



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Alterações do acoplamento excitação-contração em camundongos
com hiperatividade simpática

Humberto Cavalcante Joca

Belo Horizonte – 2016

Humberto Cavalcante Joca

**Alterações do acoplamento excitação-contração em camundongos
com hiperatividade simpática**

Tese de Doutorado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz.

Belo Horizonte – 2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e esposa, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Zairton e Edneide, que sempre deram suporte e me encorajaram em todos os momentos da minha vida (acadêmica ou não). Ao Lucas e Daniela por todo o carinho e apoio;

A minha esposa Rebeca, que com amor e dedicação me ajuda e apoia em todas as horas. Aos caros Alberto e Antônia Maia, por sua generosidade e confiança. Aos meus amigos Felipe Cruz, Vanessa Torres, Wellington Ferreira, George Lacerda, Evson Guedes e Bruna Oliveira por incontáveis e inesquecíveis horas de diversão, confiança e afeto;

Aos professores e funcionários da pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia e farmacologia, pela paciência e esforço para transmitir seus conhecimentos e manter o funcionamento e organização dessa incrível pós-graduação;

Aos meus colegas do Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular, Flávio Henrique Pequeno, Leidiane Pinho, José Felipe, Maryê Carneiro, Roberta Santos e Tatiane Barreto por todo esse tempo de amizade e compartilhado conhecimento;

Aos sábios conselhos, orientações e a amizade de Dr. Walber Ferreira, Dra. Kerly Shamyra, Dr. Daniel Lobo, Dr. Danilo Roman Campos, Dr. Antonio Nei Gondim, Dr. Alex Ferraz, Dra. Andreлина Noronha e Dr. José Henrique Leal Cardoso;

Aos colegas do Biomedical Engineering and Technology, da University of Maryland. Pelo imenso aprendizado que tive durante minha estada no exterior. Aos brilhantes Dr. Christopher C. Ward e W. Jonathan Lederer, que generosamente me cederam seu tempo e recursos para a realização do meu estagio sanduiche;

Aos amigos Artur dos Santos Miranda, Julliane Joviano e José Narciso Fernandes, que foram fundamentais para execução dos experimentos realizados durante todo esse trabalho.

A Dra. Patricia Chakur Brum, da Universidade de São Paulo, que gentilmente cedeu os animais para execução do projeto além de dar seu apoio incondicional em todo o processo.

Ao meu orientador Dr. Jader dos Santos Cruz, por todos esses anos de ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro das pesquisas do Laboratório de Membranas Excitáveis e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CNPq pela bolsas de estudos que permitiu minha total exclusividade a esse trabalho.

