agonista dos RyR2 (figura 20A). Nessa condição, a probabilidade de ocorrência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  subsequentes, na mesma CRU, é aumentada drasticamente, permitindo assim o estudo mais aprofundado da restituição desses eventos. Os trabalhos realizados têm sugerido que a amplitude de um *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  depende da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , logo, a restituição da amplitude do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 20B) seria, em teoria, governada pela taxa com a qual os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do jRS são restaurados após um *blink* de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOBIE et al., 2005; RAMAY et al., 2011). Uma outra variável investigada ainda nesses estudos foi a probabilidade de ocorrência de um segundo *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{trig}}$ ) na mesma CRU em função do tempo. Tal como a amplitude do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ , a  $P_{\text{trig}}$  também apresenta refratariedade, entretanto existe um claro atraso (figura 20C) entre as restituições da segunda variável ( $P_{\text{trig}}$ ) e da primeira (amplitude). O mecanismo molecular responsável por essa discrepância ainda não é bem compreendido e continua sendo tema de amplo debate, todavia a participação de uma modulação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  das propriedades de *gating* dos receptores de RyR2 e/ou até mesmo uma possível inativação/adaptação desses receptores durante o *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ , mantendo-os em estado refratário por certo período de tempo, podem estar envolvidos (NIGGLI, 2011).



**Figura 20.** Restituição de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócito ventricular de rato. **A)** Indução de vários *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneos (medidos com fluo 3-AM) na mesma CRU através da exposição da célula a 50 nM de rianodina. **B)** Restituição na amplitude do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ . **C)**

Curvas da restituição da amplitude (em preto) e da probabilidade de ocorrência de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  (em vermelho). Modificado de Sobie et al. (2006).

Ao nível global, ou seja quando há uma liberação maciça de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se ainda mais complexa. Está bem aceito pela comunidade científica que a amplitude do transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$  é, pelo menos em parte, função da soma espacial e temporal de diversos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  individuais (CHENG et al., 1993). Assim sendo, é intuitivo pensar que a amplitude de um transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  subsequente a uma CICR dependa de ambos: 1) da restituição da amplitude de cada *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou em outras palavras, da recuperação da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  e 2) da restituição da probabilidade de ocorrência dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{trig}}$ ). Todavia, os diferentes grupos de pesquisa que buscaram investigar esse tema chegaram a conclusões controversas. Szentesi et al. (2004) demonstraram que a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA é o principal fator limitante no controle da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  e que o estado refratário dos RyR2 em nada contribui para esse processo. Por outro lado estudos mais recentes (BELEVYCH et al., 2012; BRUNELLO et al., 2013) apontam o estado refratário dos RyR2 como um importante mecanismo no controle da restituição da amplitude do transiente macroscópico de  $\text{Ca}^{2+}$ , pelo menos em modelos animais que simulam determinadas cardiopatias. É também importante enfatizar que esses estudos foram realizados em condições bastante afastadas da realidade fisiológica do miocárdio, tal como mantendo as células à temperatura ambiente e/ou manipulando drasticamente o meio intracelular. Esse fato dificulta a interpretação desses resultados, uma vez que as proteínas envolvidas no manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  são sensíveis à variação de temperatura (KORNYEYEV et al., 2010; BERS, 2001). Deste modo, algumas perguntas importantes continuam em aberto, como por exemplo: 1) a restauração dos estoques luminais de  $\text{Ca}^{2+}$  no jRS é o único fator responsável pela restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ? 2) O estado de ativação dos RyR2 de fato contribui para esse processo? O cerne da presente tese de doutorado baseia-se nessas questões centrais.

Até aqui, o que se escreveu visou definir o campo teórico onde o presente trabalho se situa. Pretendeu-se, com isso, descrever as principais estruturas macro e microanatômicas do músculo cardíaco, além de mostrar a complexidade das interações dos diversos mecanismos celulares que levam o coração a realizar os seus eventos elétricos e mecânicos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Recentes achados na literatura vêm mostrando que alterações na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  estão diretamente relacionadas a alguns tipos de arritmias ventriculares, tais como a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) e aquelas associadas à insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. Korneyev et al. (2012), utilizando camundongo *knockout* para a calsequestrina, uma proteína importante para o tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do jRS e também para o controle da sensibilidade do RyR2 ao  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, mostraram que esses animais eram mais susceptíveis a desenvolver CPVT e sugeriram ainda que essa predisposição é causada por uma aceleração da restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . De acordo com Belevych e colaboradores (2012), uma redução na refratariedade da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , via CICR, também está diretamente associada ao surgimento de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontâneos em modelo animal de fibrilação ventricular. Nesse trabalho, os autores observaram que drogas que modulam a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser antiarrítmicas ou pró-arrítmicas. Ambos grupos sugerem que a aceleração da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  pode aumentar a probabilidade de geração e propagação de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , as quais, por sua vez, induziriam o surgimento de eventos arrítmicos. Sendo assim, investigar os mecanismos celulares responsáveis pela restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ajudar a elucidar os eventos envolvidos na gênese de determinadas arritmias e também pode contribuir para a descoberta de novos alvos para o tratamento dessas importantes disfunções. É relevante salientar que, no presente trabalho, os mecanismos celulares envolvidos na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  foram estudados em cardiomiócitos ventriculares de camundongo em condição mais próxima à realidade fisiológica das células cardíacas (por exemplo, controlando-se a temperatura para aproximadamente 36 °C), o que não somente permitiu lançar um olhar mais crítico em relação aos resultados previamente publicados por outros grupos, como também possibilitou contribuir com novos e importantes achados para a área.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi de investigar os mecanismos celulares envolvidos da restituição da amplitude do transiente da  $[Ca^{2+}]_i$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo, mantidos próximos à temperatura fisiológica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo;
- ✓ Avaliar o envolvimento da restituição da duração e da magnitude do potencial de ação no controle da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo;
- ✓ Investigar a participação da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  no controle da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo;
- ✓ Analisar o envolvimento da recaptção do  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo;
- ✓ Investigar se existem mudanças no conteúdo total de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático ao longo do curso temporal da restituição da amplitude do transiente da  $[Ca^{2+}]_i$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo;
- ✓ Avaliar se o estado de ativação dos receptores de rianodina ao  $Ca^{2+}$  citosólico é um fator relevante no controle da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongo.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57Bl6/N machos, com idade entre 8 a 12 semanas. Os animais foram obtidos do Harlan Laboratories, sendo então mantidos no biotério da University of Maryland, respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12 h. Água e ração específica foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos relacionados ao manejo dos animais foram aprovados e realizados em concordância com as normas estabelecidas pelo Institutional Animal Care and Use Committee da University of Maryland e pelo Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicado pelo National Institutes of Health (NIH) dos EUA.

### 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ESTOQUE

Os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA), exceto quando especificado. A solução estoque de probenicida (confeccionada diariamente) foi obtida da seguinte maneira: 356,7 mg da droga e 119,1 mg de HEPES foram solubilizados em 2,5 ml de NaOH 1 M. Posteriormente 0,9 ml de HCl 1 M foi adicionado a solução e então o pH foi regulado para 7,4 (com HCl 1 M). O volume final foi ajustado para 5 mL com a adição de água ultrapura, de tal modo que a concentração final de probenicida alcançasse 250 mM. Tetrodotoxina (Biotium Inc., EUA, livre de tampão citrato) foi solubilizada em água ultrapura para uma concentração final de 3 mM (estocada a -20 °C). Tetracaína foi diluída diariamente em água ultrapura para a concentração final de 166 mM. Cafeína (Baker Chemical Co, EUA) era solubilizada em solução de Tyrode poucos minutos antes dos experimentos. ( $\pm$ )-blebbistatin (25 mM, Calbiochem, EUA), tapsigargina (10 mM) e o ácido ciclopiazônico (20 mM) foram solubilizados em DMSO e estocados a -20 °C.

### 4.3 ISOLAMENTO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS

Os cardiomiócitos oriundos dos ventrículos esquerdo e direito foram isolados de acordo com o método previamente descrito por Shioya (2007), com poucas adaptações, tal como descrito adiante. Após a indução de anestesia por administração intraperitoneal de uma elevada dose de pentobarbital (100 mg/kg), o coração foi rapidamente removido, canulado e montado em um sistema de Langendorff de pressão de perfusão (~73 mmHg) e temperatura (37 °C)

constantes, onde o mesmo foi perfundido retrogradamente (por 5 minutos) com uma solução de isolamento celular (CIB, do inglês *cell isolation buffer*), previamente filtrada através de uma membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Alemanha), livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e contendo, em mM, os seguintes componentes: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5  $\text{MgCl}_2$ ; 0,33  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 22 glicose; 25 HEPES e 0,4 EGTA (pH ajustado para 7,4 adicionando-se solução de NaOH a 1,0 M). Após isso, o coração foi perfundido por 4 minutos com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,8 mg/mL de colagenase do tipo II; 0,06 mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,06 mg/mL de tripsina. O coração foi então removido do sistema de Langendorff, os ventrículos foram isolados e cortados em pequenos pedaços, sendo rapidamente transferidos para uma solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade de enzimas citadas acima, porém acrescida com 0,7 mM de  $\text{CaCl}_2$ , os quais permaneceram por mais 5 minutos para digestão adicional a 37 °C. Após essa etapa, as células foram dissociadas por agitação mecânica (com ajuda de uma pipeta de Pasteur), sendo a solução filtrada em malha de 200  $\mu\text{m}$  e centrifugada a 500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante, que continha principalmente as células mortas e os detritos de tecidos não digeridos, foi removido e a massa decantada foi suspensa em solução CIB acrescida de 1,3 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 2 mg/mL de albumina sérica bovina, onde permaneceram por mais 10 minutos. Finalmente, a solução foi novamente centrifugada e as células ressuspensas em solução de Tyrode contendo (em mM): 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5  $\text{MgCl}_2$ ; 0,33  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8  $\text{CaCl}_2$  (pH ajustado para 7,4 adicionando-se solução de NaOH a 1,0 M). Somente células quiescentes, com formato de bastão e apresentando visível fração de encurtamento (acima de 5%) após estimulação de campo foram selecionadas. Os cardiomiócitos isolados foram usados por até 8 h (tempo contado a partir da suspensão das células em solução de Tyrode).

#### **4.4 MARCAÇÃO DOS CARDIOMIÓCIOS COM OS INDICADORES DE $\text{Ca}^{2+}$**

Para medir os transientes citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ , evocados por estimulação de campo, as células foram marcadas com Fluo-5F através da incubação com a sua forma acetoximetil (AM) ester, por 20 minutos (temperatura ambiente), em solução de Tyrode suplementada com 1 mg/mL de albumina sérica bovina. Os cardiomiócitos foram então centrifugados e ressuspensos em solução de Tyrode, onde permaneceram por mais 10 minutos para desesterificação da forma AM ester. A solução estoque de 2 mM de Fluo5-F AM ester foi confeccionada em solução Pluronic F-127 à 10 %. Desse modo, 1  $\mu\text{L}$  da solução estoque foi adicionado a cada 1 mL da suspensão de células a fim de alcançar a concentração de 2  $\mu\text{M}$  utilizada na marcação. Para



medir os transientes citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  nos ensaios eletrofisiológicos, foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do sal Fluo5-F 5K (2 mM, solubilizado em água) complementando o volume final de 300  $\mu\text{L}$  de solução interna, logo, a concentração de Fluo5-F 5K utilizada nesses experimentos foi de 50  $\mu\text{M}$ .

Para acessar diretamente as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do RS, os cardiomiócitos foram marcados com 7,5  $\mu\text{M}$  do indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa afinidade (Mag-Fluo-4 AM) por 30 minutos em solução de CIB contendo 0,2 mM de  $\text{CaCl}_2$  a 30 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em CIB, contendo 0,9 mM de  $\text{CaCl}_2$ , à temperatura ambiente, onde permaneceram até o início dos experimentos (cerca de 15 minutos). Antes de iniciar as medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, as células foram mantidas em solução de Tyrode à 37 °C, por pelo menos 15 minutos, para que o excesso de Mag-Fluo-4 fosse removido do citosol. A solução estoque de 2 mM de Mag-Fluo-4 AM ester foi confeccionada em solução Pluronic F-127 à 10 %.

#### 4.5 MEDIDAS DOS TRANSIENTES DE $\text{Ca}^{2+}$ E FRAÇÃO DE ENCURTAMENTO CELULAR

As mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ou  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  foram medidas através do método de microscopia confocal, lançando-se mão do sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Alemanha). Para tanto, as células foram dispostas em lamínula coberta com laminina (confeccionada no mesmo dia dos experimentos), onde foram excitadas por luz monocromática de 488 nm obtida através de laser de argônio. A luz emitida durante a interação do fluoróforo com o  $\text{Ca}^{2+}$  foi transmitida para um fotomultiplicador, após passar por um filtro passa-alta de 505 nm. A linha de varredura (fixada em 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo transversal dos cardiomiócitos, evitando-se as regiões nucleares. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  e a resolução temporal foi de 1,92 ms/linha ou 7,68ms/linha para as medidas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ou  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , respectivamente. O tamanho do *pinhole* foi ajustado para valores entre 1 e 2,7  $\mu\text{m}$ . As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência de basal ( $F_0$ ), de tal modo que alterações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estão expressas como  $F/F_0$  ou  $\Delta F/F_0$ , onde  $\Delta F = F - F_0$ . Os dados foram registrados com a ajuda do *software* Zen 2009 (Zeiss, Alemanha). A fração de encurtamento celular foi medida *offline*, usando as imagens de fluorescência obtidas por linha de varredura, tal como descrito previamente por Hagen et al. (2012).

#### 4.6 ELETROFISIOLOGIA

As células foram estudadas na platina de um microscópio invertido (Axiovert 100 M, Zeiss, Alemanha). O conjunto foi montado sobre uma mesa pneumática anti-vibração (TMC, EUA). Um micromanipulador elétrico foi usado para movimentar o eletrodo responsável pelo registro das correntes da membrana celular. Tais correntes foram estudadas com a ajuda de um amplificador (Axopatch 200B, Molecular Device, EUA) controlado pelo *software* pCLAMP 8 (Molecular Devices, EUA). As correntes foram filtradas por um filtro passa-baixa a 5 kHz, convertidas em sinais digitais na frequência de 5 ou 10 kHz e armazenadas em computador para análise *offline*. Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos. As resistências em série foram compensadas em pelo menos 40 %. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série acima de 10 M $\Omega$  não foram utilizadas nos experimentos. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador pessoal usando-se o *software* Clampfit 10 (Molecular Devices, EUA). As pipetas de borosilicato (WPI, EUA), foram confeccionadas por meio de um estirador horizontal (Sutter, P-97, EUA). As mesmas foram preenchidas com solução salina (ver composição no item "protocolo experimentais") e suas resistências variaram de 1,5 a 2,5 M $\Omega$ .

Um fino fio de Ag/AgCl foi introduzido na pipeta preenchida com solução interna e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (*headstage*) que, por sua vez, estava conectado à entrada do amplificador. As células foram banhadas com solução de Tyrode (ver composição no subitem "Isolamento dos miócitos cardíacos"). Em alguns experimentos, adicionou-se tetrodotoxina à solução externa para uma concentração final de 100  $\mu$ M, com o intuito de bloquear as correntes de Na<sup>+</sup>. Todas as soluções foram filtradas em membranas com porosidade de 0,22  $\mu$ m (Millipore, EUA).

Os "gigaseles" foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta. A resistência elétrica da sonda foi monitorada pelo *software* pCLAMP. O transiente capacitivo da pipeta foi eliminado eletronicamente e a configuração *whole-cell* foi obtida com a ajuda de uma sucção mais vigorosa, a qual permitiu romper o pequeno fragmento de membrana que separava a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicou a formação do *whole-cell*. Após alcançada essa configuração foi esperado um tempo de 3 a 5 minutos para assegurar a completa diálise da solução interna no meio intracelular.

## 4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.7.1 Ativação dos transientes de $\text{Ca}^{2+}$

Os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  foram induzidos por: 1) estimulação de campo (39 V, 2ms) através de eletrodos de platina dispostos ao longo do sistema de perfusão (estimulador celular MyoPacer, IonOptix, EUA) ou 2) pulsos de voltagem ou injeção de corrente, ambos aplicados com o uso da técnica de *patch clamp* na sua configuração *whole-cell*. Todos os experimentos foram realizados em células perfundidas (~1 mL/min) com solução de Tyrode aquecida entre 35 a 37 °C. O aquecimento foi realizado com o auxílio de uma resistência montada em um sistema de serpentina metálica por onde a solução de perfusão percorria, através de um tubo de plástico, antes de alcançar as células. A temperatura do resistor, e conseqüentemente da solução de Tyrode, foi controlada através quantidade de corrente injetada no circuito por meio de uma fonte de corrente contínua, sendo periodicamente monitorada com o uso de um termistor. O protocolo de pulsos, quer para os experimentos com estimulação de campo, quer para aqueles com uso da técnica de *patch clamp*, foi programado com a ajuda do *software* Clampex 8.0 (Molecular Device, EUA).

### 4.7.2 Restituição da amplitude do transiente citosólico de $\text{Ca}^{2+}$

Antes de iniciar o registro de 3 transientes em sucessão, 9 pulsos (aqui chamados de pré-pulsos, 2 Hz) foram aplicados para que o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS alcançasse um estado de equilíbrio. Os estímulos responsáveis por evocar os transientes registrados, após a sequência de pré-pulsos, foram, apenas para fins didáticos, nomeados cronologicamente de  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ . O intervalo inicial entre esses estímulos foi de 500 ms. Para a obtenção da curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , o intervalo entre  $S_1$  e  $S_2$  foi gradativamente reduzido a passos de 50 ms em cada repetição experimental. Foram então medidas as amplitudes dos transientes evocados pelos estímulos  $S_1$  ( $A_1$ ) e  $S_2$  ( $A_2$ ). Após isso, a amplitude relativa segundo transiente ( $A_2/A_1$ ) foi plotada em função do intervalo entre os estímulos ( $S_2 - S_1$ ).

### 4.7.3 Restituição da amplitude da corrente de $\text{Ca}^{2+}$ do tipo L

De modo semelhante ao protocolo de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foi normalizado através da aplicação de 9 pré-pulsos, a uma

frequência constante de 2 Hz, sendo posteriormente registrada a  $I_{Ca,L}$  evocada por 2 pulsos despolarizantes em sequência. Os pulsos foram nomeados de  $P_1$  e  $P_2$ , com intervalo de 500 ms entre si. Posteriormente, o intervalo entre  $P_1$  e  $P_2$  foi gradativamente reduzido a passos de 50 ms, em cada repetição experimental. Para se obter as curvas de restituição da  $I_{Ca,L}$ , foram medidas a amplitude da  $I_{Ca,L}$  evocada pelos pulsos  $P_1$  ( $A_1$ ) e  $P_2$  ( $A_2$ ). Após isso, a amplitude relativa da segunda corrente ( $A_2/A_1$ ) foi plotada em função do intervalo de tempo entre os pulsos. Os transientes de  $Ca^{2+}$  foram registrados simultaneamente à  $I_{Ca,L}$ .

A solução de pipeta utilizada nesses experimentos teve a seguinte composição (em mM): 110 CsOH, 110 ácido aspártico, 10 NaCl, 20 cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl), 10 HEPES, 5 ATP-Mg e 0,05 Fluo5-F 5K (pH ajustado para 7,2 adicionando-se CsOH a 1,0 M). O potencial de junção foi estimado (aproximadamente -10 mV) com a ajuda do *software* Clampex 8.0 (Molecular Device, EUA), de modo que todos os valores de potencial de membrana, aqui apresentados, já se encontram corrigidos. As células foram mantidas a um potencial de *holding* de -80 ou -50 mV. Para evocar a  $I_{Ca,L}$  sem que se observasse uma corrente de calda ao fim do pulso despolarizante, as células foram rapidamente despolarizadas para 0 mV, por 15 ms e, logo em seguida, uma rampa de 15 ms retornava o potencial de membrana para os valores de *holding*. Em alguns experimentos, cujo o potencial de *holding* era mantido a -80 mV, foi utilizado tetrodotoxina (100  $\mu$ M) com o intuito de bloquear as correntes de  $Na^+$  nos cardiomiócitos.

#### 4.7.4 Restituição da amplitude e duração do potencial de ação

Para realização do protocolo de restituição da amplitude e duração do PA, o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS foi normalizado através da aplicação de 9 pré-pulsos à uma frequência constante de 2 Hz, sendo posteriormente registrados 2 PAs em sequência, todos eles estimulados pela injeção de 2nA de corrente, por 2ms. Esses estímulos foram nomeados de  $S_1$  e  $S_2$ , com intervalo de 500 ms entre si. Posteriormente, o intervalo entre  $S_1$  e  $S_2$  foi gradativamente reduzido a passos de 50 ou 10 ms em cada repetição experimental. Para se obter as curvas de restituição da amplitude e duração do PA, essas variáveis foram medidas em ambos, no primeiro e no segundo PA. Após isso, a amplitude relativa e o tempo necessário para que 50 % da repolarização fosse alcançada ( $RT_{50}$ ) foram plotadas em função do intervalo de tempo entre os PAs. Os transientes de  $Ca^{2+}$  foram registrados simultaneamente.

A solução de pipeta utilizada nesses experimentos teve a seguinte composição (em mM): 11 KCl, 120 K-aspartato; 5 NaCl; 0,5  $MgCl_2$ ; 10 HEPES, 5 ATP-Mg; 0,5 Mg-GTP; 0,05 EGTA e 0,05 Fluo5-F 5K (pH ajustado para 7,2 adicionando-se KOH a 1,0 M). As células foram

mantidas a um potencial de *holding* de -90 mV, através da injeção contínua de -50 a -150 pA. A amplitude e a duração do PA foram analisadas com o auxílio do *software* Clampfit 10 (Molecular Devices, EUA). O potencial de junção foi estimado (aproximadamente -10 mV) com a ajuda do *software* Clampex 8.0 (Molecular Device, EUA), sendo levado em consideração na construção do protocolo experimental.

#### 4.7.5 Medida da carga total de $\text{Ca}^{2+}$ no retículo sarcoplasmático

Como previamente descrito por Varro et al. (1993), a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foi estimada pela integração da área da corrente de NCX, evocada durante a rápida exposição das células à solução de Tyrode contendo 10 mM de cafeína, por 10 s. As células foram rapidamente expostas à cafeína através de uma pipeta de perfusão controlada por uma bomba pneumática (WPI, EUA), que por sua vez era comandada pelo *software* Clampex 8.0. Somente foram utilizadas células que apresentavam valores de carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  semelhantes em pelo menos 2 aplicações consecutivas, separadas por um intervalo de 3 minutos entre si. Todas as medidas de NCX foram realizadas com a mesma solução interna utilizada para registro da  $I_{\text{Ca,L}}$ . Em todos experimentos uma sequência de pré-pulsos (9 pulsos, 2Hz) foi aplicada com o intuito de manter os níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  em um estado de equilíbrio. 500 ms após o último pré-pulso as correntes de NCX eram evocadas e registradas a -80 mV. A integração da área das correntes foi realizada com o auxílio do *software* Clampfix 10.0 (Molecular Device, USA). Os valores de carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  por litro de citosol.

#### 4.7.6 Efeito de inibidores da SERCA na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$

Foram utilizados tapsigargina (60 nM) ou ácido ciclopiazônico (CPA, 2 $\mu\text{M}$ ), ambos bloqueadores clássicos e seletivos da SERCA, para avaliar o efeito da redução da recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS no curso temporal da restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em experimentos de estimulação de campo. Ambas drogas foram solubilizadas em DMSO, sendo que a concentração final desse último não ultrapassou 0,01 % nos experimentos. A mesma quantidade de DMSO foi adicionada à solução controle para evitar erros na interpretação dos dados. Nesse protocolo também foi avaliado o efeito dessas drogas no pico e no decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, foram também investigadas as alterações na carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS induzidas por tais substâncias.

#### 4.7.7 Efeito de moduladores dos RyRs na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$

Foram utilizadas cafeína e tetracaína como ferramentas farmacológicas para aumentar ou reduzir, respectivamente, o estado de ativação dos RyRs. Deste modo, protocolos de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foram realizados na presença e na ausência dessas drogas. O efeito de 100 ou 500  $\mu\text{M}$  de cafeína foi estudado em células sob estimulação de campo na ausência ou na presença dessa droga (entre 2 a 4 minutos de exposição). O efeito da tetracaína foi investigado em células submetidas à estimulação através da pipeta de *patch clamp*, na ausência e na presença de 100  $\mu\text{M}$  da mesma. Essas drogas foram solubilizadas em água ultrapura momentos antes dos experimentos. Nesse protocolo, também foram avaliados o efeito dessas drogas no pico e no decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, foram investigadas as alterações no conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS induzidas por tais substâncias.

#### 4.7.8 Papel do conteúdo total de $\text{Ca}^{2+}$ do retículo sarcoplasmático na restituição da amplitude do transiente de $\text{Ca}^{2+}$

Neste protocolo buscou-se avaliar se a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS é intensamente alterada após uma CICR. Para tanto, o conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foi medido em 3 diferentes intervalos de tempo após um transiente induzido. Praticamente o mesmo protocolo empregado no subitem "Medida da carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático" foi utilizado, a única diferença aqui baseou-se na rápida perfusão da solução de Tyrode contendo cafeína a 10 mM em três diferentes intervalos de tempo após uma CICR, a saber: 500, 200 ou 110 ms, respeitando um intervalo de 3 minutos entre cada repetição experimental a fim de restaurar plenamente os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. É válido ressaltar que nesse trabalho foi observado um atraso de aproximadamente 70 ms entre o início da perfusão da solução contendo cafeína e o início da  $I_{\text{NCX}}$ . Esse atraso foi corrigido durante a execução do protocolo. Somente foram utilizadas células que mostravam valores de carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  semelhantes em pelo menos 2 aplicações consecutivas, separadas por um intervalo de 3 minutos.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (epm). Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste t de Student da sua forma pareada ou não-pareada a depender do caso. As comparações entre os diversos pontos experimentais das curvas de

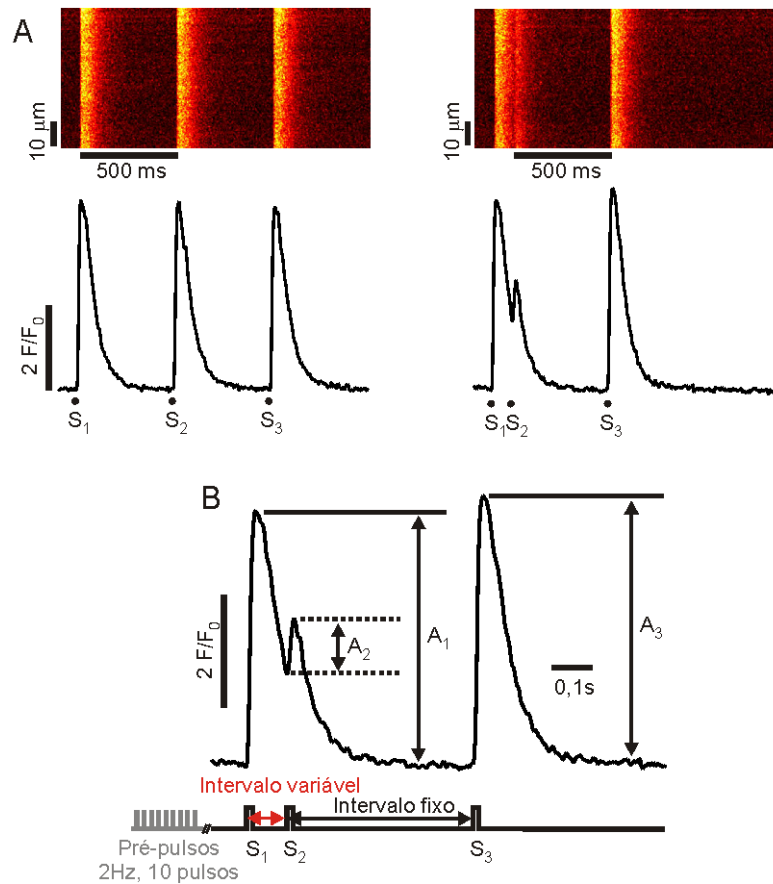
restituição foram feitas com o teste de análise da variância (ANOVA) a um critério de classificação (*one way*). Foi aceito como diferença estatisticamente significativa qualquer comparação que resultou em um  $p < 0,05$ . Foram usados os *softwares* ImageJ versão 1.44p (NIH, EUA) para análise das imagens, Clampfit 10.0 (Molecular Device, EUA) para as análises eletrofisiológicas e dos transiente de  $Ca^{2+}$ , Graph Pad Prism 5 (GraphPad, EUA) para confecção dos gráficos e para os ajustes usando regressão linear e não linear. O Excel (versão 2007, Microsoft, EUA) e o Graph Pad Prism 5 foram utilizados para a realização das análises estatísticas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE $\text{Ca}^{2+}$ EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES

Todos os registros de transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  foram realizados após uma sequência de estímulos (9 pré-pulsos, 2Hz) utilizada para que o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS alcançasse o seu estado de equilíbrio. A estabilidade da fração de recirculação do  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pôde ser constatada pela ausência de alternância ou de redução contínua do pico de três transientes registrados consecutivamente e a um intervalo fixo. Deste modo, a figura 21A (painel esquerdo) mostra os registros de fluorescência (painel superior) e a razão entre  $F$  e  $F_0$  (painel inferior) de três transientes evocados por estímulos de campo nomeados de  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ , todos com um intervalo de 500 ms entre si. No painel direito ainda dessa figura, pode-se observar que o intervalo entre os estímulos  $S_1$  e  $S_2$  foi reduzido para 100 ms. Essa figura ilustra que a redução do intervalo de tempo entre os estímulos exerce um efeito drástico na amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  evocado por  $S_2$ . O método utilizado para a análise da amplitude de cada transiente pode ser observado da figura 21B.

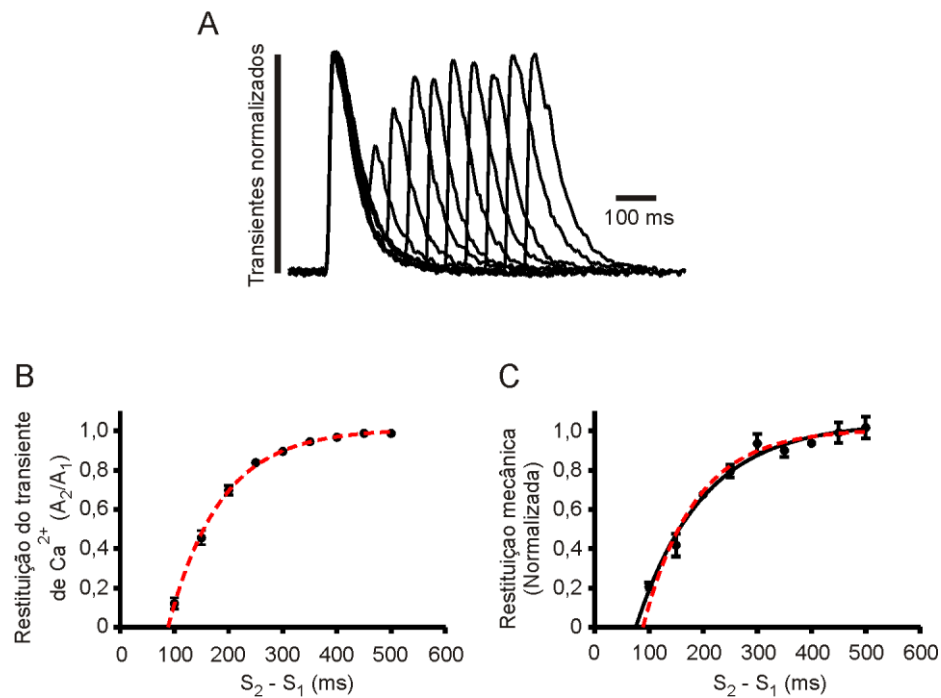




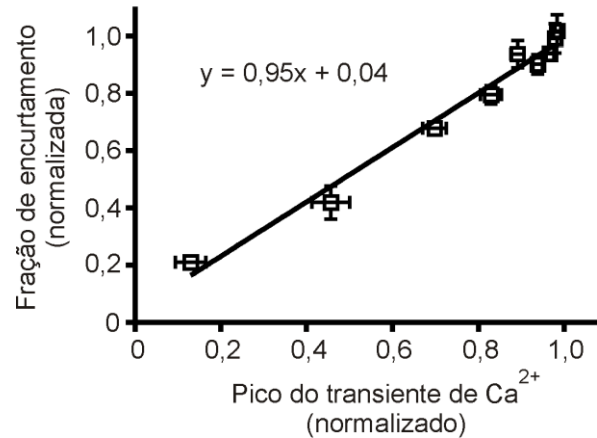
**Figura 21.** Transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidos de cardiomiócitos ventriculares marcados com Fluo5-F. **A)** Sequência de três transientes disparados por estimulação de campo ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) com intervalo fixo de 500 ms (painel esquerdo). Repetição do protocolo com intervalo entre  $S_1$  e  $S_2$  reduzido para 100 ms (painel direito). **B)** Método usado para medir as amplitudes dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (painel superior) e protocolo de pulsos (painel inferior). A célula foi marcada com Fluo5-F, estimulada à 2Hz (39 V, 2ms) e mantida à 36 °C.

Para obtenção das curvas de restituição mecânica e da restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , o intervalo entre  $S_1$  e  $S_2$  foi gradativamente reduzido, a passos de 50 ms em cada repetição experimental, até que o tempo entre os dois estímulos alcançasse o valor mínimo de 50 ms. Ao se sobrepor os transientes obtidos com esse protocolo (figura 22A), pôde-se observar que a amplitude do segundo transiente ( $A_2$ ) aumenta a medida que ele se afasta do primeiro ( $A_1$ ). A figura 22B ilustra os valores médios da amplitude relativa do segundo transiente ( $A_2/A_1$ ) em função do intervalo de tempo entre os estímulos  $S_1$  e  $S_2$  ( $S_2-S_1$ ). A curva vermelha, mostrada nesse gráfico, foi ajustada com uso de equação monoexponencial, o que permitiu medir a constante de tempo ( $\tau$ ) com a qual a amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  restitui-

se ( $\tau = 188,2 \pm 7,2$  ms,  $n=13$ ). Tal como esperado, a restituição mecânica ( $\tau=198,7 \pm 15$  ms,  $n=3$ ,  $p > 0,05$ ), inferida pela fração de encurtamento celular, acompanhou o curso temporal observado na restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa associação fica clara quando a curva de restituição mecânica (em preto) e aquela referente à amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (em vermelho) são sobrepostas, tal como ressaltado na figura 22C. Quando analisada por regressão linear, a fração de encurtamento celular mostrou-se fortemente dependente da amplitude normalizada do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $r^2 = 0,9385$ ;  $p < 0,05$ ; ver figura 23). Desse modo, pode-se concluir que os cardiomiócitos ventriculares de camundongo apresentam uma clara restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a qual por sua vez governa a restituição mecânica nessas células.



**Figura 22.** Restituições mecânica e da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** Traçados normalizados e sobrepostos mostrando restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  com o aumento do intervalo entre os pulsos. **B)** Curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=13$ ) e **C)** Curva de restituição mecânica estimada pela fração de encurtamento celular (em preto,  $n=3$ ) e a curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (em vermelho) obtida de **B**. As células foram marcadas com Fluo5-F AM, estimuladas à 2Hz (39 V, 2ms) e mantidas à  $36 \pm 1$  °C.

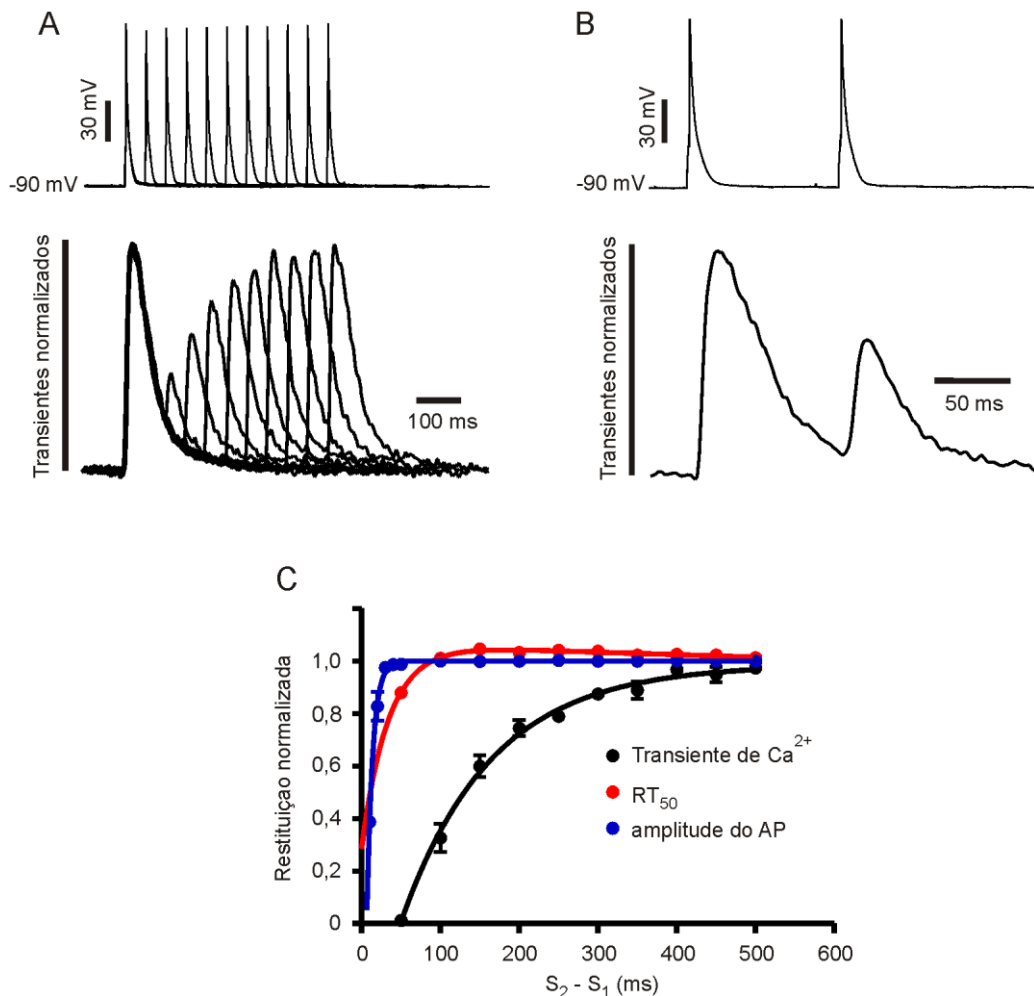


**Figura 23.** Relação entre a fração de encurtamento celular e o pico do transiente de Ca<sup>2+</sup>. A análise por regressão linear mostra uma forte correlação entre essas duas variáveis ( $r^2 = 0,9385$ ;  $p < 0,05$ ). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.

## 5.2 A RESTITUIÇÃO ELÉTRICA NÃO EXPLICA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE Ca<sup>2+</sup>

Um fator que deve ser levado em consideração durante a restituição da amplitude do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup> é a restituição elétrica observada nas células cardíacas, a qual está relacionada com a recuperação gradual da duração e/ou amplitude do PA a medida que o intervalo extrassistólico aumenta. É importante salientar que a amplitude e a duração do PA podem influenciar diretamente o amplitude e a duração da I<sub>Ca,L</sub>, que por sua vez é o principal gatilho para a CICR no coração (BERS, 2001). Para avaliar se a restituição elétrica contribui para a refratariedade do transiente de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos ventriculares mantidos à temperatura fisiológica, de modo semelhante aos experimentos de estimulação de campo, uma sequência de pré-pulsos foi aplicada para que o conteúdo de Ca<sup>2+</sup> do RS alcançasse o estado estacionário. Logo em seguida, dois PAs foram induzidos através da injeção de corrente de 2nA por 2ms (potencial de repouso foi mantido a -90 mV) com um intervalo de 500 ms entre si. Para obtenção da curva de restituição da amplitude e duração do PA, o intervalo extrassistólico foi reduzido a passos de 50 ms em cada repetição experimental. Para medir a restituição elétrica em intervalos menores do que 50 ms, a partir desse valor o intervalo interestímulo foi reduzido a passos de 10 ms. Os transientes foram gravados simultaneamente através da técnica de microscopia confocal. Como pode ser observado na figura 24A, tanto a amplitude, quanto a duração do PA (medida pelo RT<sub>50</sub>, ver métodos), recuperam-se mais rapidamente do que a

amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  após uma CICR. A figura 24B mostra dois PAs separados por um intervalo de 150 ms e seus respectivos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nela fica ainda mais claro que a completa recuperação da amplitude do PA não é suficiente para abolir a refratariedade do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A figura 24C mostra todas as curvas plotadas em um único gráfico. A amplitude do PA é restaurada apresentando um  $\tau = 13,9 \pm 0,4$  ms ( $n=4$ ), já o valor do  $\tau$  para a restituição do  $\text{RT}_{50}$  foi igual a  $29,8 \pm 1,4$  ms ( $n=5$ ). Ambos valores foram significativamente diferentes do  $\tau$  relativo à refratariedade do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nesses experimentos ( $161,4 \pm 12,5$  ms;  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ). Esses dados indicam que a restituição elétrica antecede a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo, provavelmente não contribuindo para o curso temporal mais lento observado nesse último evento.

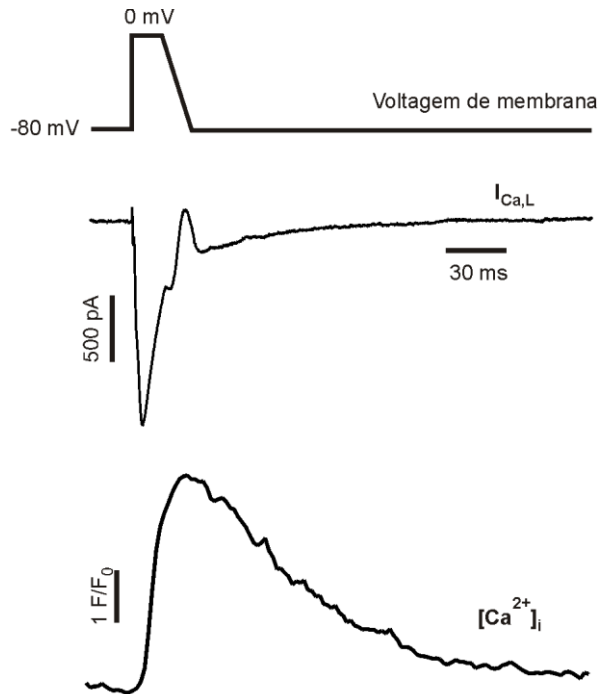


**Figura 24.** A restituição elétrica e a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** Painel superior mostra a sobreposição dos PAs obtidos por protocolo de dois pulsos. O painel inferior ilustra os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados

pelos respectivos PAs. **B)** PAs separados por um intervalo de 150 ms e os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  por eles evocados. **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  (linha preta), do  $\text{RT}_{50}$  (linha vermelha) e da amplitude do PA (linha azul) ( $n=4-5$ ). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.