RESUMO

O sistema nervoso simpático é essencial para manutenção da função cardíaca através da ativação dos receptores adrenérgicos pós-juncionais, porém a ativação desses receptores também tem efeitos deletérios em longo prazo, tais como induzir hipertrofia e contribuir para o desenvolvimento progressivo da insuficiência cardíaca. O presente trabalho visa analisar os possíveis efeitos deletérios no acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos ventriculares de camundongos com hiperatividade simpática através do duplo knock-out dos receptores adrenérgicos $\alpha 2A$ e $\alpha 2C$ (DKO). Para isso foram utilizados camundongos machos DKO em um fundo genético C57BL6/J e os seus controles selvagens (WT) com idades de 3 a 7 meses. Os cardiomiócitos foram isolados enzimaticamente como descrito previamente, e o registro da contratilidade foi realizado em sistema de detecção de borda por uma câmera CCD, os registros eletrofisiológicos foram realizados através da técnica de patch-clamp e os transientes de cálcio e os níveis de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico foram monitorados utilizando microscopia confocal e de fluorescência, respectivamente. Aos 7 meses, quando comparados com o WT ($p < 0,05$; ANOVA seguido por Tukey), os cardiomiócitos dos animais DKO apresentam diversas modificações na contratilidade tais como uma redução na fração de encurtamento (DKO: $6,4 \pm 0,3\%$ / WT: $9,5 \pm 0,8\%$) e o aumento no tempo para 50% do relaxamento (DKO: $49,8 \pm 2,0\%$ / WT: $41,2 \pm 1,0\%$). Além disso, as células DKO tem diversas modificações eletrofisiológicas tais como o prolongamento do potencial de ação - PA (50% da repolarização - DKO: $14,8 \pm 1,3$ ms / WT: $7,2 \pm 0,7$ ms), redução na densidade na corrente de cálcio DKO: $-9,6 \pm 0,6$ A/F / WT: $-14,3 \pm 0,6$ A/F) e na corrente de potássio (DKO: $39,6 \pm 3,2$ A/F / WT: $55,6 \pm 2,9$ A/F). Associado a redução observada na contratilidade e nas correntes de cálcio, o transiente de cálcio dos animais DKO se apresentam reduzidos (DKO: $2,7 \pm 0,4$ F/F0 / WT: $3,2 \pm 0,5$ F/F0) e com decaimento mais lento (50% do decaimento - DKO: $185,5 \pm 3,9$ ms / WT: $148,9 \pm 2,5$ ms). Não ocorreram modificações no potencial de repouso, na amplitude do PA e na densidade de corrente dos retificadores de entrada. Os cardiomiócitos dos animais DKO também apresentaram maiores níveis de espécies reativas de oxigênio, entretanto sem alteração dos níveis de óxido nítrico. Já os cardiomiócitos de animais DKO com 3 meses de vida não apresentam qualquer tipo de alteração nos parâmetros da contratilidade e no PA quando comparados com os miócitos de animais WT. Em conclusão, hiperatividade simpática crônica modifica o acoplamento excitação-contração cardíaco, alterando a densidade de diversas correntes iônicas (e assim a repolarização do PA), as quais se correlaciona diretamente com a atividade contrátil e dinâmica do cálcio. Isso demonstra o papel importante

do aumento da atividade simpática no remodelamento eletrofisiológico que ocorre nas disfunções cardíacas.

Palavras-chave: Acoplamento Excitação-Contração, Canais de cálcio, Canais de Potássio, Potencial de Ação, Atividade simpática.

ABSTRACT

The sympathetic nervous system is essential for maintenance of cardiac function via activation of post-junctional adrenergic receptors. However, adrenergic receptor activation also has deleterious long-term effects, inducing hypertrophy and contribute to the progressive development of heart failure. This study aims analyze the possible deleterious effects in the excitation-contraction coupling in ventricular cardiomyocytes of mice with sympathetic hyperactivity through the double knock-out adrenoceptor $\alpha 2A$ and $\alpha 2C$ (DKO). We used male DKO mice in a genetic background C57BL6 / J and wild-type controls (WT) mice aged 3 to 7 months. Cardiomyocytes were isolated enzymatically as described previously, and the record of cellular contractility was performed in edge detection system by a CCD camera, the electrophysiological recordings were performed using the patch-clamp technique and calcium transient and levels of reactive species oxygen and nitric oxide were monitored using confocal and fluorescence microscopy, respectively. At 7 months, when compared to the WT ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey), cardiomyocytes of DKO animals show various changes in contractility such as a reduction in fractional shortening (DKO: $6.4 \pm 0.3\%$ / WT: $9.5 \pm 0.8\%$) and the increase in the time for 50% relaxation (DKO: $49.8 \pm 2.0\%$ / WT: $41.2 \pm 1.0\%$). Furthermore, DKO cells has several electrophysiological changes such as prolongation of action potential - AP(50% repolarization - DKO: 14.8 ± 1.3 ms / WT: 7.2 ± 0.7 ms), reduction in the density of the calcium current (DKO: -9.6 ± 0.6 A/F / WT: -14.3 ± 0.6 A/F) and potassium current (DKO: 39.6 ± 3.2 A/F / WT: 55.6 ± 2.9 A/F). Associated with observed reduction in contractility and the calcium currents, the calcium transient from DKO animals was reduced (DKO: 2.7 ± 0.4 F / F₀ / WT: 3.2 ± 0.5 F / F₀) and with slower decay (50% decay - DKO: 185.5 ± 3.9 ms / WT: 148.9 ± 2.5 ms). There were no changes in resting potential, amplitude of the AP and current density of the inward rectifiers. DKO cardiomyocytes also had higher levels of reactive oxygen species, however without changing the nitric oxide levels. On other hand, DKO cardiomyocyte of 3 months-old mice did not show any change in the parameters of AP and cellular contractility compared to WT myocytes. In conclusion, chronic sympathetic hyperactivity impairs cardiac excitation-contraction coupling, by changing the density of several ionic currents (and thus AP repolarization), which correlates directly with the calcium dynamics and contractile activity. This demonstrates the important role of increased sympathetic activity in the electrophysiological remodeling that occurs in cardiac dysfunction.

Keywords: Excitation-contraction coupling, calcium channels, potassium channels, action potential, sympathetic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização básica do sistema cardiovascular.....	16
Figura 2. Organização do sistema de condução do coração.....	17
Figura 3. Potencial de ação em diferentes regiões do coração contribuem para o ECG.....	19
Figura 4. Estrutura do miofilamentos em miócitos cardíacos.....	20
Figura 5. Formação das pontes cruzadas.....	22
Figura 6. Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes.....	25
Figura 7. Estrutura básica dos canais dependentes de voltagem.....	27
Figura 8. Arranjo molecular dos canais dependentes de voltagem.....	31
Figura 9. Controle da concentração de cálcio intracelular em células cardíacas.....	35
Figura 10. Frequência cardíaca e pressão arterial média dos animais WT e DKO.....	54
Figura 11. Traçado representativo da contração celular dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) induzida 1 Hz de frequência de estímulo.....	55
Figura 12. A hiperatividade simpática causa déficit contrátil.....	56
Figura 13. Traçado representativo da corrente de cálcio dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza).....	58
Figura 14. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam menor corrente de cálcio (A e C) em comparação ao grupo WT.....	59
Figura 15. Dependência de voltagem das correntes de cálcio do tipo L.....	60
Figura 16 - Imagem representativa do transiente de cálcio dos animais WT e DKO.....	61
Figura 17. Parâmetros do transiente de cálcio.....	61
Figura 18. Traçado representativo do potencial de ação dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza).....	62
Figura 19. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam prolongamento do PA.....	63
Figura 20. A hiperatividade simpática crônica reduz a corrente de saída de potássio.....	65
Figura 21. A hiperatividade simpática crônica reduz a corrente transiente rápida de saída de potássio.....	66

Figura 22. A hiperatividade simpática crônica não altera as correntes de potássio retificadoras de entrada dos cardiomiócitos.....	67
Figura 23. Corrente e expressão do NCX.....	69
Figura 24. Níveis de ROS e NO.....	70
Figura 25. Níveis de fluorescência das sondas DAF (A) e DCF (B) em células isoladas de animais WT e DKO.....	71
Figura 26. Traçado representativo da contração celular dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) com 3 meses.....	72
Figura 27. Traçado representativo do potencial de ação dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) com 3 meses.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_i - concentração de Ca²⁺ intracelular

ACE - enzima conversora de angiotensina

actina F - actina filamentosa

actina G - monômeros globulares de actina filamentosa

AD - átrio direito;

AE - átrio esquerdo;

AM - acetoximetil

AP - artéria pulmonar;

AV - Nó atrioventricular

BSA - albumina bovina sérica

CaMKII - Proteína Cinase II dependente de Ca²⁺ / calmodulina

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

CaVL - canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L

CEUA - UFMG - Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Minas Gerais

CIB - solução livre de cálcio

cTnC - troponina cardíaca C

cTnI - troponina cardíaca I

cTnT - troponina cardíaca T

DKO - camundongos duplo knock-out dos receptores adrenérgicos α 2A e α 2C

ECG - eletrocardiograma

FC - frequência cardíaca

IK1 - canais de potássio retificadores de entrada

IKS - canais de potássio dependentes de voltagem com uma cinética de ativação lenta