### 5.3 A RECUPERAÇÃO DA INATIVAÇÃO DA $I_{\text{Ca,L}}$ PRECEDE A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE $\text{Ca}^{2+}$

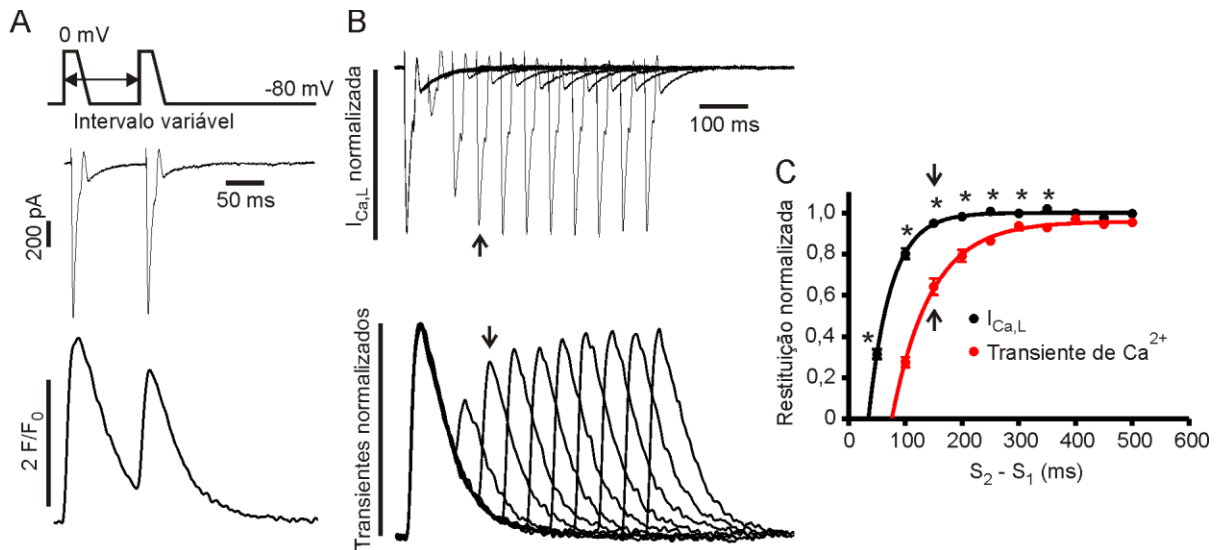
Estudos prévios têm mostrado que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, via CICR, depende da amplitude da  $I_{\text{Ca,L}}$  evocada durante o PA cardíaco (BASSANI *et al.*, 1995). É amplamente aceito que após a ativação da  $I_{\text{Ca,L}}$ , a mesma sofre inativação por mecanismos dependentes de voltagem e de  $\text{Ca}^{2+}$  (BENITAH, 2010; HILLE, 2002). A amplitude da  $I_{\text{Ca,L}}$  evocada no PA subsequente é dependente do montante de  $\text{Ca}_v1.2$  que se recuperara do estado de inativação, mostrando-se novamente disponível para ser ativado. Por essa razão, foi investigado se o curso temporal da recuperação da inativação  $I_{\text{Ca,L}}$  poderia explicar a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo mantidos à temperatura e potencial de repouso fisiológicos. Para tanto, com o auxílio da técnica de *patch clamp*, as células foram mantidas a um potencial de *holding* de -80 mV, sendo perfundidas com solução de Tyrode normal, acrescida de 100  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (para bloquear a  $I_{\text{Na}}$ ) e aquecida à  $36 \pm 1$  °C. A figura 25 mostra o protocolo de pulso, um traçado típico da  $I_{\text{Ca,L}}$  e o transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado pela mesma.



**Figura 25.** Traçados representativos do protocolo de pulso (painel superior), da  $I_{Ca,L}$  (painel do meio) e do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  (painel inferior) gravados simultaneamente. (Potencial de *holding* = -80 mV. Tetrodotoxina (100  $\mu$ M) foi adicionada à solução de Tyrode para bloquear a  $I_{Na}$ . Temperatura = 36 °C.

De modo semelhante aos experimentos de estimulação de campo, uma sequência de pré-pulsos foi aplicada para que o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS alcançasse o estado estacionário, logo em seguida dois pulsos despolarizantes foram aplicados (de -80 mV para 0 mV, ver detalhes na seção de métodos) com um intervalo de 500 ms entre si. Para obtenção da curva de recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$ , o intervalo interestímulo foi reduzido a passos de 50 ms em cada repetição experimental. Os transientes evocados pela  $I_{Ca,L}$  foram simultaneamente registrados com o uso da técnica de microscopia confocal. A figura 26A mostra o protocolo de pulso (painel superior), as  $I_{Ca,L}$  evocadas por dois estímulos com intervalo de 150 ms entre si (painel do meio) e os seus respectivos transientes citosólicos de  $Ca^{2+}$ . Nela pode ser observado que com 150 ms após o primeiro pulso, a  $I_{Ca,L}$  está completamente restituída, enquanto que a amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  recuperou-se apenas parcialmente. O curso temporal da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  (painel superior) e da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  (painel inferior) pode ser visto na figura 26B. A recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  ( $\tau = 74,7 \pm 1,9$  ms;  $n = 5$ ) é significativamente mais rápida do que o curso temporal da

restituição da amplitude do transiente  $\text{Ca}^{2+}$  nessas condições ( $\tau = 145 \pm 5,2 \text{ ms}$ ;  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), o que pode ser visualizado quando essas duas curvas são plotadas no mesmo gráfico (figura 26C). As setas indicam o tempo no qual recuperação/inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  é plena. Esses resultados mostram que mesmo após a completa recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$ , o transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda continua mantendo-se refratário, sugerindo que outro mecanismo esteja envolvido nesse processo.

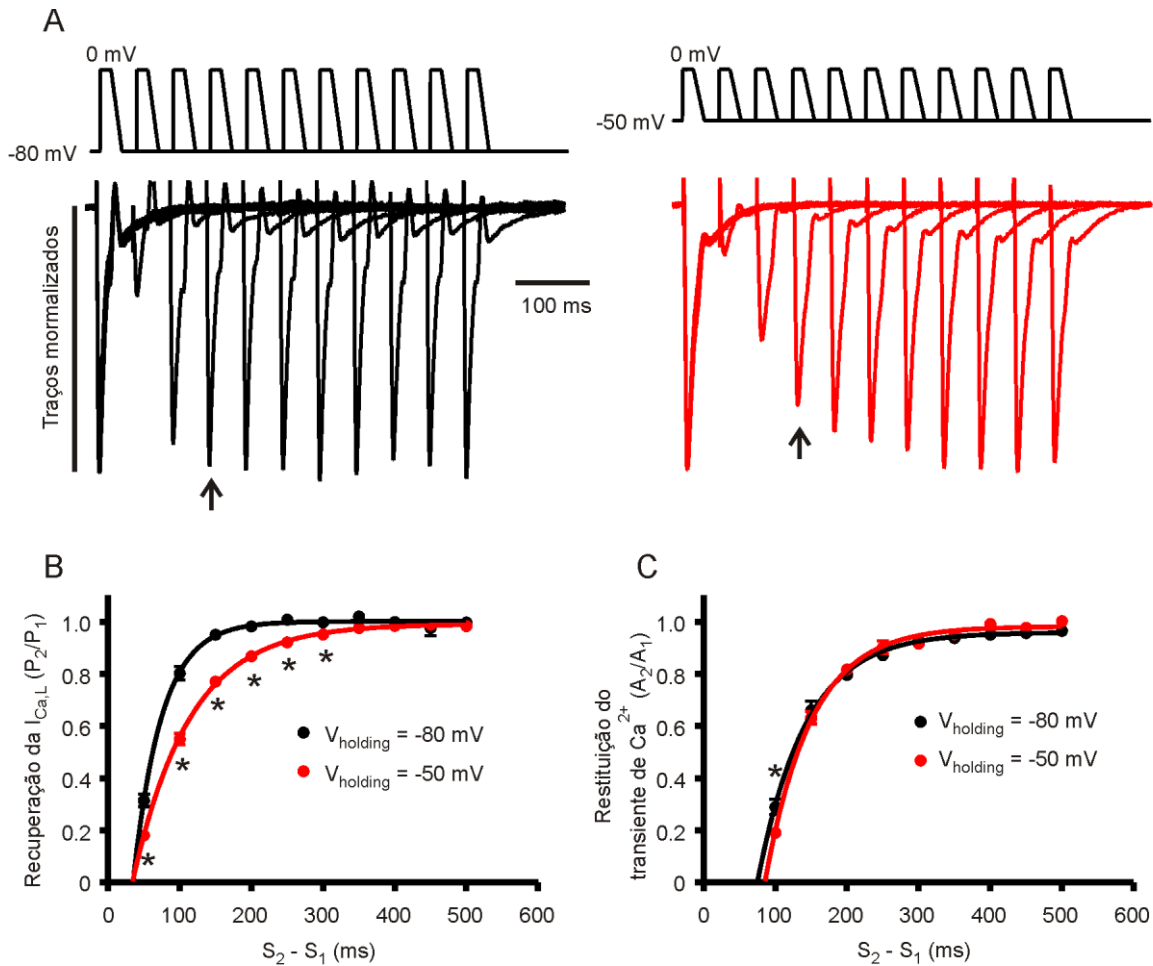


**Figura 26.** A recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  e a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** Painel superior mostra o protocolo de pulso, painel do meio mostra duas  $I_{\text{Ca,L}}$  evocadas em sequência, com intervalo de 150 ms entre si e painel inferior mostra os transientes induzidos por essas correntes. **B)** Sobreposição dos traços de  $I_{\text{Ca,L}}$  mostrando a sua recuperação da inativação (painel superior) e os transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  gravados simultaneamente (Painel inferior). **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (linha vermelha) e da recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  (linha preta,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$ ). A solução de Tyrode foi aquecida a  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e acrescida de tetrodotoxina ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ) para bloquear a  $I_{\text{Na}}$ .

É bem conhecido que o valor do potencial de *holding* pode influenciar a velocidade com que a  $I_{\text{Ca,L}}$  recupera-se da inativação, sendo que potenciais mais hiperpolarizados tendem a acelerar esse processo, enquanto que valores mais despolarizados exercem efeito oposto (TSENG, 1988; HILLE, 2002). Para testar a hipótese de que recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  pouco contribui na restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , levantada pelos experimentos

mostrados acima, o mesmo protocolo exposto previamente foi repetido porém, agora, mantendo-se a célula em um potencial de *holding* de -50 mV. Nesses experimentos não houve necessidade do uso de tetrodotoxina uma vez que o potencial de *holding* foi suficiente para inativar a  $I_{Na}$  (HILLE, 2002). Com essa estratégia pôde-se observar claramente uma desaceleração no curso temporal da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  quando comparada aos experimentos que mantinham as células em um potencial de *holding* de -80 mV (figura 27A). Esse efeito pode ser observado na figura 27B, onde o  $\tau$  para recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  foi de  $74,7 \pm 1,9$  ms (n=5) para as células com potencial de *holding* de -80 mV, sendo esse valor significativamente elevado para  $113 \pm 2$  ms naquelas mantidas em -50 mV (n = 10). Se de fato a recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  é um fator importante para o controle da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ , como sugerido por alguns pesquisadores (BELEVYCH et al., 2012; VORNANEN e SHEPHERD, 1997), uma mudança significativa no curso temporal do primeiro deve ser refletida no curso temporal do segundo. Curiosamente, a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  não foi modificada com o uso dessa manobra (ver figura 27C), uma vez que os valores de  $\tau$  para essa variável não se diferiram significativamente em ambos os grupos ( $\tau = 147 \pm 3,4$  ms para o *holding* de -80 mV e  $\tau = 142,6 \pm 4,5$  ms; para o *holding* de -50 mV;  $p > 0,05$ ). Deste modo, esses dados reforçam a hipótese de que a recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  contribui apenas discretamente para a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ .

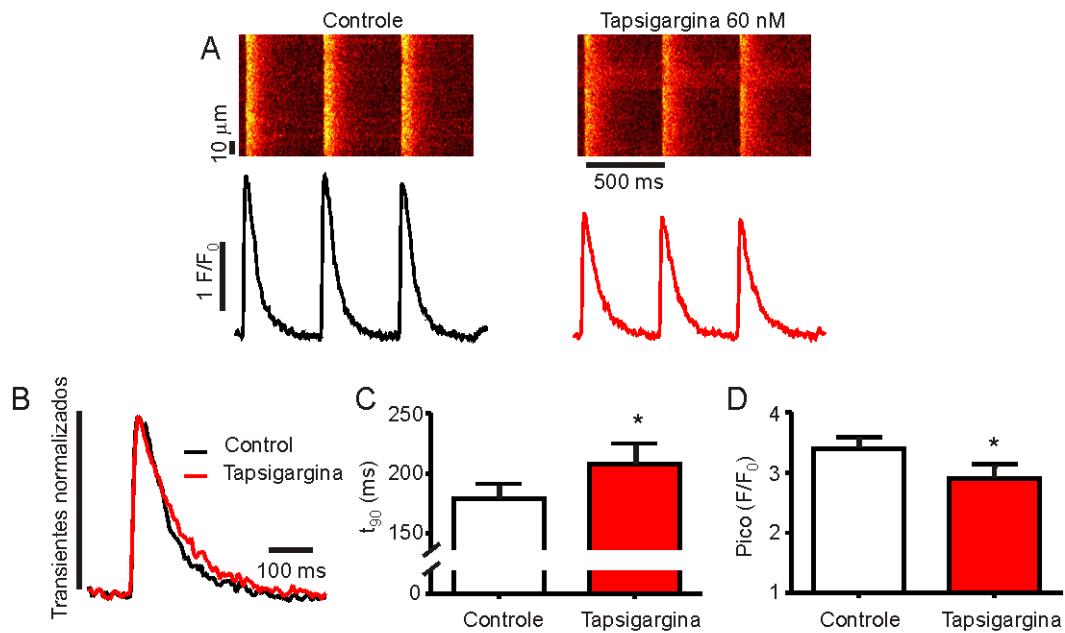




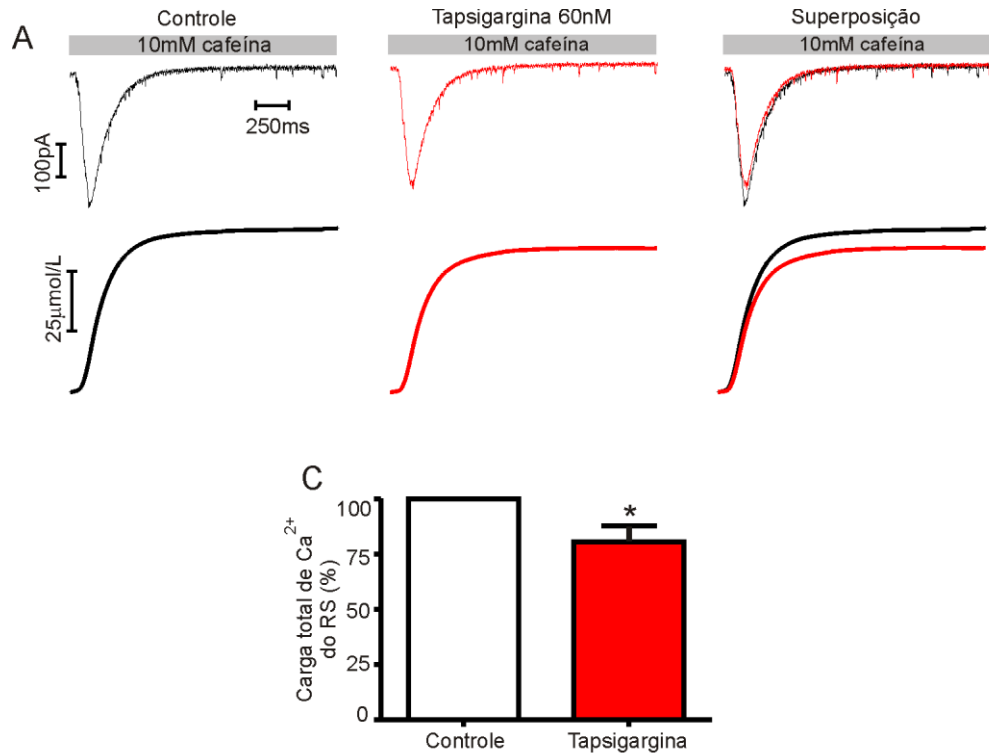
**Figura 27.** Mudanças na cinética da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  não alteram a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ . **A)** Recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  em células mantidas a um potencial de *holding* de  $-80$  mV (painel esquerdo) ou  $-50$  mV (painel direito). As setas indicam a  $I_{Ca,L}$  evocada pelo segundo pulso ( $P_2$ ) quando o intervalo entre ele e o primeiro ( $P_1$ ) foi de  $150$  ms. **B)** Curva de recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  em células mantidas a um potencial de *holding* de  $-80$  mV (linha preta,  $n = 10$ ) ou  $-50$  mV (linha vermelha,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$ ). **C)** Curvas de restituição do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em células mantidas a um potencial de *holding* de  $-80$  mV (linha preta,  $n = 9$ ) ou  $-50$  mV (linha vermelha,  $n = 7$ , \*  $p < 0,05$ ). A solução de Tyrode foi aquecida à  $36 \pm 1$  °C e acrescida de tetrodotoxina ( $100$   $\mu$ M) para bloquear as  $I_{Na}$  (apenas para as células mantidas à  $-80$  mV).

#### 5.4 A RECAPTAÇÃO DO $\text{Ca}^{2+}$ PELA SERCA NÃO É O FATOR LIMITANTE PARA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE $\text{Ca}^{2+}$ À TEMPERATURA FISIOLÓGICA

Diversos trabalhos vêm mostrando que após uma CICR há uma depleção parcial dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no jRS (BROCHET et al., 2005, LAVER et al., 2013) e muitos outros trabalhos citam que a amplitude da CICR seguinte é determinada, pelo menos em parte, pela velocidade com que a SERCA recapta para o lúmen do retículo o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado. Curiosamente, poucos estudos buscaram testar essa hipótese e aqueles que tentaram (SZENTESI et al., 2004), obtiveram seus dados à uma frequência de estimulação muito baixa, à temperatura ambiente e também manipulando intensamente o meio intracelular. É sabido que a atividade da SERCA é sensível à frequência cardíaca, à concentração de determinados íons intracelulares e também à temperatura (Q10 próximo de 3) (Bers, 2001). Para testar se a recaptção pela SERCA é um fator limitante para a refratariedade do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições mais próximas à fisiológica, foram obtidas curvas de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , em células sob estimulação de campo, antes e após a exposição à 60 nM de tapsigargina (por 3 minutos), um inibidor seletivo e irreversível da SERCA. Caso 60 nM de tapsigargina seja suficiente para bloquear parcialmente a SERCA, a mesma deve induzir pelo menos três tipos de efeitos no manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , a saber: 1) redução da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  medido após a exposição à tapsigargina, uma vez que com a redução da atividade da SERCA espera-se uma menor carga de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS a cada ciclo cardíaco, 2) aumento no tempo necessário para que 90 % do decaimento do pico do transiente ( $t_{90}$ ) seja alcançado e 3) redução na carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS. A figura 28 mostra os traçados representativos obtidos por microscopia confocal e seus respectivos valores de  $F/F_0$ . Nela pode ser observado que a exposição à tapsigargina foi capaz de aumentar o valor de  $t_{90}$  de  $178,9 \pm 14,4$  para  $208 \pm 18$  ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ ) e de reduzir o pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $3,3 \pm 0,27$  para  $2,75 \pm 0,2$  ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ), tal como esperado no caso de um bloqueio parcial da SERCA. A figura 29A (painel superior) mostra a  $I_{\text{NCX}}$  evocada após maciça liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, em resposta à rápida exposição da célula à 10 mM de cafeína. O painel inferior dessa mesma figura ilustra os valores de conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS estimados após integração da área delimitada pela curva da  $I_{\text{NCX}}$  na ausência ( $68,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e na presença ( $60,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de 60 nM de tapsigargina, uma redução de 12,8 %. A figura 29B mostra ainda que 60 nM de tapsigargina reduz, em média,  $19,6 \pm 7,1\%$  do conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS ( $n=3$ ,  $p < 0,05$ ). Tais dados sugerem fortemente que a tapsigargina, nessa concentração, estava bloqueando parcialmente a SERCA nas condições experimentais desse trabalho.



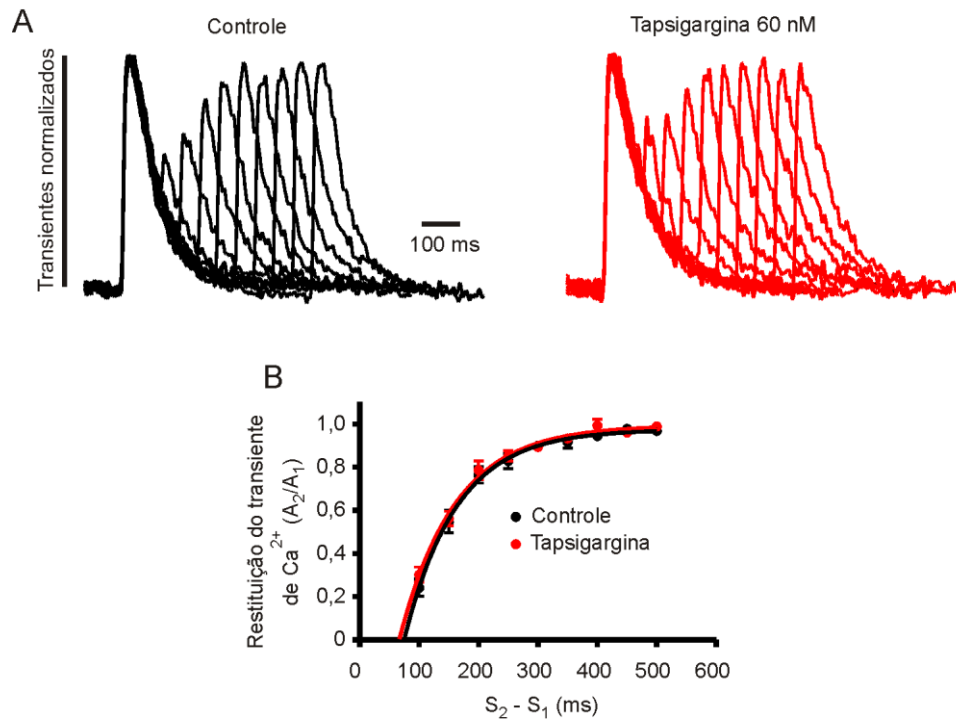
**Figura 28.** Efeito de 60 nM de tapsigargina nos parâmetros do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . **A)** Traçados experimentais obtidos antes (painel esquerdo) e depois (painel direito) da exposição à 60 nM de tapsigargina (por 3 minutos). **B)** Sobreposição dos traçados de transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  normalizados na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de tapsigargina. **C)** Valores médios do  $t_{90}$  na situação controle e na presença de tapsigargina ( $n = 8$ , \*  $p < 0,05$ ) e **D)** Valores médios do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na situação controle e na presença de tapsigargina ( $n = 7$ , \*  $p < 0,05$ ). Frequência de estimulação de 2Hz (39V, 2 ms). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.