Ito_f - corrente transitória de saída de potássio rápida

Ito_s - correntes transitória de saída de potássio lenta

jRS - membrana do RS juncional

KV - canais de potássio dependentes de voltagem

LC - cadeias leves de miosina

LCIC - liberação de cálcio induzida por cálcio

MHC - cadeias pesadas de miosina

MyBP-C - proteína C ligada à miosina

NaV - canais para sódio dependentes de voltagem
NaX - décima isoforma da subunidades α de canais para sódio
NCX - Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NFAT - fator nuclear de célula T ativadas
PA - potencial de ação
PAM - pressão arterial média
PKA - Proteína Cinase A
PKA - proteína cinase dependente de cAMP
PLB - fosfolambano
PMCA - Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática
RS - retículo sarcoplasmático
RYR2 - receptores de rianodina do tipo 2
SA - Nó sinoatrial;
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SCN5A - mutação no canal NaV 1.5
SERCA - transportador ativo cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SNA - sistema nervoso autônomo
SNP - sistema nervoso parassimpático
SNS - sistema nervoso simpático
TEA - Tetraetilamônio
Tm - tropomiosina
Tn - troponina
VD - ventrículo direito;
VE - ventrículo direito
WT - camundongos machos controles selvagens
XB - filamentos grossos
 β 1AR - receptores adrenérgicos do subtipo β isoforma 1
 β 2AR - receptores adrenérgicos do subtipo β isoforma 2
 β 3AR - receptores adrenérgicos do subtipo β isoforma 3
 β AR - receptores adrenérgicos do subtipo β

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solução interna usada para o registro do Potencial de ação.....	48
Tabela 2. Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes de potássio.....	49
Tabela 3. Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes de cálcio.....	49
Tabela 4. Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes do trocador sódio-cálcio.....	50
Tabela 5. Peso corporal e relação peso do coração / peso corporal dos animais com 7 meses.....	54
Tabela 6. Parâmetros da contratilidade celular dos animais WT e DKO com 7 meses de idade.....	57
Tabela 7. Parâmetros da corrente de cálcio do tipo L nos cardiomiócitos dos animais WT e DKO.....	58
Tabela 8. Parâmetros do potencial de ação dos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 7 meses de idade.....	64
Tabela 9. Parâmetros das correntes de potássio nos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 7 meses.....	68
Tabela 10. Peso corporal e relação peso do coração / peso corporal dos animais com 3 meses.....	71
Tabela 11. Parâmetros da contratilidade celular dos animais WT e DKO com 3 meses de idade.....	74
Tabela 12. Parâmetros do potencial de ação dos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 3 meses de idade.....	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CORAÇÃO	16
1.2 ESTRUTURA DO MIÓCITO CARDÍACO	19
1.3 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO CARDÍACO.....	24
1.3.1 POTENCIAL DE AÇÃO E CANAIS IÔNICOS	24
1.3.2 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INDUZIDA POR CÁLCIO	31
2 JUSTIFICATIVA.....	42
3 OBJETIVO GERAL	44
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	45
4.2 ANIMAIS	45
4.3 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	45
4.4 OBTENÇÃO DOS CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS	46
4.5 REGISTROS DE CONTRATILIDADE CELULAR E ELETROFISIOLOGIA	47
4.6 MICROSCOPIA CONFOCAL E DE FLUORESCÊNCIA.....	50
4.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	51
4.8 ANÁLISE DOS DADOS	52
5 RESULTADOS	54

6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÃO	84
REFERENCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO CORAÇÃO

A função primordial do sistema cardiovascular é manter, através de um fluxo sanguíneo ininterrupto a distribuição de nutrientes e oxigênio necessários para os diversos órgãos e sistemas do corpo. Para essa tarefa, o sistema cardiovascular se estrutura de forma análoga a um sistema hidráulico comum, o qual é formado por uma bomba (coração), tubos de distribuição de alta pressão (artérias e arteríolas), locais para permuta (capilares) e um circuito de coleta de baixa pressão (veias e vênulas). O coração desempenha o seu papel propulsor do sangue devido a sua função contrátil que permite bombear o sangue através de vários tipos de vasos estão dispostos em série, que retorna ao coração, formando um circuito fechado. A Figura 1 mostra que o coração é formado por duas bombas em série: A parte direita que impulsiona o sangue para a circulação pulmonar onde ocorre as trocas gasosas, e a outra, a parte esquerda que propulsiona o sangue para a circulação sistêmica (para nutrir os tecidos). Cada bomba é subdividida em duas cavidades, uma superior, o átrio, e uma inferior, o ventrículo, sendo este o principal responsável pela função mecânica do coração (Klabunde, 2005).

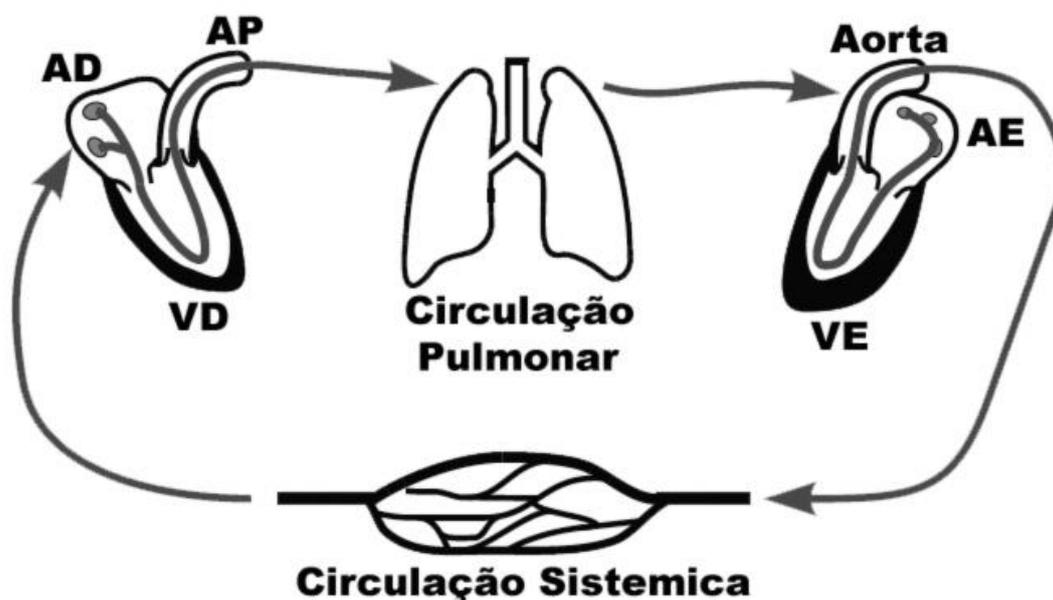


Figura 1. Organização básica do sistema cardiovascular. AD, átrio direito; VD, ventrículo direito; AP, artéria pulmonar; AE, átrio esquerdo; VE, ventrículo esquerdo (Klabunde, 2005).

Como uma bomba, o coração propõe o sangue para a circulação de forma contínua e ininterrupta. O período entre o início de um batimento até o início de um novo é chamado de ciclo cardíaco, este evento é dividido em duas fases, que é compreendido como a sucessão de eventos elétricos e mecânicos ocasionados pelo relaxamento, denominado de diástole (quando o coração se enche de sangue), e contração, denominada de sístole (quando ocorre a ejeção do sangue para a circulação). Para que a função cardíaca seja adequada frente as demandas dos diversos tecidos se fazem necessários diversos mecanismos de controle finamente orquestrados a cada ciclo cardíaco. Esses mecanismos de controle podem ser intrínsecos ou extrínsecos, e sendo de natureza mecânica, elétrica ou neuroendócrina (Berne *et al.*, 2004).