**Figura 29.** Efeito de 60 nM de tapsigargina sobre a carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS. **A)** Painel superior mostra traçados representativos da I<sub>NCX</sub> induzida pela rápida aplicação de 10 mM de cafeína na situação controle, após 3 minutos de exposição a 60 nM de tapsigargina e a sobreposição dos dois traçados. O painel inferior mostra as correntes integradas e convertidas em μmol/L de citosol. **B)** Redução média da carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS após exposição dos cardiomiócitos a 60 nM tapsigargina (36 ± 1 °C, n = 3, \* p < 0,05).

Após atestar que 60 nM de tapsigargina estava de fato inibindo parcialmente a SERCA, foi então investigado o efeito dessa substância no curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup>. Caso a recaptação da SERCA seja um fator limitante para a refratariedade do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup> em condições fisiológicas, dever-se-ia observar um claro desvio da curva de restituição da amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> para a direita com a inibição dessa proteína transportadora. A figura 30A mostra os traçados dos transientes de Ca<sup>2+</sup> obtidos de um cardiomiócito na ausência (painel esquerdo) e na presença de 60 nM de tapsigargina (painel direito). Como pode ser visto nessa figura, é muito difícil notar qualquer tipo de deslocamento. A figura 30B ilustra com mais clareza que a inibição da SERCA não modifica o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup>, uma vez que não foi observado diferença estatisticamente significativa entre o τ na ausência (149 ± 9 ms) e na

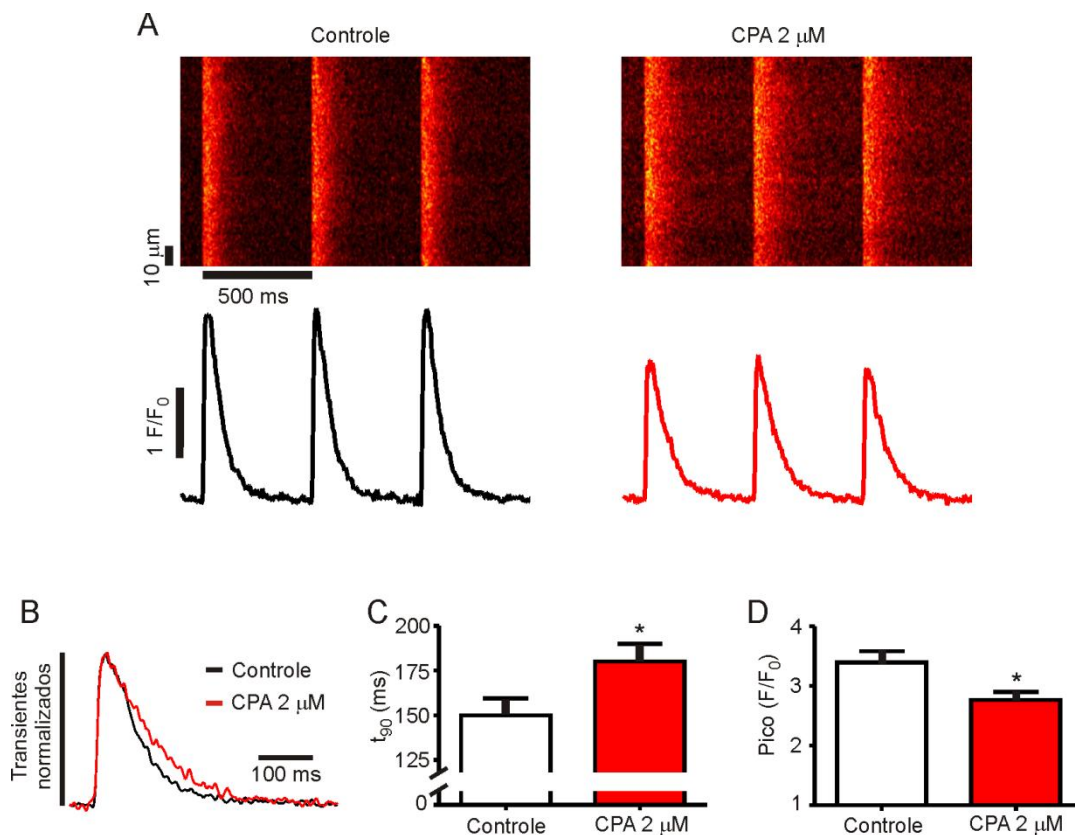
presença ( $146,8 \pm 9,4$  ms;  $n = 8$ ;  $p < 0,05$ ) dessa droga. Com isso, pode-se sugerir que a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA não é um passo relevante para o controle desse evento celular.



**Figura 30.** Efeito da tapsigargina sobre o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares. **A)** Traçados normalizados e sobrepostos mostrando restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  com o aumento do intervalo entre os pulsos na ausência (esquerda) e na presença (direita) de 60 nM de tapsigargina. **B)** Curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de 60 nM de tapsigargina ( $36 \pm 1$  °C,  $n = 8$ ).

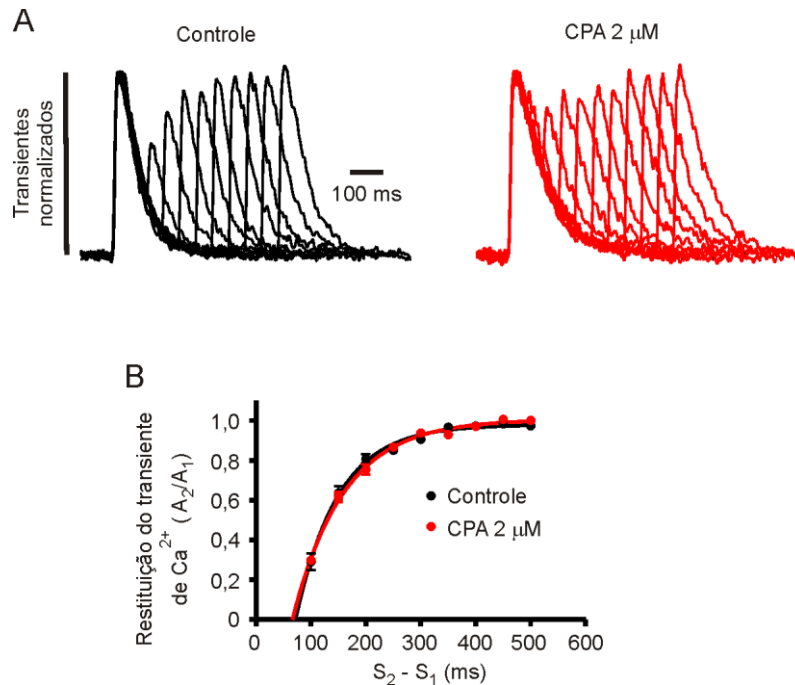
Para reforçar a hipótese levantada com base nos experimentos com o uso da tapsigargina, foi usada uma outra ferramenta farmacológica, o ácido ciclopiazônico (CPA), cuja ação é também a de inibir a SERCA. A figura 31A mostra os traçados representativos dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidos em uma célula na situação controle (painel esquerdo) e após 3 minutos de exposição a 2  $\mu\text{M}$  de CPA. O CPA (2  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reduzir o pico do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $3,4 \pm 0,2$  para  $2,7 \pm 0,1$  (figura 31D,  $n=9$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 31C). Também

foi observado que a exposição ao CPA aumentou o tempo para decaimento do transiente (figuras 31B e C), alterando o  $t_{90}$  de  $150 \pm 9$  ms para  $180 \pm 10$  ms ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ). Esses dados sugerem que a concentração de CPA aqui escolhida foi capaz de inibir parcialmente a SERCA. Todavia, de modo semelhante aos experimentos usando-se a tapsigargina, nenhum desvio estatisticamente significativo foi observado na curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de CPA, tal como pode ser ilustrado na figura 32 ( $n = 8$ ,  $p > 0,05$ ). Desta maneira, o conjunto de evidências levantadas indicam que a recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA não governa a refratariedade da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições fisiológicas. Essa conclusão encoraja levantar a hipótese de que, após uma CICR, a depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  seja restrita ao lúmen do jRS, de tal modo que o montante de  $\text{Ca}^{2+}$  no njRS permaneceria grande o suficiente para suprir a demanda fisiológica celular para CICR seguinte. Sendo assim, mudanças na velocidade de recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  pouco influenciariam no suprimento de  $\text{Ca}^{2+}$  para o jRS pois teoricamente a SERCA não interfere na velocidade de difusão de  $\text{Ca}^{2+}$  entre o njRS e o jRS.



**Figura 31.** Efeito de 2  $\mu\text{M}$  de CPA nos parâmetros do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . **A)** Traçados experimentais obtidos antes (painel esquerdo) e depois (painel direito) da exposição de CPA (2  $\mu\text{M}$  por 2 a 4 minutos). **B)** Sobreposição dos traçados de transientes normalizados na ausência

(preto) e na presença (vermelho) de CPA. **C)** Valores médios do  $t_{90}$  na situação controle e na presença de CPA ( $n = 9$ ,  $* p < 0,05$ ) e **D)** Valores médios do pico do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  na situação controle e na presença de CPA ( $n = 9$ ,  $* p < 0,05$ ). Frequência de estimulação de 2Hz (39V, 2 ms). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.



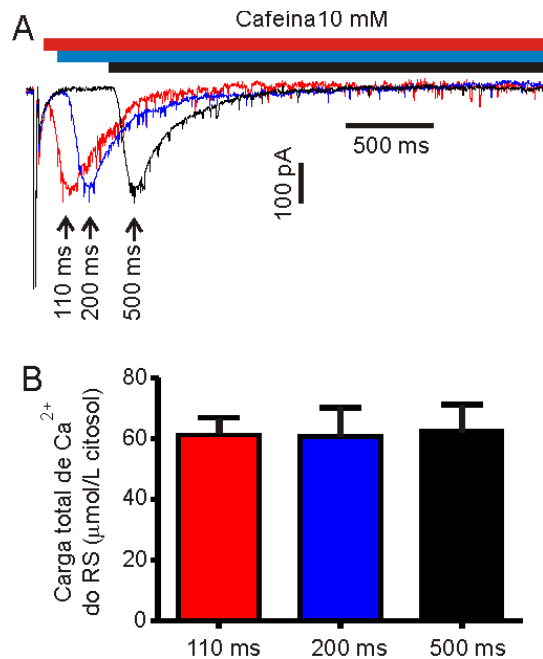
**Figura 32.** Efeito de 2  $\mu\text{M}$  de CPA sobre a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares. **A)** Traçados normalizados mostrando a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  com o aumento do intervalo entre os pulsos na ausência (esquerda) e na presença (direita) de 2  $\mu\text{M}$  de CPA. **B)** Curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (curva preta) e na presença (curva vermelha) de 2  $\mu\text{M}$  de CPA ( $n = 8$ ,  $36 \pm 1$  °C).

### 5.5 A CARGA TOTAL DE $\text{Ca}^{2+}$ DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO VERSUS A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE $\text{Ca}^{2+}$

Os resultados mostrados acima permitiram à construção da hipótese de que a depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS, após uma CICR, pode estar restrita à região juncional e que pouca alteração deve ocorrer na  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal do njRS. Esse último, por sua vez, teria uma grande reserva de  $\text{Ca}^{2+}$ , suficiente para suprir a demanda do jRS, sem a necessidade imediata (rápida) da recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA. Caso essa hipótese seja verdadeira, ao se medir a carga total (jRS e njRS) de  $\text{Ca}^{2+}$ , usando o método proposto por Varro et al. (1993), pouca variação no

conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS seria observada logo após uma CICR. Para testar essa hipótese, foram medidos o conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS em 3 intervalos de tempo distintos (110, 200 e 500 ms) após uma CICR evocada por  $I_{\text{Ca,L}}$ . As células foram mantidas a um potencial de *holding* de -80 mV, sendo aplicados pulsos de 0 mV para ativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  (ver seção "Métodos"). Antes desses experimentos, a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  foi mantida em estado estacionário através da aplicação de 9 pré-pulsos com frequência de 2Hz. A corrente induzida pelo décimo pulso foi gravada, bem como a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  por ela evocada (transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico), e, após 110, 200 ou 500 ms, a célula foi rapidamente exposta à solução de Tyrode contendo 10 mM de cafeína a fim de evocar a liberação de todo o  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS (transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  evocado por cafeína). Em cada célula, foi medido o conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS nos três diferentes intervalos. Para tanto as células permaneceram quiescentes por pelo menos 3 minutos entre cada protocolo para que os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  fossem plenamente restaurados entre cada repetição experimental. A figura 33A mostra traçados originais de  $I_{\text{NCX}}$  obtidos na mesma célula exposta a 10 mM de cafeína em três intervalos de tempo distintos após uma CICR. Pode-se observar claramente que não há diferença entre os picos das  $I_{\text{NCX}}$ , sugerindo que o conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS é semelhante, independente do tempo após a CICR no qual as mesmas foram medidas. Quando a área das curvas dessas correntes foi integrada, obteve-se uma estimativa dos valores do conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS, tal como ilustrado na figura 33B. Não pôde ser constatada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ;  $n = 7$ ) entre os valores na carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS medidos a 110 ms ( $61,3 \pm 5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), 200 ms ( $60,7 \pm 4,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou 500 ms ( $62,4 \pm 8,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) após o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esses dados indicam que não há diferença relevante na carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS ao longo do curso temporal da restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , fortalecendo a hipótese de que a depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$ , durante uma CICR, pode estar restrita ao jRS.

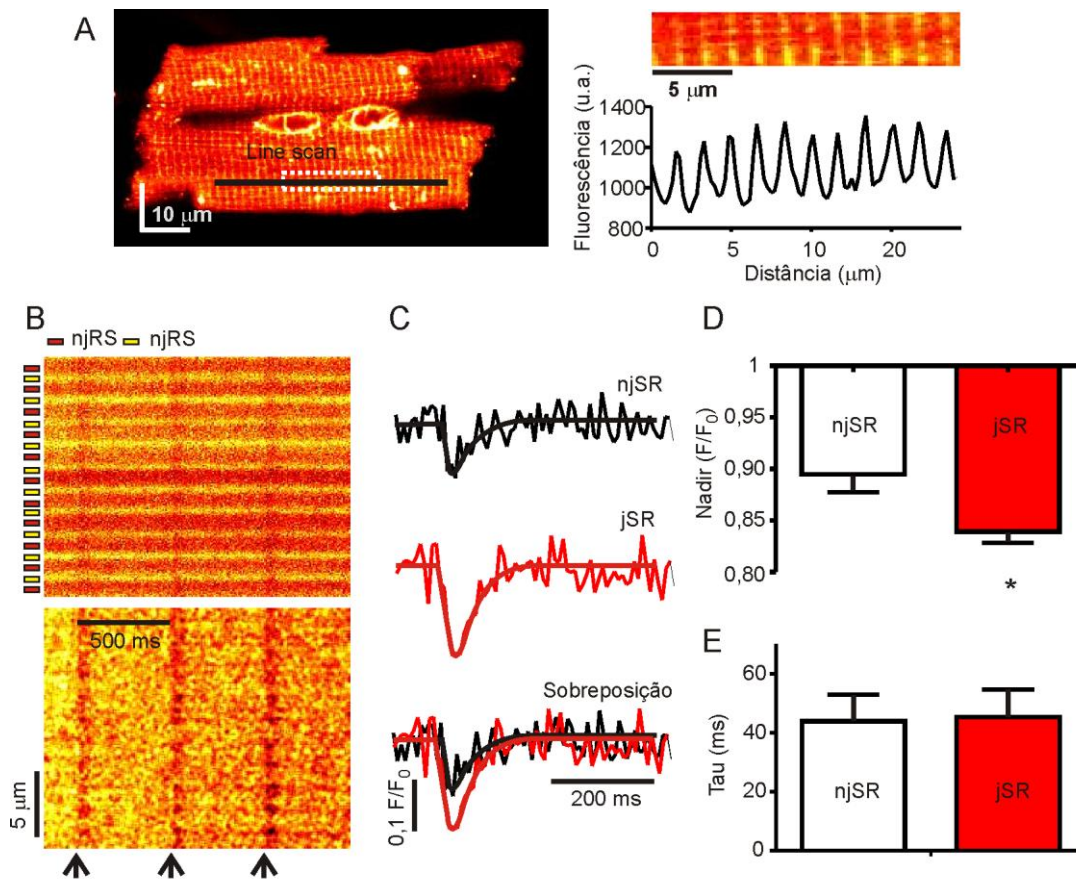




**Figure 33.** O conteúdo total de Ca<sup>2+</sup> no RS é o mesmo a 110, 200 e 500 ms após uma CICR. A) I<sub>NCX</sub> foi evocada pela rápida perfusão de solução de Tyrode contendo 10 mM de cafeína em diferentes intervalos de tempo após uma CICR. Pelo menos 3 minutos foram aguardados para a realização de cada medida de I<sub>NCX</sub> na mesma célula. B) Valores médios da carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS medidos a 110, 200 e 500 ms após um transiente de Ca<sup>2+</sup> induzido (n=7, p > 0,05). Temperatura = 36 ± 1 °C.

Para reforçar a hipótese de que a depleção da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RS</sub>, durante uma CICR, ocorre preferencialmente ao nível do jRS, medidas de oscilações de Ca<sup>2+</sup> no jRS e no njRS foram realizadas. Para tanto, o lúmen do RS foi marcado com Mag-Fluo-4, um indicador de Ca<sup>2+</sup> de baixa afinidade (ver "Métodos" para maiores detalhes). Como observado previamente por Shannon e colaboradores (2003), após marcação do RS com indicadores de Ca<sup>2+</sup>, um claro padrão de fluorescência pode ser observado em imagem bidimensional. A intensidade de fluorescência é maior perto da região onde se espera encontrar o jRS, ou seja, nas proximidades dos túbulos t (nas linhas z), enquanto que a mesma é reduzida onde o njRS está supostamente localizado. Em função disso, quando a imagem bidimensional de fluorescência é obtida nessas condições (figura 34A, painel esquerdo), as células apresentam-se com um claro padrão de estriamento, como ressaltado em uma imagem ampliada da figura 34A (painel direito). Essas bandas são separadas por uma distância média de ~1,8 μm, valor esperado entre as linhas z nos cardiomiócitos. Ao se realizar o escaneamento de linha pode-se observar que a imagem contém bandas mais claras (amarelas) e bandas mais escuras (vermelhas, figura 34B, painel

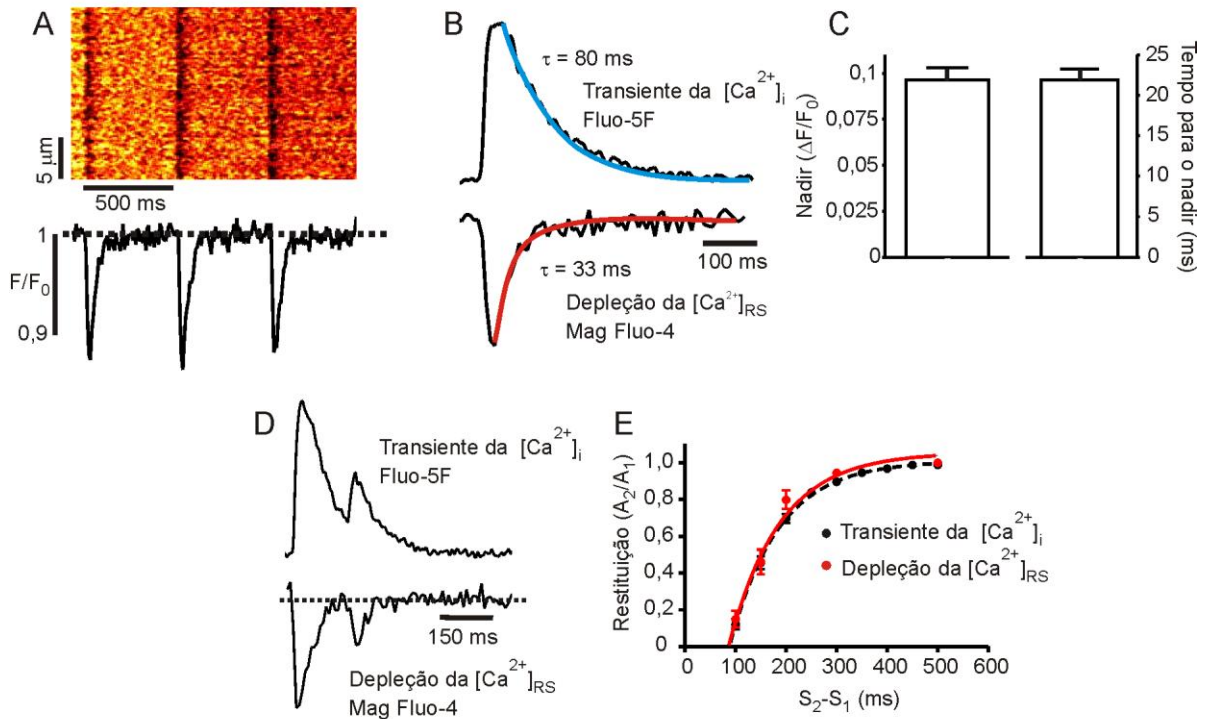
superior), que correspondem à regiões juncionais e não-juncionais do RS, respectivamente. Essas linhas foram utilizadas para medir as oscilações locais de fluorescência (normalizada por  $F/F_0$ ) nas bandas amarelas (jRS) e bandas vermelhas (njRS) durante estimulação de campo celular (2Hz, 36 °C). Ao se obter uma imagem normalizada pela fluorescência diastólica de cada região (figura 34B, painel inferior), a diferença na intensidade de fluorescência entre as regiões dos jRS e njRS desaparece. Todavia, nessa imagem já é possível perceber que a depleção da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  após um estímulo elétrico (indicado pelas setas), observada pela redução da intensidade da fluorescência, não é uniforme. É possível observar regiões onde a depleção de  $Ca^{2+}$  é mais intensa (mais escuras) ou menos intensa (mais claras). A figura 34C mostra traçados representativos médios de 16 depleções ( $n=4$  células) medidas de regiões não-juncionais (traço preto) ou juncionais (traço vermelho). Ao se sobrepor esses traçados fica claro que a amplitude da depleção relativa da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  no jRS é mais intensa. Apesar de não se observar diferença significativa entre as regiões na taxa de recuperação dos estoques luminiais locais de  $Ca^{2+}$  (figura 34E), em média a depleção da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  foi 52% maior no jRS (figura 34D). Esses dados corroboram a hipótese de que a depleção da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  ocorre principalmente no jRS e que o njRS pode funcionar como um bom reservatório de  $Ca^{2+}$  para suprir a demanda fisiológica.



**Figure 34.** Depleção local da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  em cardiomiócitos ventriculares. **A)** Imagem bidimensional de cardiomiócito ventricular marcado com Mag-Fluo-4 (painel esquerdo) e região ampliada dessa mesma imagem (painel direito superior) mostrando que as estriações são periódicas, nas quais os picos ou vales de intensidade de fluorescência ocorrem a aproximadamente  $1,8 \mu m$  (painel direito inferior). **B)** No painel superior é mostrado a linha de varredura (*line scan*) posicionada em A, mostrando bandas amarelas, correspondentes à  $[Ca^{2+}]_{jRS}$ , e vermelhas, que refletem a  $[Ca^{2+}]_{njRS}$ . O painel inferior apresenta a imagem normalizada pela fluorescência diastólica de cada região. **C)** traçados representativos obtidos pela média de 16 depleções de  $Ca^{2+}$  ( $n=4$  células) não-juncionais (traço preto) e juncionais (traço vermelho). **D)** valor da depleção máxima relativa (*nadir*) para a  $[Ca^{2+}]_{njRS}$  ( $-0,1053 \pm 0,0172$ ) e  $[Ca^{2+}]_{jRS}$  ( $-0,1609 \pm 0,0108$ , \*  $p > 0,05$ ). Constante de tempo para recuperação dos estoques luminiais de  $Ca^{2+}$  nas regiões njRS ( $\tau=43,8 \pm 9$  ms) e jRS ( $\tau=45,2 \pm 9,4$  ms,  $p>0,05$ ). As setas indicam o momento no qual foram aplicados os estímulos de campo (2 ms, 39 mV). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.

Para acessar diretamente a taxa na qual a  $[Ca^{2+}]_{RS}$  é restaurada após uma CICR em temperatura fisiológica, depleções de  $Ca^{2+}$  no RS foram medidas em cardiomiócitos

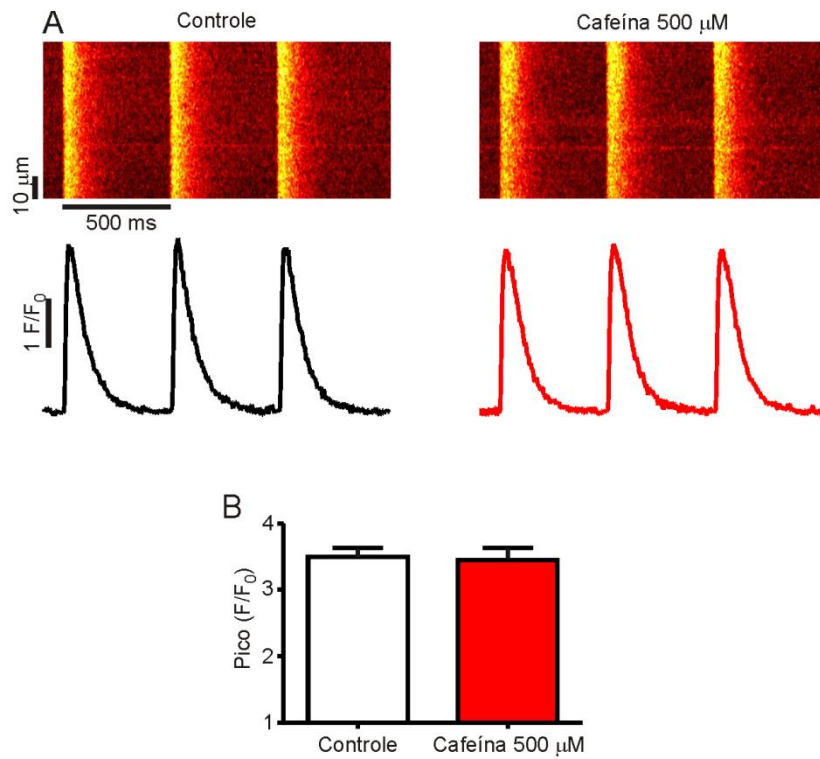
ventriculares isolados, usando Mag-Fluo-4, tal como descrito no parágrafo anterior. De modo semelhante às medidas de transiente citoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$ , o estado de equilíbrio da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  foi obtido através da aplicação de 9 pré-pulsos (2Hz) antes do registro de 3 depleções consecutivas com intervalo de 500 ms entre si. As depleções puderam ser observadas através das imagens obtidas por linha de varredura (*line scan*, figura 35A). A análise do curso temporal de uma depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  representativa mostra que a velocidade na qual a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  é restaurada é consideravelmente maior ( $\tau=33$  ms) quando comparada com a taxa de decaimento de um transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau=80$  ms) obtido em uma célula diferente porém sob as mesmas condições experimentais (figura 35B). O valor médio da taxa de recuperação dos estoques luminais de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau= 47,5 \pm 2,2$ ,  $n=8$ ) sugere que a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  é completamente restaurada ao tempo que o transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda apresenta refratariedade ( $\tau=188,2 \pm 7,2$ ,  $n=13$ ). O valor da depleção máxima (*nadir*) e do tempo do início depleção da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  até o *nadir* (tempo para o *nadir*) foram  $0,096 \pm 0,006 \Delta F/F_0$  e  $21,8 \pm 2$  ms, respectivamente ( $n=8$ , figura 35C). De modo interessante, mesmo após a completa recuperação da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , a depleção da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  ainda continua apresentando refratariedade como mostrado na figura 35D (intervalo  $S_2-S_1$  de 150 ms). A refratariedade da amplitude da depleção da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  ( $\tau=192,5 \pm 9,8$  ms,  $n=3-6$ ) não diferiu estatisticamente da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau=188,2 \pm 7,2$  ms,  $n=13$ ), tal como ilustrado na figura 35E. Esses dados mostram que a restauração da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  precede o período refratário do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  sugerindo a existência de um outro mecanismo responsável por esse claro atraso.



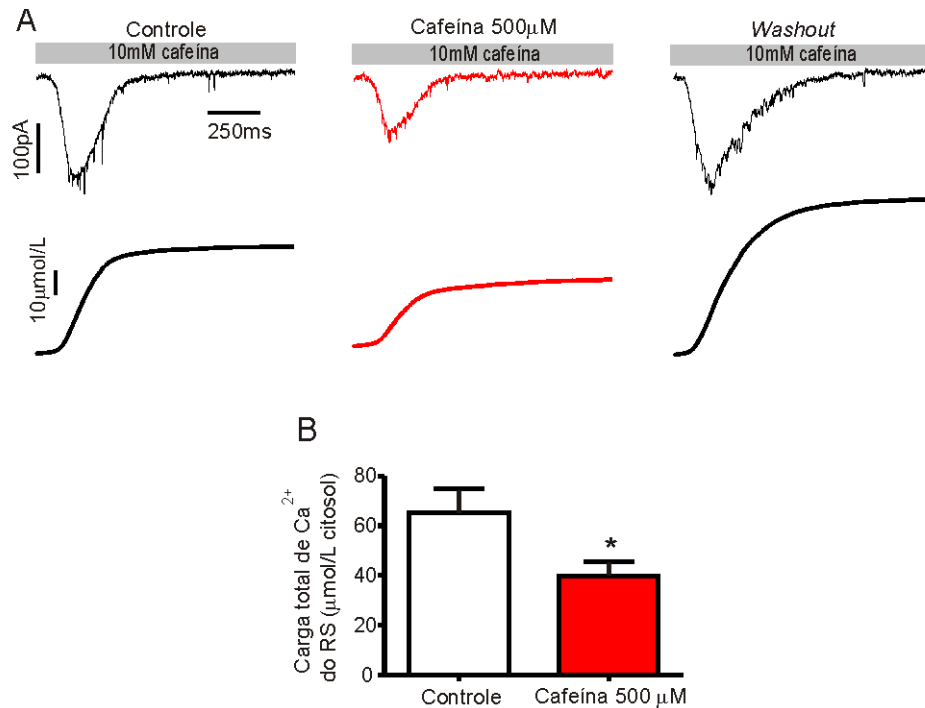
**Figura 35.** Medidas de depleções da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  em cardiomiócitos ventriculares mantidos à temperatura fisiológica. **A)** Escaneamento de linha normalizada pela fluorescência diastólica de cada região (painel superior) e os valores de fluorescência normalizada ( $\Delta F/F_0$ , painel inferior). **B)** Traços normalizados de um transiente citosólico (superior) e uma depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  (inferior) e suas respectivas constantes de tempo. **C)** valor da depleção máxima (*nadir*;  $0,096 \pm 0,006$ ) e tempo para o *nadir* ( $21,8 \pm 2 \text{ ms}$ ,  $n=8$ ). **D)** Traços representativos normalizados de duas depleções de  $\text{Ca}^{2+}$  (inferior) e dois transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados em sequência quando o intervalo extrassistólico foi de 150 ms (medidos em células diferentes porém nas mesmas condições experimentais). **E)** Curvas da restituição da amplitude da depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS ( $\tau=192,5 \pm 9,8 \text{ ms}$ ,  $n=3-6$ , curva em vermelho) e da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau=188,2 \pm 7,2 \text{ ms}$ ,  $n=13$ , curva em preto).

## 5.6 O ESTADO DE ATIVAÇÃO DO RYR CONTROLA A RESTITUIÇÃO DA AMPLITUDE DO TRANSIENTE CITOSÓLICO DE $\text{Ca}^{2+}$

Estudos recentes vêm sugerindo uma possível participação do estado de ativação dos RyR2 como modulador da restituição da amplitude do transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$  em determinadas disfunções cardíacas, muito embora a sua importância em cardiomiócitos normais ainda não tenha sido relatada (SHKRYL et al., 2012; RAMAY et al., 2011). Para estudar a contribuição do estado de ativação do RyR na refratariedade do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  foram utilizadas duas ferramentas farmacológicas clássicas que alteram o estado de ativação desses receptores de modo antagônico. A cafeína foi utilizada para elevar o estado de ativação dos receptores de RyRs, enquanto que a tetracaína foi usada para exercer o efeito oposto. O racional empregado nesta etapa no trabalho é que, aumentando ou diminuindo o estado de ativação dos RyRs pode-se acelerar ou retardar, respectivamente, o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para tanto, as células foram expostas a 500  $\mu\text{M}$  de cafeína (entre 2 a 4 minutos) e a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  foi então analisada na ausência ou na presença dessa droga. A concentração de cafeína usada não alterou os parâmetros do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  evocado por estimulação de campo, tais como: pico e  $t_{90}$ , como pode ser constatado nas figuras 36A e B. Todavia, como esperado, uma vez que a cafeína aumenta o vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pelos RyRs, a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foi reduzida de  $65,4 \pm 9,5$  para  $39 \pm 5,5$   $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de citosol na presença de 500  $\mu\text{M}$  dessa droga ( $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ; ver figura 37).



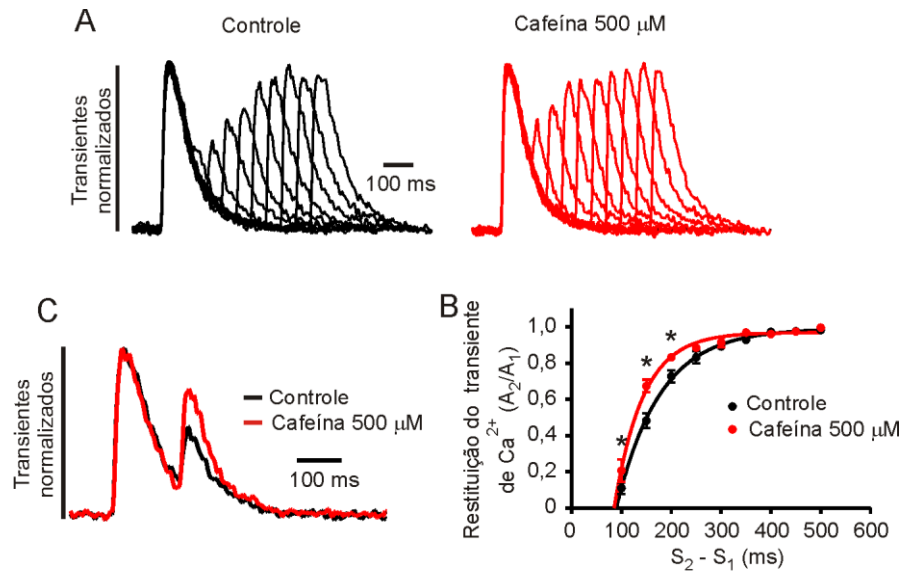
**Figura 36.** Efeito de 500  $\mu\text{M}$  de cafeína nos parâmetros do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . **A)** Traçados experimentais obtidos antes (painel esquerdo) e depois (painel direito) da exposição à cafeína. **B)** Valores médios de pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na situação controle e na presença de cafeína ( $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ). Frequência de estimulação de 2Hz (39V, 2 ms). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.



**Figura 37.** Efeito de 500  $\mu\text{M}$  de cafeína sobre a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. **A)** Painel superior mostra traçados representativos da  $I_{\text{NCX}}$  induzida pela rápida aplicação de 10 mM de cafeína na situação controle, após 3 minutos de exposição a 500  $\mu\text{M}$  de cafeína e durante o *washout*. O painel inferior mostra as correntes integradas e convertidas em  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de citosol. **B)** as médias da carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS antes e após exposição dos cardiomiócitos a 500  $\mu\text{M}$  de cafeína ( $36 \pm 1$  °C,  $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ ).

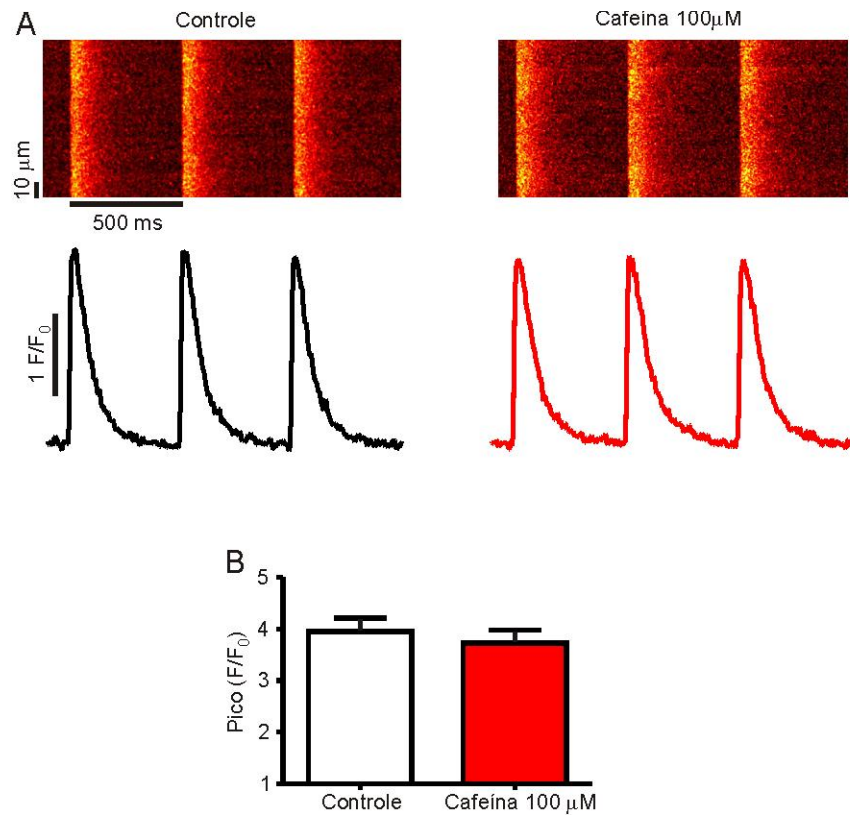
A exposição das células a 500  $\mu\text{M}$  de cafeína promoveu uma aceleração da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 38A), tal como mostrado com a sobreposição dos transientes controle e na presença de 500  $\mu\text{M}$  de cafeína, separados por um intervalo de 150 ms (figura 38B). A figura 38C mostra que a cafeína foi capaz de deslocar a curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  para a esquerda, reduzindo o  $\tau$  de  $177,2 \pm 6$  para  $143,5 \pm 5$  ms ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ). É importante ressaltar que é pouco provável que esse efeito seja devido a uma diminuição na carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS promovida por essa droga, uma vez que ao se reduzir a carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS espera-se uma redução da sensibilidade dos RyRs ao  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, tal como descrito por Terentyev et al. (2002).



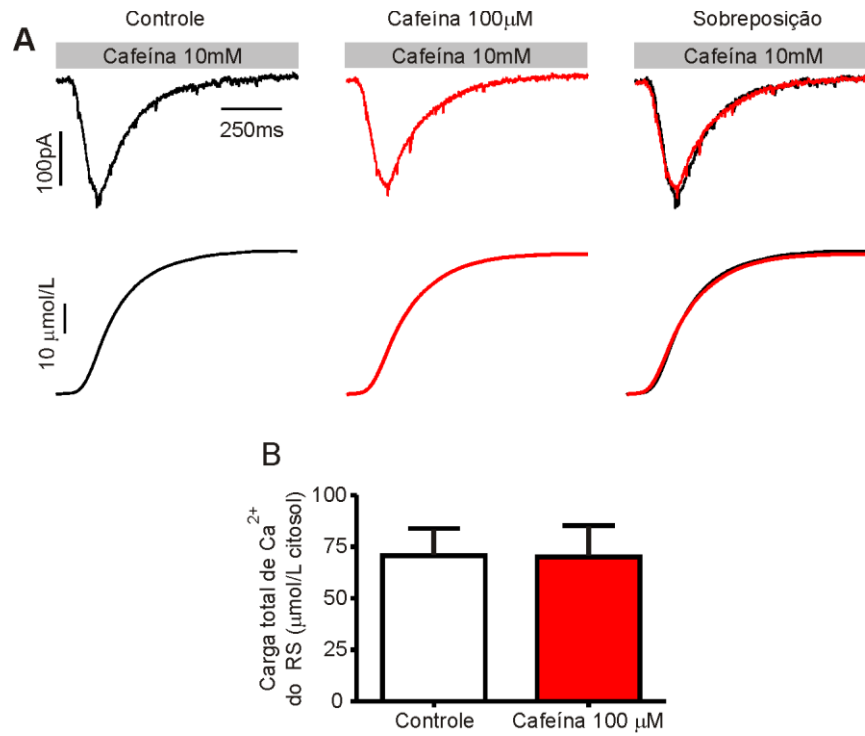


**Figura 38.** Efeito de 500 μM de cafeína sobre a restituição da amplitude do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** Traçados de transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup> normalizados mostrando a restituição da amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> com o aumento do intervalo entre os pulsos, na ausência (esquerda) e na presença (direita) de 500 μM de cafeína. **B)** Sobreposição dos traçados controle (em preto) e na presença de 500 μM de cafeína (em vermelho) quando o intervalo interestímulo foi de 150 ms. **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de Ca<sup>2+</sup> na ausência (curva preta) e na presença (curva vermelha) de 500 μM de cafeína (36 ± 1 °C; \* p < 0,05 ; n = 7).

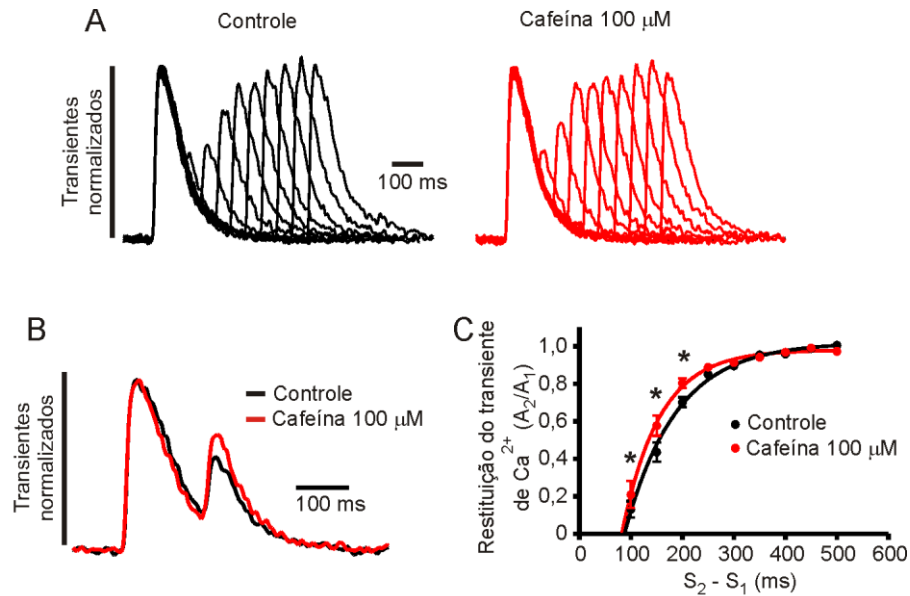
Entretanto, para excluir qualquer contribuição de alterações na carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS sobre efeito promovido pela cafeína, buscou-se usar uma concentração menor dessa droga, a qual alterasse menos, ou até mesmo não alterasse significativamente tal parâmetro. A figura 39 mostra que 100 μM de cafeína não muda os principais parâmetros do transiente de Ca<sup>2+</sup>, nem contudo altera a carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS (figura 40), todavia continua a deslocar a curva de restituição do transiente de Ca<sup>2+</sup> tal como ilustrado pela figura 41, reduzindo o τ de 187,1 ± 7,5 para 155,5 ± 7 ms (n = 7, p < 0,05). Esses dados sugerem que o estado de ativação dos RyRs é um mecanismo importante no controle da refratariedade do transiente de Ca<sup>2+</sup>.