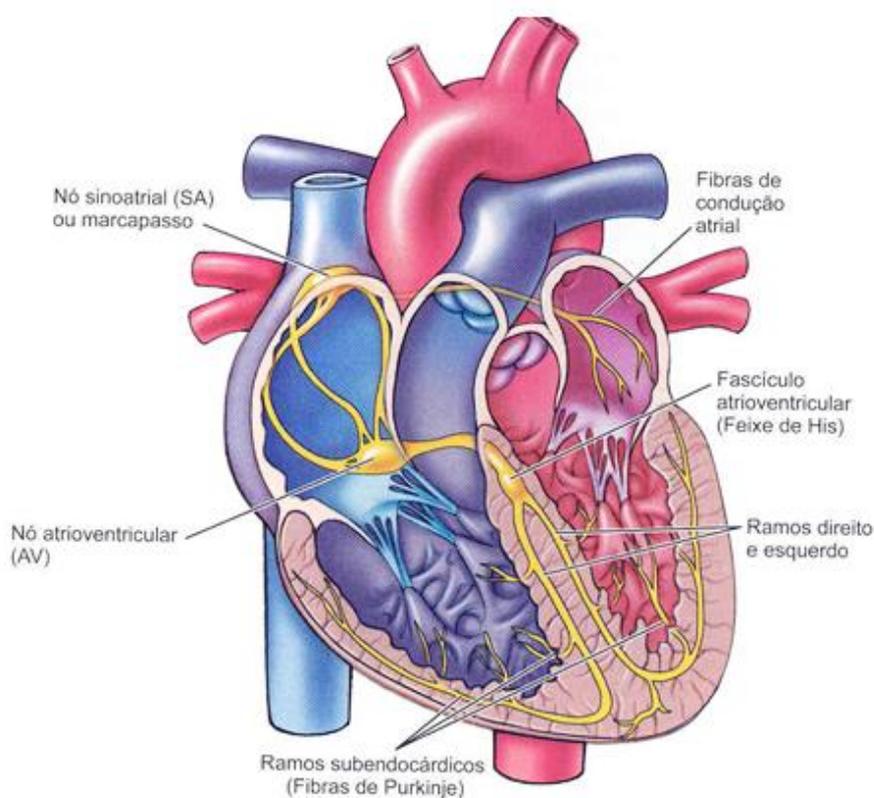


Figura 2. Organização do sistema de condução do coração. SA, Nó sinoatrial; AV, Nó atrioventricular.

A atividade contrátil do coração é iniciada por potenciais de ação gerados e conduzidos por células especializadas (que forma o sistema de condução do coração) do miocárdio

permitindo que o órgão funcione como um sincício (Figura 2). A atividade autorítmica do coração é provida pelas células marcapasso, que geram potenciais de ação de forma cíclica e sem necessidade de qualquer estímulo extrínseco. Em situações fisiológicas, o ciclo elétrico é iniciado pelas células marcapasso do nó sinoatrial e conduzidas pelos átrios direito e esquerdo (através de fibras de condução atrial), causando a sístole atrial. O impulso elétrico segue para o nó atrioventricular, onde sofre um retardo devido à baixa velocidade de condução dessa área. Em seguida o estímulo continua através feixe de His, que se divide ao longo do para o ramo direito e ramo esquerdo. O impulso avança até as fibras de Purkinje, o último componente do sistema de condução cardíaco, que despolariza os ventrículos e inicia a sístole ventricular. O Feixe de His e as fibras de Purkinje tem alta velocidade de condução que permite uma rápida condução do impulso por toda extensão dos ventrículos, assim garantindo uma atividade contrátil sincronizada e maior eficiência da sístole ventricular (Berne *et al.*, 2004).

Devido a atividade elétrica sincrônica das células excitáveis do coração, é gerado um campo elétrico que se propaga através do corpo, causando diferenças de potencial que podem ser mensuradas por eletrodos colocados sobre a superfície corpórea. O registro da atividade elétrica do coração utilizando eletrodos na superfície corpórea é denominado de eletrocardiograma (ECG). O registro das diversas ondas do ECG só é possível porque a atividade elétrica se inicia nas diferentes regiões do tecido cardíaco em momentos distintos, de tal modo que não se sobrepõem no registro eletrocardiográfico (Sanches e Moffa, 2011).