**Figura 39.** Efeito de 100 μM de cafeína no pico do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . **A)** Traçados experimentais obtidos antes (painel esquerdo) e depois (painel direito) da exposição à cafeína. **B)** Valores médios do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na situação controle e na presença de 100 μM de cafeína ( $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ). Frequência de estimulação de 2Hz (39V, 2 ms). Temperatura =  $36 \pm 1$  °C.



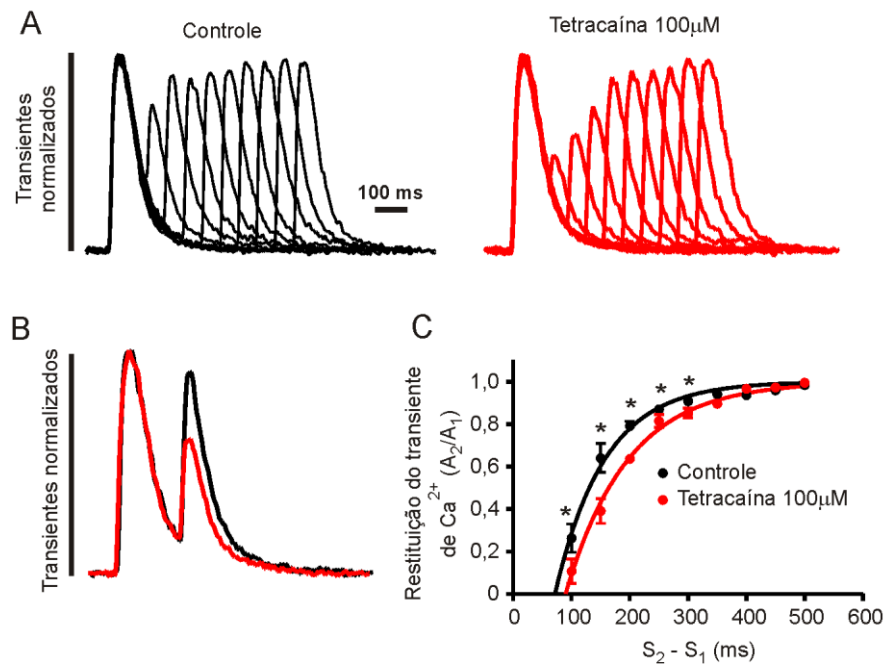
**Figura 40.** 100  $\mu$ M de cafeína não altera a carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS. **A)** Painel superior mostra traçados representativos da I<sub>NCX</sub> induzida pela rápida aplicação de 10 mM de cafeína na situação controle, após 4 minutos de exposição a 100  $\mu$ M de cafeína e a sobreposição de ambos. O painel inferior mostra as correntes integradas e convertidas em  $\mu$ mol/L de citosol. **B)** Média da carga total de Ca<sup>2+</sup> do RS antes e após exposição dos cardiomiócitos à cafeína (36  $\pm$  1 °C, n = 4).



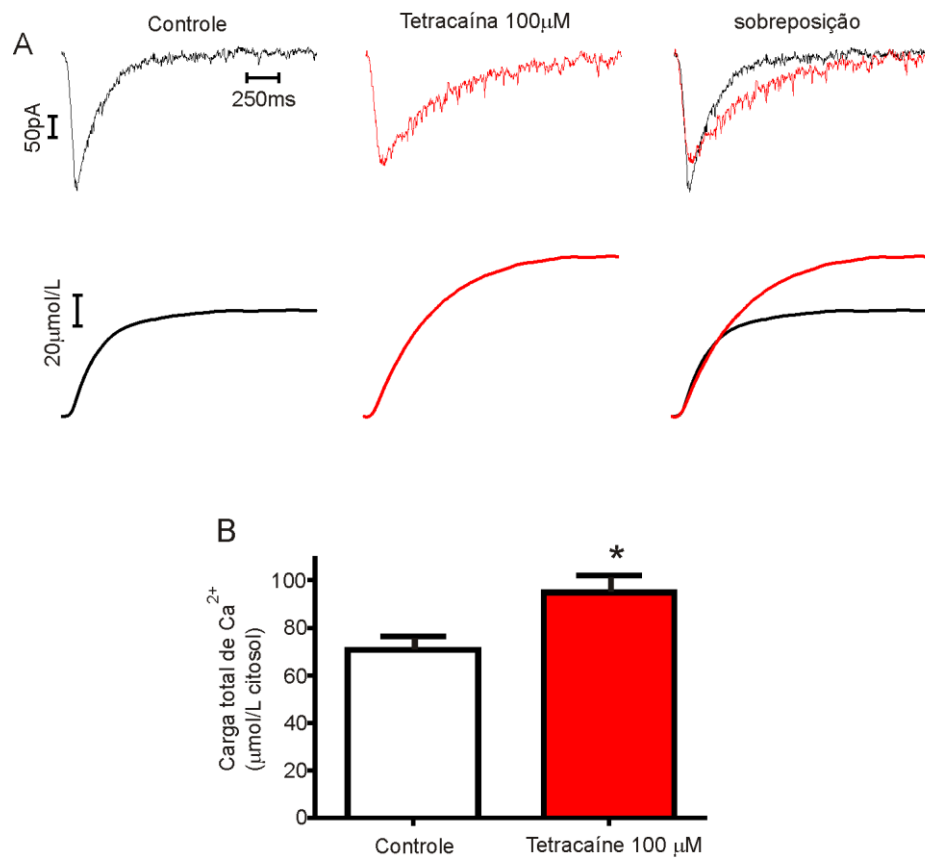
**Figura 41.** Efeito de 100  $\mu\text{M}$  de cafeína sobre a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. **A)** Traçados de transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  normalizados mostrando a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  com o aumento do intervalo entre os pulsos na ausência (esquerda) e na presença (direita) de 100  $\mu\text{M}$  de cafeína. **B)** Sobreposição dos traçados controle (em preto) e na presença de 100  $\mu\text{M}$  de cafeína quando o intervalo interestímulo foi de 150 ms. **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (curva preta) e na presença (curva vermelha) de 100  $\mu\text{M}$  de cafeína ( $36 \pm 1$  °C; \*  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ).

Se o aumento do estado de ativação dos RyRs acelera a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , torna-se intuitivo esperar que uma redução da probabilidade de abertura desses canais prolongue-a. Para testar essa hipótese, curvas de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foram obtidas na ausência ou presença de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína. É importante ressaltar que a tetracaína, além de reduzir a probabilidade de abertura dos RyRs, é também um bloqueador clássico da  $I_{\text{Na}}$ . Está bem estabelecido que o PA, por sua vez, depende fortemente da  $I_{\text{Na}}$  para ser iniciado (pelo menos em células ventriculares). Logo, experimentos com estimulação de campo não são a melhor opção para esse tipo de abordagem, uma vez que a geração de um PA é um pré-requisito essencial para a ativação dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  nessa condição. Sendo assim, foi utilizada a técnica de *patch clamp* no seu modo *voltage-clamp*, acoplada à medida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por microscopia confocal, para ativação e registro dos transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . O protocolo experimental foi o mesmo empregado nos experimentos da recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  (ver figura 26A). A figura

42A mostra a restituição da amplitude dos transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (transientes pretos) ou na presença (transientes vermelhos) de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína, sendo os traçados normalizados com intervalo interestímulo de 150 ms sobrepostos e ressaltados na figura 42B. A figura 42C demonstra que a exposição à tetracaína desloca claramente o  $\tau$  da curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $156,7 \pm 6,4$  para  $196,8 \pm 5,5$  ms ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ). É importante salientar que 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína aumenta a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, tal como ilustrado na figura 43 ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ).



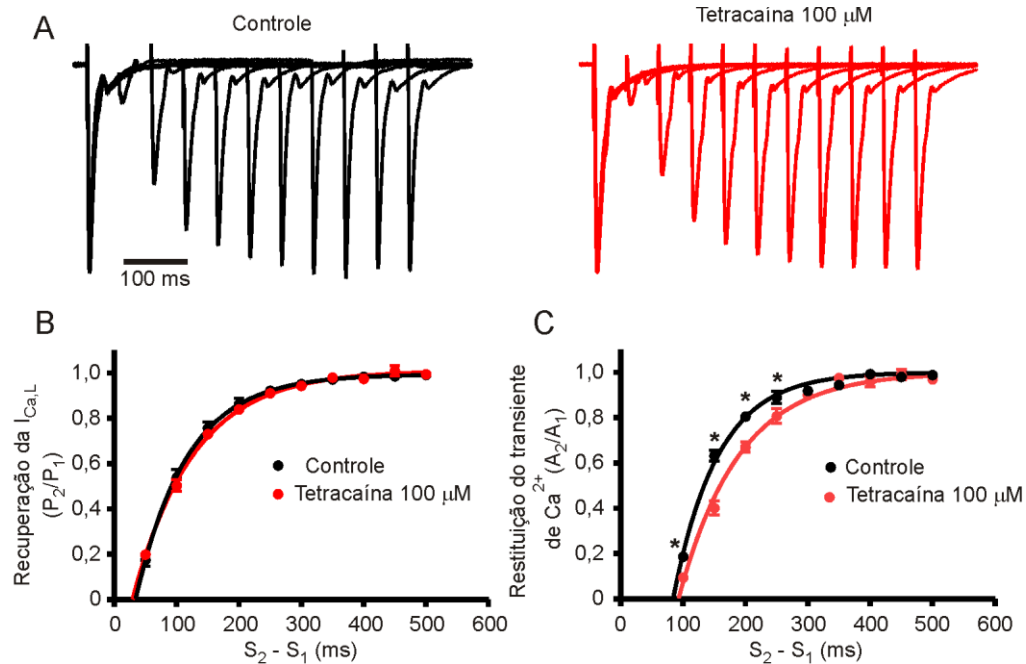
**Figura 42.** Tetracaína desvia a curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  para a direita. **A)** Traçados normalizados de transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  mostrando a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  com o aumento do intervalo entre os pulsos na ausência (painel esquerdo) e na presença (painel direito) de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína. **B)** Transientes citosólicos de obtidos a um intervalo inter-estímulo de 150 ms na ausência (transientes pretos) e na presença de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína (transientes vermelhos) **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência (curva preta) e na presença (curva vermelha) de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína ( $36 \pm 1$  °C; \*  $p < 0,05$  ;  $n = 4$ ).



**Figura 43.** Efeito de 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína sobre a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. **A)** Painel superior mostra traçados representativos da  $I_{\text{NCX}}$  induzida pela rápida aplicação de 10 mM de cafeína na situação controle, após 4 minutos de exposição a 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína e a sobreposição dos dois traçados. O painel inferior mostra as correntes integradas e convertidas em  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de citosol. **B)** Média da carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS antes e após exposição dos cardiomiócitos à tetracaína ( $36 \pm 1$  °C,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$ ).

Nos experimentos acima as células foram mantidas a um potencial de *holding* de -80 mV e despolarizadas para 0 mV, com o objetivo de evocar os transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Naquela situação, dois tipos corrente são evocados durante o pulso despolarizante, a saber:  $I_{\text{Na}}$  e  $I_{\text{Ca,L}}$ . Essa afirmação é válida apenas para a situação controle, uma vez que 100  $\mu\text{M}$  de tetracaína bloqueia ~95% da  $I_{\text{Na}}$  (dados não mostrados). Em outras palavras, nos experimentos mantendo a célula a -80 mV, as condições controle e teste não são exatamente as mesmas. Para evitar esse tipo de problema, foram repetidos os mesmos experimentos, agora mantendo os cardiomiócitos a -50 mV. Nessa situação, a  $I_{\text{Na}}$  estava inibida tanto na ausência quanto na presença de tetracaína. Como pode ser visto nas figura 44A e B, a exposição a 100  $\mu\text{M}$  de

tetracaína não alterou a cinética da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  ( $\tau = 116,8 \pm 4,5$  ms controle versus  $\tau = 126,2 \pm 4,4$  teste,  $n = 6$ ,  $p > 0,05$ ), contudo um claro efeito na restituição da amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  pode ser observado (figura 44C,  $\tau = 156 \pm 2,8$  ms controle versus  $\tau = 189,4 \pm 4,1$  ms teste,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Em conjunto, os resultados obtidos fortalecem a hipótese de que o estado de ativação dos RyRs é um importante mecanismo no controle da refratariedade do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ , uma vez que drogas que modulam as probabilidades de *gating* desses receptores alteram o curso temporal da restituição da amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$ .



**Figura 44.** 100  $\mu$ M de tetracaína desloca a curva de restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  sem alterar a recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$ . **A)** Recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  na ausência ou na presença de 100  $\mu$ M de tetracaína ( $V_{holding} = -50$  mV). **B)** Curva de recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  na ausência (linha preta) ou na presença (linha vermelha) de 100  $\mu$ M de tetracaína ( $n = 6$ ). **C)** Curva de restituição da amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  na ausência (linha preta) ou na presença (linha vermelha) de 100  $\mu$ M de tetracaína ( $n = 6$ , \*  $p < 0,05$ ). A solução de Tyrode foi aquecida a  $36 \pm 1$   $^{\circ}$ C.

## 6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi investigado o manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de camundongo mantidos à temperatura fisiológica. Mesmo sabendo-se que para a amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ser completamente restituída, as magnitudes da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  e da  $I_{\text{Ca,L}}$  precisam estar plenamente restauradas, de modo surpreendente foi observado um claro atraso no curso temporal para a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  mesmo após a completa recuperação de ambas variáveis. Tanto a  $I_{\text{Ca,L}}$  quanto a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  foram plenamente restituídas em aproximadamente 150 ms (ver figuras 26 e 35), tempo no qual a amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extrassistólico alcançou somente 50% do seu valor máximo. Além disso, foi observado que a manipulação farmacológica do estado de ativação dos RyR2 pôde acelerar ou desacelerar a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os dados aqui obtidos levantam importantes questões que, sem dúvida, merecem ser discutidas no contexto de outros trabalhos publicados.

A amplitude e duração do PA do cardiomiócito são fatores que determinam diretamente a magnitude da  $I_{\text{Ca,L}}$ , principal gatilho para a CICR no coração, influenciando, com isso, no montante de  $\text{Ca}^{2+}$  que será liberado pelo RS durante cada ciclo cardíaco (BASSANI et al., 2005, BERS, 2001). Desta maneira, um fator que deve ser levado em conta na regulação da refratariedade do transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$  é a restituição elétrica das células cardíacas, a qual está relacionada com a recuperação gradual da duração e/ou amplitude do PA, a medida que o IES aumenta. Tal fenômeno parece ser governado pelo tempo necessário para que as principais correntes de membrana ( $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{Ca}}$  e  $I_{\text{K}}$ ), evocadas e inativadas durante o PA, recuperem-se do estado de inativação (HILLE, 2002). Para elucidar se a refratariedade elétrica controla a restituição da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram realizadas medidas simultâneas de voltagem de membrana e da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Como mostrado na figura 24, tanto a amplitude do PA, quanto sua duração, recuperam-se mais rapidamente que a magnitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Após 100 ms ambas, a duração e amplitude do PA, estão plenamente restituídas, ao passo que a amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  alcança apenas 33% de seu valor máximo. Esses resultados corroboram os achados prévios de Knollmann e colaboradores (2007). Ao medir restituição da duração do PA monofásico registrados em coração isolado mantido a 37 °C, esses autores observaram que o  $\tau$  para a restituição do  $\text{RT}_{30}$  foi de 29 ms, valor muito semelhante ao observado no presente trabalho para a restituição do  $\text{RT}_{50}$  (29,8 ms). Ainda é possível observar no trabalho de Knollmann et al. (2007) que a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , medida em cardiomiócitos isolados mantidos à temperatura



fisiológica, apresentou-se muito mais lenta ( $\tau \approx 170$  ms, valor estimado através da figura 7 do trabalho desses autores) do que a restituição elétrica obtida em coração isolado. Observação semelhante foi realizada por Kornyejev et al. (2010), onde foi demonstrado, em coração isolado mantido a 37 °C, que a restituição da amplitude do PA ( $\tau = 28$  ms) precede o curso temporal para a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau \approx 190$  ms, estimado pela figura 8 do trabalho desses autores).

De modo geral, a amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está diretamente relacionada com a quantidade desse íon que entra na célula cardíaca durante cada ciclo elétrico via  $\text{Ca}_v1.2$  (BERS, 2001). Em outras palavras, quanto maiores forem a amplitude e duração do PA, mais intensa e prolongada será a ativação dos  $\text{Ca}_v1.2$ , principais canais iônicos de membrana envolvidos no AEC do coração. Também é importante considerar que, durante a despolarização sustentada (ou durante um PA), a  $I_{\text{Ca,L}}$  alcança seu valor máximo para logo em seguida ser inativada por mecanismos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e de voltagem (BREHM e ECKERT, 1978; KASS e SANGUINETTE, 1984; BENITAH et al., 2010). A recuperação da  $I_{\text{Ca,L}}$  do estado inativado requer tempo e é um fator que está diretamente relacionado com a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que entrará na célula no ciclo cardíaco subsequente, o que regula o montante de  $\text{Ca}^{2+}$  a ser liberado, via CICR, pelo RS. Alguns trabalhos têm sugerido que a recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  é o fator mais relevante no controle da restituição mecânica e da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  (TERENTYEV et al., 2002, VORNANEN e SHEPHERD, 1997). Todavia é de suma importância destacar que tais trabalhos foram realizados em condições afastadas da realidade fisiológica dos cardiomiócitos, como, por exemplo, mantendo-se o potencial de repouso mais despolarizado (entre -50 e -40 mV) para que a  $I_{\text{Na}}$  fosse inativada, facilitando com isso o registro da  $I_{\text{Ca,L}}$ . A grande desvantagem em usar essa manobra biofísica para eliminar a  $I_{\text{Na}}$ , presente na maioria das células cardíacas, é que a recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  é intensamente dependente do potencial de *holding*. Tseng (1988) demonstrou de modo bastante claro que, ao se elevar o potencial de repouso de -80 para -50 mV, a recuperação da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  torna-se aproximadamente 2,6 vezes mais lenta (medida pela sua constante de tempo). Na presente tese, de modo diferente dos trabalhos previamente publicados, buscou-se investigar a participação da recuperação da  $I_{\text{Ca,L}}$  do estado inativado na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em células mantidas a um potencial de *holding* de -80 mV, valor próximo ao potencial de repouso encontrado nos cardiomiócitos ventriculares. Para evocar a  $I_{\text{Ca,L}}$ , as células foram rapidamente despolarizadas de -80 para 0 mV, por 15 ms, e logo em seguida uma rampa de também 15 ms retornava o potencial de membrana para os valores de *holding*. O principal propósito da rampa, ao fim do pulso despolarizante, foi o de evitar uma

possível corrente de calda, o que poderia interferir na análise dos resultados. É também relevante enfatizar que essas medidas foram realizadas em solução de Tyrode normal à  $36 \pm 1$  °C e que tetrodotoxina, um bloqueador seletivo de canais de sódio (Hille, 2002), foi adicionada até alcançar a concentração final de 100  $\mu$ M. Nessa concentração, a tetrodotoxina bloqueou completamente a  $I_{Na}$  cardíaca (dados não mostrados). Como pode ser visto na figura 26, os dados desse trabalho mostram que a  $I_{Ca,L}$  recupera-se do estado de inativação de modo relativamente rápido ( $\tau=74,7$  ms), dados que corroboram os resultados previamente publicados em condições experimentais semelhantes ( $\tau=43$  ms, TSENG, 1988). Além disso, foi observado que ocorre um atraso significativo entre o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  ( $\tau = 145$  ms) em relação à recuperação da  $I_{Ca,L}$  do seu estado inativado ( $\tau=74,7$  ms), sugerindo que o último não é o único fator a governar o primeiro.

Caso a recuperação da  $I_{Ca,L}$  seja de fato o principal mecanismo celular responsável pela restituição da liberação de  $Ca^{2+}$  do RS, uma mudança no curso temporal do primeiro seria claramente refletida no segundo. Para testar essa hipótese os cardiomiócitos foram mantidos a um potencial de *holding* de -50 mV. Nessas condições, espera-se que a velocidade da recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  seja diminuída, como de fato o foi, uma vez que o valor do  $\tau$  aumentou de 74,7 ms (*holding* de -80 mV) para 113 ms (*holding* de -50 mV). Tseng (1988), que também manteve os cardiomiócitos a um potencial de *holding* de -50 mV (e a 37 °C), observou que o  $\tau$  para a recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  foi de 114,5 ms, valor muito semelhante ao encontrado aqui. O fato dessa manobra biofísica ter diminuído a velocidade com qual a  $I_{Ca,L}$  recupera-se da inativação em aproximadamente 50 %, a mesma não implicou em nenhuma mudança estatisticamente significativa na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ , uma vez que suas constantes de tempo para as células mantidas a -80 ou -50 mV foram praticamente inalteradas (147 e 142 ms, respectivamente). Em sumário, esses dados mostram que, em condições mais próximas à realidade fisiológica do cardiomiócito, a recuperação da inativação da  $I_{Ca,L}$  não é o mecanismo responsável por reger a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ .

Apesar de ser um tema ainda muito debatido na literatura, diversas hipóteses, fundamentadas ou não em evidências experimentais, tentam explicar os mecanismos que controlam a restituição da amplitude do transiente citoplasmático de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos. Uma das primeiras teorias, visando elucidar esse fenômeno, baseava-se na ideia de que o sítio de liberação do  $Ca^{2+}$  era diferente daquele envolvido na recaptção desse íon, de tal modo que o tempo necessário para o  $Ca^{2+}$  difundir-se entre essas regiões seria, em grande parte, o fator responsável pela restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  (SEED e WALKER,

1988). Outros acreditam que a velocidade com que o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado para o interior do RS pela SERCA seja o fator limitante para o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para investigar esse tema, Szentesi et al. (2004) estimaram o montante de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo RS através da amplitude da  $I_{\text{NCX}}$  durante a CICR, uma vez que essa corrente responde linearmente à  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (DeIPRINCIPE et al., 1999). Para tanto, esses autores dialisaram o meio intracelular dos cardiomiócitos, através de solução interna presente na pipeta de *patch clamp*, com um composto fotolábel que libera  $\text{Ca}^{2+}$  após exposição a pulsos de curta duração e alta intensidade (*flashes*) de luz ultravioleta (UV), induzindo com isso uma CICR. Sendo assim, as células foram expostas a dois *flashes* de luz UV em sequência e com intervalo de tempo variável entre si. Nessas condições, os autores observaram que a amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  restituiu-se com constantes de tempo de 718 ms em miócitos obtidos de coração de preá, e de 239 ms para camundongos. De modo importante, Szentesi et al. (2004) também observaram que ao diminuir a taxa com que o  $\text{Ca}^{2+}$  era recaptado pelo RS, utilizando-se CPA, um inibidor seletivo da SERCA, o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  era drasticamente alterado, sugerindo que a taxa com a qual o RS restitui seus estoques seja o mecanismo responsável por esse evento. Todavia, realizando o mesmo tipo de manobra, ou seja, reduzindo farmacologicamente a atividade da SERCA, com o uso de dois inibidores distintos, tapsigargina e CPA (INESI e SAGARA, 1994), não foi aqui observado nenhuma modificação no curso temporal da restituição da amplitude do transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver figuras 30 e 32), sugerindo que a recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS não governa a refratariedade do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa discrepância entre os resultados apresentados nessa tese e aqueles obtidos por Szentesi et al. (2004) pode estar relacionada ao método empregado para medir a amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ . Szentesi et al. (2004) manipularam drasticamente as concentrações iônicas do meio intracelular e também realizaram os seus registros à temperatura ambiente. Levando em consideração que a atividade da SERCA é sensível à temperatura (CHINI et al., 1993; BERS, 2001) e à concentração de determinados íons, esses fatos já poderiam explicar os resultados divergentes.

Os resultados do presente trabalho, obtidos com os inibidores da SERCA, levaram à construção da hipótese de que a depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS, após uma CICR, é restrita a região juncional do RS e que pouca alteração deve ocorrer no lúmen do njRS. Esse último, por sua vez, teria uma grande reserva de  $\text{Ca}^{2+}$ , suficiente para suprir a demanda do jRS para a próxima CICR, sem a necessidade imediata da recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA. Para testar tal hipótese, a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS foi estimada aos intervalos de tempo de 500, 200 e 110 ms após uma CICR, através da perfusão de solução de Tyrode acrescida com 10 mM de

caféina. Nessas condições, os RyR2 são rapidamente ativados, liberando todo o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Uma vez liberado para o citosol, o  $\text{Ca}^{2+}$  é então removido da célula pelo NCX o que gera uma corrente de entrada ( $I_{\text{NCX}}$ ). Com a integração da área da curva da  $I_{\text{NCX}}$  é possível obter o número total de carga removida pelo NCX e com isso pode-se estimar o conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, expresso em  $\mu\text{mol}$  por litro de citosol. É importante salientar que o intervalo de tempo de 110 ms após um transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico é um valor inferior ao àquele necessário para que a metade da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  seja restituída (~150 ms). Logo, se a recuperação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS pela SERCA for o fator determinante para a restituição do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , um menor conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS deveria ser observado nesse período. Surpreendentemente, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada no conteúdo total de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em função do tempo (medidos à 110, 200 e 500 ms após um transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Corroborando os achados aqui apresentados, resultados similares, realizando um protocolo experimental semelhante, foram obtidos observado por Vornanen e Shepherd (1997). Esses dados sugerem que a carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS mantém-se relativamente constante ao longo do curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , fortalecendo a hipótese de que uma considerável reserva de  $\text{Ca}^{2+}$  seja mantida no RS após uma CICR. Essa ideia foi reforçada ao se medir, com o indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Mag-fluo-4, a depleção da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  local, em regiões espacialmente resolvidas do jRS e njRS (figura 35). A depleção no jRS mostrou-se ~50% mais intensa do que aquela observada no njRS, sugerindo que mesmo após uma maciça liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol, um gradiente da  $[\text{Ca}^{2+}]$  entre essas duas regiões é mantido. Entretanto é importante ressaltar que Picht et al. (2011) não observaram um resultado semelhante ao usar uma abordagem parecida. Todavia, esses autores realizaram suas medidas em cardiomiócitos de coelho e à temperatura ambiente, sendo assim, diferenças anatômicas e na cinética de difusão intra-RS do  $\text{Ca}^{2+}$  poderiam ajudar a explicar essa discrepância.

Ao se realizar medidas diretas da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , usando Mag-Fluo-4, foi observado também que os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  são rapidamente recuperados após uma CICR. Esse trabalho encontrou uma constante de tempo média de 47,5 ms para que o ponto máximo de depleção da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  (*nadir*) retornasse aos níveis diastólicos. Um valor não tão distinto do aqui encontrado foi descrito por Brochet et al. (2005) para a restauração de *blinks* de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\tau \approx 30$  ms). Corroborando os dados aqui obtidos, esses autores mostraram ainda que a restituição da amplitude do *spark* de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre com significativo atraso ( $\tau = 187$  ms), quando comparado à restauração da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  local ( $\tau \approx 30$  ms). De modo semelhante foi demonstrado nessa tese que, mesmo ao nível global, esse fenômeno também é observado. Os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS

recuperam-se plenamente em 150 ms, tempo no qual apenas 50 % da amplitude do transiente citosólico e da fração de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada pelo RS são restituídos (figura 34). Em outras palavras, existe, ao nível global, um claro atraso entre a taxa em recuperação da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  e a amplitude da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. Adiante serão discutidos quais mecanismos poderiam ser responsáveis por esse atraso.

Alguns grupos de pesquisa vêm realizando experimentos, em diversos graus de complexidade, na tentativa de determinar de que modo a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  é controlada. Aqui foi demonstrado que esse evento pode ser modulado aumentando-se ou diminuindo-se o estado de ativação dos RyR2 (figuras 38 e 42), indicando que o mecanismo responsável por esse evento celular pode estar diretamente relacionado com as propriedades de *gating* desses canais. Nos parágrafos a seguir serão abordados os seguintes tópicos: **A)** propriedades de *gating* dos RyR2 e como esses receptores funcionam quando aglomerados em um *cluster*, **B)** mecanismos pelos quais o estado de ativação dos RyR2 pode ser influenciado pelas proteínas encontradas no lúmen do RS e **C)** de que modo as proteínas encontradas no citosol modulam as propriedades de *gating* dos RyR2.

A recuperação dos RyR2 de um estado de inativação poderia contribuir para o atraso na restituição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS observado nesse trabalho, caso esse fenômeno ocorresse em condições fisiológicas. Entretanto, até o momento, nenhum grupo teve êxito em demonstrar, de modo simples e satisfatório, que esse mecanismo de fato ocorre nos RyR2 (CHENG e LEDERER, 2008). Tipos mais complexos de inativação, como por exemplo "adaptação" têm sido reportados. Nesses trabalhos foi observado que os RyR2 são capazes de se adaptar, diminuindo sua probabilidade de abertura em função do tempo, após serem expostos a um aumento rápido e sustentado da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (GYÖRKE e FILL, 1993; VALDIVIA et al., 1995), todavia esses trabalhos foram muito debatidos na literatura (FILL et al., 2000, LAMB et al., 2000). Enquanto a inativação dos RyR2 foi um importante detalhe nos modelos matemáticos mais antigos, que tentavam explicar o término dos *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$  e do transiente global, mais recentemente, Sobie et al. (2002) mostraram que esse mecanismo não era necessário para o cessamento dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  e ainda que a sensibilidade dos RyR2 à  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  era baixa, necessitando que o  $\text{Ca}^{2+}$  variasse de 10 a 100  $\mu\text{M}$  na fenda diádica para que houvesse uma rápida ativação dos RyR2. Esses achados têm recebido o suporte de outros grupos (LAVIER et al., 2013). Em sumário esses modelos não fornecem uma explicação mecanística para o atraso da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  observado nesse trabalho.

Os modelos matemáticos mais recentes buscam integrar diversos fatores críticos que regulam os RyR2 e controlam o comportamento dos *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo o seu término.

Eles tentam levar em consideração as distintas maneiras pelas quais a  $[Ca^{2+}]_{RS}$  modula a atividade dos *sparks* de  $Ca^{2+}$ , desse modo, esses modelos poderiam contribuir para a compreensão da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ . Os modelos matemáticos mais novos baseiam-se, entre outras premissas, em duas sugestões previamente cunhadas por Sobie e colaboradores (2002), a saber: **1)** a  $[Ca^{2+}]_{jRS}$  cai para valores muito baixos durante o *spark* de  $Ca^{2+}$  e **2)** durante o intervalo de tempo no qual os RyR2 estão abertos, uma elevada concentração de  $Ca^{2+}$  é formada no subespaço entre os túbulos t e o jRS, a qual é determinada pelo efluxo de  $Ca^{2+}$  do RS. Esses detalhes são amplamente aceitos como críticos para a iniciação e término dos *sparks* de  $Ca^{2+}$  (CANELL et al., 2013; LAVER, 2013), além de contribuírem para o vazamento de  $Ca^{2+}$  que ocorre como *quark* de  $Ca^{2+}$  (*invisible leak*) (WILLIAMS et al., 2011). Curiosamente, esses e outros modelos matemáticos lançam mão do mecanismo de atrito estocástico (STERN, 1992) para término do *spark* de  $Ca^{2+}$ . Esse mecanismo sugere que se a probabilidade para que os RyR2 sejam ativados pela  $[Ca^{2+}]_i$  na fenda diádica for suficientemente baixa, o término do *spark* de  $Ca^{2+}$  pode ocorrer quando todos os RyR2 forem simultaneamente fechados. Esse tipo de mecanismo pode ser descrito como "desativação estocástica dos RyR2" (SDR - *stochastic RyR2 deactivation*) e pode ser devido a uma considerável depleção da  $[Ca^{2+}]_{jRS}$ . Medidas diretas da depleção dos estoques de  $Ca^{2+}$  do jRS (*blinks* de  $Ca^{2+}$ ) reforçam essa hipótese (BROCHET et al., 2005). Uma possível depleção de 90% da  $[Ca^{2+}]_{jSR}$  leva a uma intensa redução da  $[Ca^{2+}]_i$  na fenda diádica, bem como na sensibilidade dos RyR2 ao  $Ca^{2+}$  citosólico. Muito embora a SDR tenha recebido outros nomes, tal como "decaimento de indução" (LAVER et al., 2013), não existe uma clara distinção conceitual entre os mesmos. Mesmo levando em consideração o sucesso dos modelos matemáticos mais recentes para prever e simular determinadas características dos *sparks* de  $Ca^{2+}$ , tais como sua amplitude e duração, os mesmos falham em incluir qualquer tipo processo dependente de tempo que poderia explicar o atraso observado na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ . Deste modo, serão discutidos aqui alguns mecanismos de controle das propriedades de *gating* dos RyR2 que poderiam ser responsáveis pelo atraso na restituição da amplitude do transiente global de  $Ca^{2+}$ .

A regulação dos RyR2 pela  $[Ca^{2+}]_{RS}$  pode, a princípio, ser mais complexa do que a medida direta das oscilações na  $[Ca^{2+}]_{RS}$ . Por exemplo, se uma proteína sensível ao  $Ca^{2+}$ , tal como a calsequestrina (o mais abundante tampão de  $Ca^{2+}$  encontrado no lúmen do RS), que sofre mudanças conformacionais de um modo dependente da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  e também de tempo, a cinética das reações subsequentes poderiam, em teoria, contribuir para a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  pelo fato das mesmas afetarem, diretamente, as

propriedades de *gating* dos RyR2. Caso essa hipótese seja verdadeira, ela poderia explicar os achados desse trabalho e também de outros (SOBIE et al., 2005, RAMAY et al., 2011). Existem evidências de que interações dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e de tempo de uma ou mais proteínas luminais com os RyR2 podem modular a probabilidade de abertura desses canais. Györke e colaboradores (2004) investigaram esse tópico e mostraram que três proteínas luminais, a saber: calsequestrina, junctina e triadina; devem ser incorporadas à preparação de bicamada lipídica artificial para que a sensibilidade dos RyR2 ao  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico assemelhe-se àquela encontrada *in situ*. RyR2 incorporados à bicamada lipídica artificial na ausência dessas três proteínas são muito mais sensíveis à  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , apresentando alta probabilidade de abertura. Sendo assim, as propriedades de *gating* dos receptores de RyR2 são controladas por ambas, pela  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  e pelas proteínas encontradas no lúmen do RS. Algumas dessas últimas são também controladas pelo próprio  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.

Para investigar a participação direta das proteínas luminais na restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , experimentos adicionais avaliaram como a restituição era afetada por alterações na calsequestrina. Em coração isolado de camundongo geneticamente manipulado, que não expressava calsequestrina ( $\text{CASQ}^{-/-}$ ), o curso temporal da restituição do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  foi mais rápido ( $\tau=111$  ms) do que em animais do grupo controle ( $\tau=182$  ms, obtidos à 37 °C). O mecanismo para esse aumento na velocidade da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  observado nos animais  $\text{CASQ}^{-/-}$  pode estar relacionado à habilidade dessa proteína em tamponar o  $\text{Ca}^{2+}$  no interior do RS, porém também pode ser devido à alterações na probabilidade de abertura dos RyR2, ou até mesmo às drásticas mudanças morfológicas observada no RS desses animais, o qual apresenta-se excessivamente dilatado nesse modelo experimental (KNOLLMANN et al., 2006). Para determinar qual dessas três possibilidades é responsável pela aceleração da restituição do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  observada no modelo  $\text{CASQ}^{-/-}$ , cardiomiócitos obtidos de camundongos expressando calsequestrina mutante (CSQ2-R33Q) foram investigados. Tais camundongos são utilizados como modelo experimental que simula a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), uma disfunção rítmica que é observada na presença de elevados níveis de catecolaminas, como por exemplo durante atividade física ou estresse emocional. Os miócitos cardíacos obtidos de animais CSQ2-R33Q apresentam acelerada restituição na presença de 100 nM de isoproterenol ( $t_{1/2}=134$  ms, temperatura ambiente), quando comparado à células controle nas mesmas condições ( $t_{1/2}=166$  ms) (BRUNELLO et al., 2013). Tal aceleração foi acompanhada por um aumento na probabilidade de abertura dos RyR2 desses animais, medidos em bicamada lipídica artificial. Nesse caso, os RyR2 dos animais CSQ2-

R33Q e CASQ<sup>-/-</sup> foram incorporados à bicamada em conjunto com as suas proteínas luminais nativas. A probabilidade de abertura dos RyR2 quando a  $[Ca^{2+}]_i$  foi ajustada para 10  $\mu$ M no lado citosólico e 1 mM na porção luminal foi de 0,12; 0,25 e 0,35 para os animais controle, CSQ2-R33Q e CASQ<sup>-/-</sup>, respectivamente. De maneira surpreendente, quando o mesmo experimento foi realizado com 90% de redução na concentração luminal de  $Ca^{2+}$  (0,1 mM), a probabilidade de abertura dos RyR2 manteve-se inalterada (CHEN et al. 2013). A ausência de dependência da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  (dentro dos limites fisiológicos) no controle das propriedades de *gating* dos RyR2 pelas proteínas luminais reduz drasticamente a possibilidade de que esse mecanismo seja o responsável pelo atraso existente entre a recuperação da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  e o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  observado aqui.

Estudos têm relatado que alterações na sensibilidade dos RyR2 ao  $Ca^{2+}$  citosólico podem afetar a refratariedade dos *sparks* de  $Ca^{2+}$  (SOBIE et al., 2005, RAMAY, 2011) e a restituição da amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  global em modelos animais que simulam algumas disfunções cardíacas (BELEVYCH et al., 2012). Além disso, foi mostrado aqui, pela primeira vez, que esse tipo de manipulação também modula a restituição da amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos obtidos de coração normal. Todavia, uma questão relevante ainda se mantém aberta: qual é o mecanismo molecular responsável pela refratariedade dos RyR2? No parágrafo anterior foi discutido um possível envolvimento das proteínas luminais, entretanto os dados recentemente publicados desencorajam a sustentação dessa hipótese. Por outro lado, diversas proteínas modulam a atividade dos RyR2 através de sua região citosólica, e algumas delas são sensíveis ao  $Ca^{2+}$ . Essas proteínas poderiam estar envolvidas no controle da restituição do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ . A CaM, por exemplo, é uma proteína moduladora dos RyR2 que, uma vez associada ao  $Ca^{2+}$ , reduz a probabilidade de abertura ( $P_o$ ) desses canais. Durante uma CICR, a  $[Ca^{2+}]_i$  eleva-se de valores diastólicos (~150 nM) para alcançar seu ponto máximo (~10  $\mu$ M) em alguns milissegundos, podendo alcançar valores mais altos nas proximidades dos clusters de RyR2. Nesse momento, o  $Ca^{2+}$  pode ligar-se à CaM, que já se encontra ancorada ao RyR2. O complexo Ca-CaM então é responsável por exercer um efeito depressor sobre a  $P_o$  dos RyR2, uma vez que CaM mutantes, que são incapazes de ligar-se ao  $Ca^{2+}$ , mas continuam associadas ao RyR2, não modulam as propriedades de *gating* desses canais na presença desse íon (XU e MEISSNER, 2004). Quando a  $[Ca^{2+}]_i$  decai para valores basais, o  $Ca^{2+}$  tende a se dissociar do seu sítio de ligação na CaM. Caso a velocidade de dissociação do complexo Ca-CaM seja suficientemente lenta, esse evento poderia contribuir para a manutenção estado refratário desses canais. Esse teoria, aqui criada, seria suficiente para explicar o atraso observado entre a restauração da  $[Ca^{2+}]_{RS}$  e o



curso temporal da restituição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Outra proteína também presente no citosol, que modula a Po dos RyR2, é a sorcina. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se a sorcina, acredita-se que esse complexo (Ca-sorcina) é capaz de rapidamente interagir com os RyR2 e modular suas propriedades de *gating* (MEYERS et al, 1995; LOKUTA et al., 1997). Se isso de fato ocorrer, quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diminui, o montante de Ca-sorcina associado aos RyR2 também reduz, o que poderia, em teoria, aumentar o estado de ativação desses canais. Entretanto, essas hipóteses aqui levantadas não passaram do campo teórico, ou seja, ainda precisam ser experimentalmente testadas.

## 7 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostrou que, em cardiomiócitos ventriculares isolados e mantidos à temperatura fisiológica, existe um claro atraso entre o curso temporal para restituição da amplitude do transiente citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparado às taxas de recuperação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e de restauração das magnitudes do potencial de ação e da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L. Os resultados aqui obtidos sugerem que esse atraso pode ser devido ao estado refratário dos receptores de rianodina, uma vez que a manipulação das propriedades de *gating* desses canais alterou significativamente o curso temporal da restituição da amplitude do transiente citosólico global de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 8 REFERÊNCIAS

- ANDERSSON-CEDERGREN, E. Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 2, suplemento , p. 5-191, 1959.
- BADDELEY, D.; JAYASINGHE, I.D.; LAM, L.; ROSSBERGER, S.; CANNELL, M.B.; SOELLER, C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. **PNAS**, v. 106, p. 22275–22280.
- BASSANI J.W.; YUAN, W. e BERS D.M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C1313-1319, 1995.
- BELEVYCH, A.E.; TERYTYEV, D.; TERYTYEVA, R.; HO, H.; GYORKE, I.; BONILLA, I.M.; CARNES, C.A.; BILLMAN, G.E.; GYÖRKE, S. Shortened Ca<sup>2+</sup> Signaling Refractoriness Underlies Cellular Arrhythmogenesis in a Postinfarction Model of Sudden Cardiac. Death Novelty and Significance. **Circ Res.** 2012;110:569-577
- BENITAH, J.P.; ALVAREZ, J.L.; GÓMEZ, A.M. L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. **JMCC**, v. 48, p. 26–36, 2010.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. e STANTON, B. A. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.
- BERRIDGE, M. J. Cardiac calcium signaling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. Pt 5, p. 930-33, 2003.
- BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.
- BERS D. M. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**. Second Edition. Netherland: Kluwer Academic Plubishers, 2001.
- BERS, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 23 - 49, 2008.
- BERS, D.M. e SHANNON, T.R. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. **JMCC**. v. 58, p. 59–66, 2013.
- BOYDEN, P.A.; HIROSE, M.; DUN, W. Cardiac Purkinje cells. **Heart Rhythm.**, v. 7, p. 127–135, 2010.
- BREHM, P. e ECKERT, R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. **Science**. v. 202, n. 4373, p. 1203-1206, 1978.
- BRETTE, F. e ORCHARD, C. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. **Circ. Res.**, v. 92, p. 1182-1192, 2003.
- BRETTE, F., SALLÉ, L., ORCHARD, C.H. Quantification of calcium entry at the T-tubules and surface membrane in rat ventricular myocytes. **Biophys. J.**, v. 90, p. :381-389, 2006.

BROCHET, D.X.P.; YANG, D.; Di MAIO, A.; LEDERER, W.J.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; CHENG, H. Ca<sup>2+</sup> blinks: Rapid nanoscopic store calcium signaling. **PNAS**, v. 102, p. 3099–3104, 2005.

BROCHET, D.X.; YANG, D.; CHENG, H. e LEDERER, W.J. Elementary calcium release events from the sarcoplasmic reticulum in the heart. **Adv Exp Med Biol.**, v. 740, p. 499-509, 2012.

BRUNELLO, L., SLABAUGH, J.L.; RADWANSKI, P.B.; HO, H.T.; BELEVYCH, A.E.; LOU, Q.; CHEN, H.; NAPOLITANO, C.; LODOLA, F.; PRIORI, S.G.; FEDOROV, V.V.; VOLPE, P.; FILL, M.; JANSSEN PM e GYORKE, S. Decreased RyR2 refractoriness determines myocardial synchronization of aberrant Ca<sup>2+</sup> release in a genetic model of arrhythmia. **PNAS**, v. 110, p. 10312-10317, 2013.

CANNELL, M.B; KONG, C.H; IMTIAZ, M.S. e LAYER D.R. Control of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by stochastic RyR gating within a 3D model of the cardiac dyad and importance of induction decay for CICR termination. **Biophysical journal**, v. 104, p. 2149-2159, 2013.

CHEN, S.; LI, S. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. **Med. Sci. Monit.**, v. 18, n. 11, p. RA161-165, 2012.

CHEN, H.; VALLE, G.; FURLAN, S.; NANI, A.; GYORKE, S.; FILL, M. e Volpe P. Mechanism of calsequestrin regulation of single cardiac ryanodine receptor in normal and pathological conditions. **J gen physiol**, v. 142, p. 127-136, 2013

CHENG, H.; LEDERER, W.J. Calcium Sparks. **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 1491–1545, 2008.

CHENG, H.; LEDERER, W.J. e CANNELL, M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. **Science**. v. 262, p. 740-744, 1993.

COLQUHOUN, D.; NEHER, E.; REUTER, H. e STEVENS, C.F. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. **Nature**, v. 294, p. 752-754, 1981.

CONDE-GARCIA, E. A. **Biofísica**. São Paulo: Savier, 1998.

CRANFIELD, P. F. **The conduction of the cardiac impulse**. New York: Futura Publishing Company, 1975.

CRIBBS, L.L. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. **Channels**, v. 4:, p. 447-452, 2010.

DALLY, S.; CORVAZIER, E.; BREDOUX, R.; BOBE, R. e ENOUF, J. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. **JMCC**, v. 48, p. 633–644, 2010.

DelPRINCIPE, F.; EGGER, M. e NIGGLI, E. Calcium signaling in cardiac muscle: refractoriness revealed by coherent activation. **Nat. cell biol.**, v. 1, p. 323-329, 1999.

DE TOMBE, P. P. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. **J. Biomech.**, v. 36, n. 5, p. 721–730, 2003.

DIBB, K.M., CLARKE, J.D., EISNER, D.A., RICHARDS, M.A., TRAFFORD, A.W. functional role for transverse (t-) tubules in the atria. **JMCC**, v. 58, p. 84–91, 2013.

DZHURA, I.; WU, Y.; COLBRAN, R. J.; BALSER, J. R. e ANDERSON, M. E. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 3, p. 173-177, 2000.

ENGELMANN, T. W. Vergleichend Untersuchungen zur Lehre von der Nervenelectricitat. **Pfluegers Arch. Ges. Physiol.**, v. 15, p. 116-148, 1877.

ESPINOZA-FONSECA, L.M. e THOMAS, D.D. Atomic-Level Characterization of the Activation Mechanism of SERCA by Calcium. **Plos One**, v. 6, p. e26936 - e26936, 2011.

FABIATO, A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. **J Gen Physiol.**, v. 85, p. 247-89, 1985.

FAWCETT, D.W. e McNUTT, S.N. The ultrastructure of the cat myocardium. I. ventricular papillary muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 42, p. 1-45, 1969.

FILL, M.; ZAHRADNIKOVA, A.; VILLALBA-GALEA, C.A.; ZAHRADNIK, I.; ESCOBAR, A.L. e GYORKE, S. Ryanodine receptor adaptation. **J. Gen. Physiol.**, v. 116, 873-882, 2000.

FINDEISEN, F. e MINOR, D.L.. Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation. **Channels**, v. 4, p. 459-474, 2010.

GYORKE, S. e FILL, M. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca2+ release in heart. **Science**, v. 260, p. 807-809, 1993.

GYORKE, I.; HESTER, N., JONES, L.R. e GYORKE, S. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. **Biophysical journal**, v. 86, 2121-2128, 2004.

GYORKE, S.; LUKYANENKO, V. e GYORKE, I. Dual effects of tetracaine on spontaneous Ca<sup>2+</sup> release in rat ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 500.2, p. 297-309, 1997.

GRANZIER, H. e LABEIT, S. Cardiac titin an adjustable multi-funcional spring, **J. Physiol.**, v. 541, n. 2, p. 335-342, 2002.

GUYTON, A.C. e HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11<sup>a</sup> ed., Filadelfia: Elsevier Saunders, 2006.

HAGEN, B.M.; BOYMAN, L.; KAO, J.P. e LEDERER, W.J. A comparative assessment of fluo Ca<sup>2+</sup> indicators in rat ventricular myocytes. **Cell Calcium**. v. 52, n. 2, p. 170-81, 2012.

HERZBERG, E. L. e JOHNSON, R. G. Gap junctions. In: SATIE, B. Editor. **Modern. cell. biology.**, New York: Liss, Vol. 7, 1988.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3a edição, SINAUER ASSOCIATES INC, 2002

HOIT, B.D.; KADAMBI, V.J.; TRAMUTA, D.A.; BALL, N.; KRANIAS, E.G. e WALSH, R.A. Influence of sarcoplasmic reticulum calcium loading on mechanical and relaxation restitution. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 278, p. H958-H963, 2000.

HOFFMAN, B. F. e CRANEFIELD, P. F. **The electrophysiology of the heart**. New York: McGraw-Hill, 1960.

JANSEN, J.A.; VAN VEEN, T.A.B.; BAKKER, J.M.T.; VAN RIJEN, H.V.M. Cardiac connexins and impulse propagation. **JMCC**, v. 48, p. 76–82, 2010.

KATZ, A. M. **Physiology of the Heart**. New York: Raven Press, 1977.

KASS, R.S.; LEDERER, W.J.; TSIEN, R.W. e WEINGART, R. Role of calcium ions in transient inward currents and after contractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. **J. Physiol.**, v. 281, p. 187-208, 1978.

KASS, R.S. e SANGUINETTI, M.C. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. **J. Gen. Physiol.**, v. 84, n. 5, p. 705-726, 1984.

KAZMIERSKI, S. T.; ANTIN, P. B.; WITT, C. C.; HUEBNER, N.; MCELHINNY, A. S.; LABEIT, S. e GREGORIO, C. C. The complete mouse nebulin gene sequence and the identification of cardiac nebulin, **J. Mol. Biol.** v. 328, n. 4, p. 835-846, 2003.

KELLER, M.; KAO, J.P.; EGGER, M. e NIGGLI, E. Calcium waves driven by "sensitization" wave-fronts. **Cardiovasc. Res.**, v. 74, p. 39-45, 2007.

KIMURA, J.; ONO, T.; SAKAMOTO, K.; ITO, E.; WATANABE, S.; MAEDA, S.; SHIKAMA, Y.; YATABE, M.S. e MATSUOKA, I. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger expression and its modulation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 3, p. 325-331, 2009.

KITCHENS, S. A.; BURCH, J. e CREAZZO, T. L. T-type Ca<sup>2+</sup> current contribution to Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in developing myocardium. **J. Mol. and Cell. Cardiology**, v. 35, p. 515-523, 2003.

KNOLLMANN, B.C.; CHOPRA, N.; HLAING, T.; AKIN, B.; YANG, T.; ETTENSOHN, K.; KNOLLMANN, B.E.; HORTON, K.D.; WEISSMAN, N.J.; HOLINSTAT, I.; ZHANG, W.; RODEN, D.M.; JONES, L.R.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. e PFEIFER, K. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, 2510-2520, 2006.

KNOLLMANN, B.C.; SCHOBER, T.; PETERSEN, A.O.; SIRENKO, S.G. e FRANZ, M.R. Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 292, p. H614-H621, 2007.

KONG, C.H.; LAVER, D.R. e CANNELL, M.B. Extraction of sub-microscopic Ca fluxes from blurred and noisy fluorescent indicator images with a detailed model fitting approach. **PLoS Comput. Biol.**, v. 9, p. e1002931, 2013

KORNYEYEV, D.; PETROSKY, A.D.; ZEPEDA, B.; FERREIRO, M.; KNOLLMANN, B., ESCOBAR, A.L. Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca<sup>2+</sup> release and reduces rate-dependent Ca<sup>2+</sup>-alternans in intact mouse hearts. **JMCC**, v. 52, p. 21-31, 2012.

LAMB, G.D.; LAVER, D.R. e STEPHENSON, D.G. Questions about adaptation in ryanodine receptors. **J. Gen. Physiol.**, v. 116, p. 883-890, 2000.

LAVER, D.R.; KONG, C.H.; IMTIAZ, M.S. e CANNELL, M.B. Termination of calcium-induced calcium release by induction decay: an emergent property of stochastic channel gating and molecular scale architecture. **JMCC**, v. 54, p. 98-100, 2013.

LEVY, M. N. Neural control of the heart: the importance of being ignorant. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. 6, p. 283-293, 1995.

LI, L., DE SANTIAGO, J.; CHU, G; KRANIAS, EG e BERS, D.M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in  $\alpha$ -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 278, p. H769–H779, 2000.

LINKE, W. A. e FERNANDEZ, J. M. Cardiac titin: molecular basis of elasticity and cellular contribution to elastic and viscous stiffness components in myocardium, **J Muscle Res. Cell M.**, v. 23, p. 483-497, 2002.

LOKUTA, A.J.; MEYERS, M.B.; SANDER, P.R.; FISHMAN, G.I. e VALDIVIA, H.H. Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, p. 25333-25338, 1997.

LUO, W.; WOLSKA, B.M.; GRUPP, I.L.; HARRER, J.M.; HAGHIGHI, K.; FERGUSON, D.G.; SLACK, J.P.; GRUPP, G.; DOETSCHMAN, T.; SOLARO, R.J. e KRANIAS, E.G. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. **Circ. Res.**, v. 78, p. 839-847, 1996.

LUTHER, P.K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. **J. Muscle. Res. Cell. Motil.**, v. 30, p. 171–185, 2009.

MEYERS, M.B.; ZAMPARELLI, C.; VERZILI, D; DICKER, A.P.; BLANCK, T.J. e CHIANCONE, E. (1995). Calcium-dependent translocation of sorcin to membranes: functional relevance in contractile tissue. **FEBS letters**, v. 357, p. 230-234, 1995.

McNUTT, N. S. e FAWCETT, D. W. The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle. **J. Cell Biol.**, v. 42, p. 46-67, 1969.

NIGGLI, E. Ryanodine receptors: waking up from refractoriness. **Cardiovasc Res.**, v. 91, p. 563-564, 2011.

NIGGLI, E.; ULLRICH, N.D.; GUTIERREZ, D.; KYRYCHENKO, S.; POLÁKOVÁ, E. e SHIROKOVA, N. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca(2+) signaling and EC-coupling. **Biochim. Biophys. Acta.**, n. 1833, v. 4, p. 866-875, 2013.

OGATA, T. e ARAKI, K. Ultra-High Resolution Scanning Electron Microscopic Studies on the Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria in the Rat Cardiac and Skeletal Muscle Fibers. **Med. Electron. Microsc.**, v. 27, p. 232-235, 1994.

PICHT, E.; ZIMA, A.V.; SHANNON, T.R.; DUNCAN, A.M; BLATTER, L.A. e BERS, DM. Dynamic Calcium Movement Inside Cardiac Sarcoplasmic Reticulum During Release. **Circ. Res.**, v, 108, p. 847-856, 2011

PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P. e BABU, G.J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovasc. Res.**, v. 77, n. 2, p. 265-73, 2008.

POGWIZD, S.M.; SCHLOTTHAUER, K.; LI, L.; YUAN, W. e BERS, D.M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. **Circ. Res.**, v. 88, p. 1159-1167, 2001.

POTER, K.R.; PALADE, G.E. Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 3 p. 269-300, 1957.

PRASAD, V.; OKUNADE, G.W; MILLER, M.L. e SHULL, G.E. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 1192–1203, 2004.

RAMAY, H.R.; LIU, O.Z. e SOBIE, E.A. Recovery of cardiac calcium release is controlled by sarcoplasmic reticulum refilling and ryanodine receptor sensitivity. **Cardiovasc. Res.**, v. 91, p. 598-605, 2011.

REBBECK, R.T; KARUNASEKARA, Y.; BOARD, P.G.; BEARD, N.A.; CASAROTTO, M.G. e DULHUNTY, A.F. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: Who are the dancing partners? **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, in press, 2013.

ROKITA, A.G. e ANDERSON, M.E. New Therapeutic Targets in Cardiology Arrhythmias and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II (CaMKII). **Circulation**, v. 126, p. 2125-2139, 2012.

ROTHSCHUH, K. E. Ueber den aufbau des Herzmuskel aus elektrophysiologischen Elementen. **Ver. dtsh. ges. Kreislaufforsch.**, v. 16, p. 226-231, 1950.

ROTHSCHUH, K. E. Ueber der funktionellen Aufbau des Herzens aus elektrophysiologischen Elementen und uber den Mechanisms der Erregungsleitung im Herzens. **Pfluegers Arch. ges. Physiol.**, v. 25, p. 238-251, 1951.

SANCHES, P.C e MOFFA, P.J. **Eletrocardiograma normal e patológico**. Sao Paulo: Editora Roca, 2001.

SALAMEH, A.; DHEIN, S. Effects of mechanical forces and stretch on intercellular gap junction coupling. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1828, p.147–156, 2013.



SCHLOTTHAUER, K. e BERS, D.M. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. **Circ. Res.**, v. 87, p. 774-80, 2000.

SCRIVEN, D.R.L.; ASGHARI, P.; MOORE, E.D.W. Microarchitecture of the dyad. **Cardiovasc. Res.**, v. 98, p.169–176, 2013.

SELKURT, E. E. **Fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

SEED, W.A e WALKER, J.M. Relation between beat interval and force of the heartbeat and its clinical implications. **Cardiovasc. Res.**, v. 22, p. 303-314, 1988.

SHANNON, T.R.; GUO, T. e BERS, D.M. Ca<sup>2+</sup> Scraps: Local Depletions of Free [Ca<sub>2</sub>] in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum During Contractions Leave Substantial Ca<sup>2+</sup> Reserve. **Circ. Res.**, v. 93, p. 40-45, 2003.

SHAW, R.M. e COLECRAFT, H.M. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. **Cardiovasc. Res.** v. 98, p. 177–186, 2013.

SHAM, J.S.; SONG, L.S.; CHEN, Y.; DENG, L.H.; STERN, M.D.; LAKATTA, E.G. e CHENG, H. Termination of Ca<sup>2+</sup> release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. **PNAS**, v. 95, p. 15096-15101, 1998.

SHEIKH, F.; ROSS, R.S.; CHEN, J. Cell-Cell Connection to Cardiac Disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 19, p. 182–190, 2009.

SHKRYL, V.M.; MAXWELL, J.T.; DOMEIER, T.L.; BLATTER, L.A. Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release determines Ca<sup>2+</sup> alternans in atrial myocytes. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 302, p. H2310-2320, 2012.

SHIOYA, T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. **J. Physiol. Sci.**, v. 57, p. 327-35, 2007.

SJÖSTRAND, F.S.; ANDERSSON-CEDERGREN, E.; DEWEY, M.M. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. **Journal of Ultrastructure Research**. v.1, p. 271–287, 1958.

SOBIE, E.A.; DILLY, K.W.; CRUZ, J.S.; LEDERER, W.J. e JAFRI, M.S. Termination of cardiac Ca(2+) sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release. **Biophysical journal**, v. 83, p. 59-78, 2002.

SOBIE, E.A; SONG, L.S.; e LEDERER, W.J. Local recovery of Ca<sup>2+</sup> release in rat ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 565, p. 441-447, 2005.

SOBIE, E.A.; SONG, L.S. e LEDERER WJ. Restitution of Ca(2+) release and vulnerability to arrhythmias. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. Suppl 1, p. S64-S70, 2006.

SOELLER, C. e CANNELL, M.B. Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image - Processing Techniques. **Circ. Res.**, v. 84, p. 266-275, 1999.

STERN, M.D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. **Biophys. J.**, v. 63, p. 497-517, 1992.

SUZUKI, S.; ARAKI, J.; MORITA, T.; MOHRI, S.; MIKANE, T.; YAMAGUCHI, H.; SANO, S.; OHE, T.; HIRAKAWA, M.; e SUGA, H. Ventricular contractility in atrial fibrillation is predictable by mechanical restitution and potentiation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 275, p. H1513-H1519, 1998.

SZENTESI, P.; PIGNIER, C.; EGGER, M.; KRANIAS, E.G. e NIGGLI, E. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  refilling controls recovery from  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release refractoriness in heartmuscle. **Circ. Res.**, v. 95, p. 807-813, 2004.

TANAKA, H.; KAWANISHI, T. e SHIGENOBU, K. Optical Bioimaging: From Living Tissue to a Single Molecule: Atrio-Ventricular Difference in Myocardial Excitation Contraction Coupling - Sequential Versus Simultaneous Activation of SR  $Ca^{2+}$  Release Units. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 93, p. 248 – 252, 2003.

TANAKA, H.; MASUMIYA, H.; SEKINE, T.; KASE, J.; KAWANISHI, T.; HAYAKAWA, T.; MIYATA, S.; SATO, Y.; NAKAMURA, R. e SHIGENOBU, K. Involvement of  $Ca^{2+}$  waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes. **Life Sci.**, v. 70, p. 715-726, 2001.

TERENTYEV, D.; VIATCHENKO-KARPINSKI, S.; VALDIVIA, H.H.; ESCOBAR, A.L.; GYÖRKE, S. Luminal  $Ca^{2+}$  controls termination and refractory behavior of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in cardiac myocytes. **Circ. Res.**, v. 91, p. 414-20, 2002.

TOYOSHIMA, C.; NAKASAKO, M.; NOMURA, H. e OGAWA, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6Å resolution. **Nature**, v. 405, p. 447-455, 2000.

TSENG, G.N. Calcium current restitution in mammalian ventricular myocytes is modulated by intracellular calcium. **Circ. Res.**, v. 63, p. 468-482, 1988.

VALDIVIA, H.H.; KAPLAN, J.H., ELLIS-DAVIES, G.C. e LEDERER, W.J. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by  $Mg^{2+}$  and phosphorylation. **Science**, v. 267, 1997-2000, 1995.

VAN BREEMEN, V. L. Intercalated discs in Herat muscle studied with electron microscope. **Anat. Rec.**, v. 117, p. 49-56, 1953.

VAN PETEGEM, F. Ryanodine Receptors: Structure and Function. **JBC**, v. 287, p. 31624–31632, 2012.

VANDECASTEELE, G.; VERDE, I.; RÜCKER-MARTIN, C.; DONZEAU-GOUGE, P. e FISCHMEISTER, R. Cyclic GMP regulation of L-type  $Ca^{2+}$  channel current in human atrial myocytes. **J. Physiol.**, v. 533, n. 2, p. 329-340, 2001.

VARRO, A.; NEGRETTI, N.; HESTER, S.B.; EISNER, D.A. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. **Pflugers Arch.**, v. 423, p. 158-60, 1993.

VASSALLO, D. V. e STEFANON, I. Contratilidade Miocárdica In: **Fisiologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 368-391, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. e PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed editora, 2000.

VORNANEN, M. e SHEPHERD, N. Restitution of contractility in single ventricular myocytes of guinea pig heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 33, p. 611-622, 1997.

WAGNER, E.; LAUTERBACH, M.A.; KOHL, T.; WESTPHAL, V.; WILLIAMS, G.S.; STEINBRECHER, J.H.; et al. Stimulated emission depletion live-cell super-resolution imaging shows proliferative remodeling of T-tubule membrane structures after myocardial infarction. **Circ. Res.** v. 111, p. 402-414, 2012.

WIER, G. e YUE; D.T. intracellular calcium transients underlying the short-term force-interval relationship in ferret ventricular myocardium. **J. physiol.**, v. 376, p. 507-530, 1986.

WILLIAMS, D.A.; DELBRIDGE, L.M.; CODY, S.H.; HARRIS, P.J. e MORGAN, T.O. Spontaneous and propagated calcium release in isolated cardiac myocytes viewed by confocal microscopy. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C731-742, 1992.

WEIDMANN, S. Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart. **J. Physiol.**, v. 210, p. 1041, 1966.

XU, L. e MEISSNER, G. Mechanism of calmodulin inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). **Biophysical journal**, v. 86, p. 797-804, 2004.

ZYGMUNT, A.C. e GIBBONS, W.R. Properties of the calcium-activated chloride current in heart. **J. Gen. Physiol.**, v. 99, p. 391-414, 1992.

ZYGMUNT, A.C.; GOODROW, R.J. e WEIGEL, C.M.  $I_{NaCa}$  and  $I_{Cl(Ca)}$  contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H1979-1992, 1998.

ZIMA, A.V.; BOVO, E.; BERS, D.M. e BLATTER, L.A. Ca<sup>2+</sup> spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. **J. Physiol.**, v. 588, p. 4743-4757, 2010.