O traçado eletrocardiográfico típico contém as ondas P, T e o complexo QRS, onde cada um representa eventos elétricos em cada região do coração (Figura 3). A onda P é associada à soma das despolarizações atriais iniciada pela ativação do nó sinoatrial. O segmento PR é o intervalo entre a despolarização atrial e a ventricular. Durante esse período ocorre a ativação do nó atrioventricular, feixe de His e fibras de Purkinje. Já o complexo QRS é formado por três ondas distintas: Q, R e S, onde a formação coincide com a fase de despolarização dos miócitos

ventriculares, enquanto que a onda T representa a sua repolarização. O tempo compreendido do início do QRS até o final da onda T, é chamado de intervalo QT. Esse intervalo está intimamente correlacionado à duração do potencial de ação dos miócitos ventriculares (Figura 3) e representa a fase de “sístole elétrica” dos ventrículos (Sanches e Moffa, 2011).

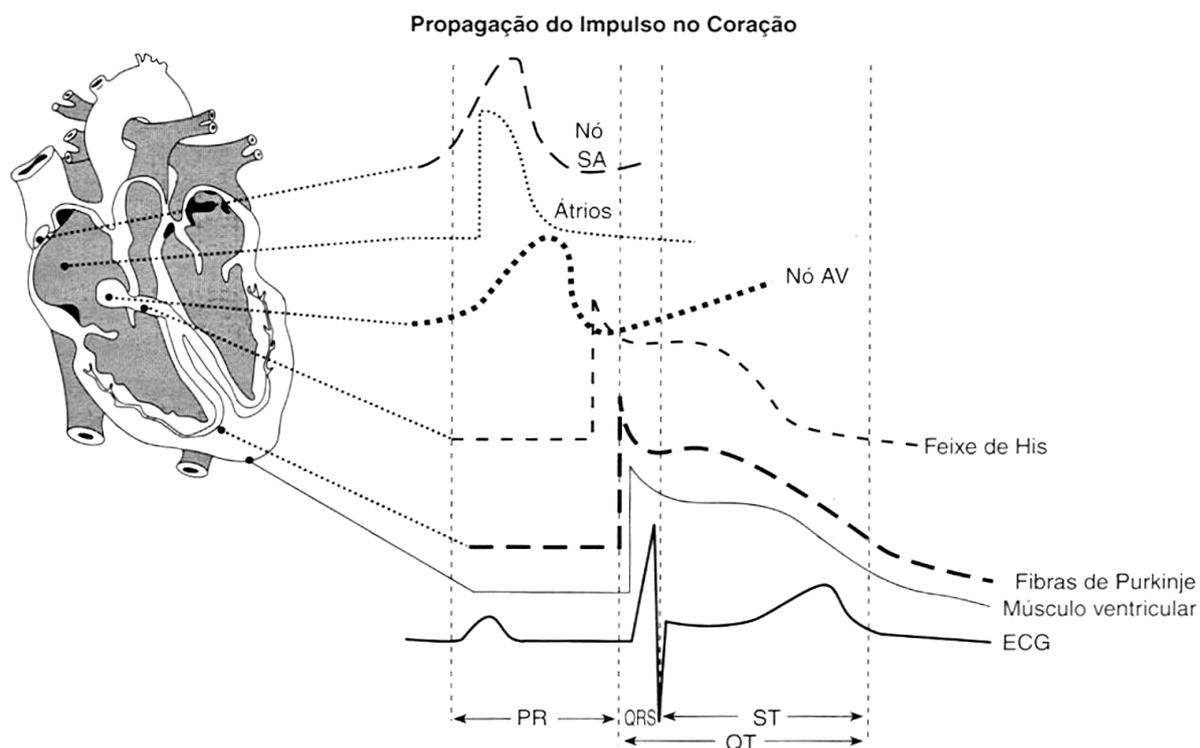


Figura 3. Potencial de ação em diferentes regiões do coração contribuem para o ECG. Os potenciais de ação gerados e propagados pelas diferentes regiões do miocárdio contribuem para o registro eletrocardiográfico (Traçado inferior). Modificado de Sanches e Moffa (2001).

1.2 ESTRUTURA DO MIÓCITO CARDÍACO

Os miócitos cardíacos são células excitáveis tem como função primordial contrair quando estimuladas. O miocárdio é formado por vários miócitos individuais que estão acoplados entre si elétrica e mecanicamente (através dos discos intercalares). Isso permite o tecido cardíaco funcione como um sincício, sendo estimulado e contraindo quase simultaneamente ao longo de todo o tecido.

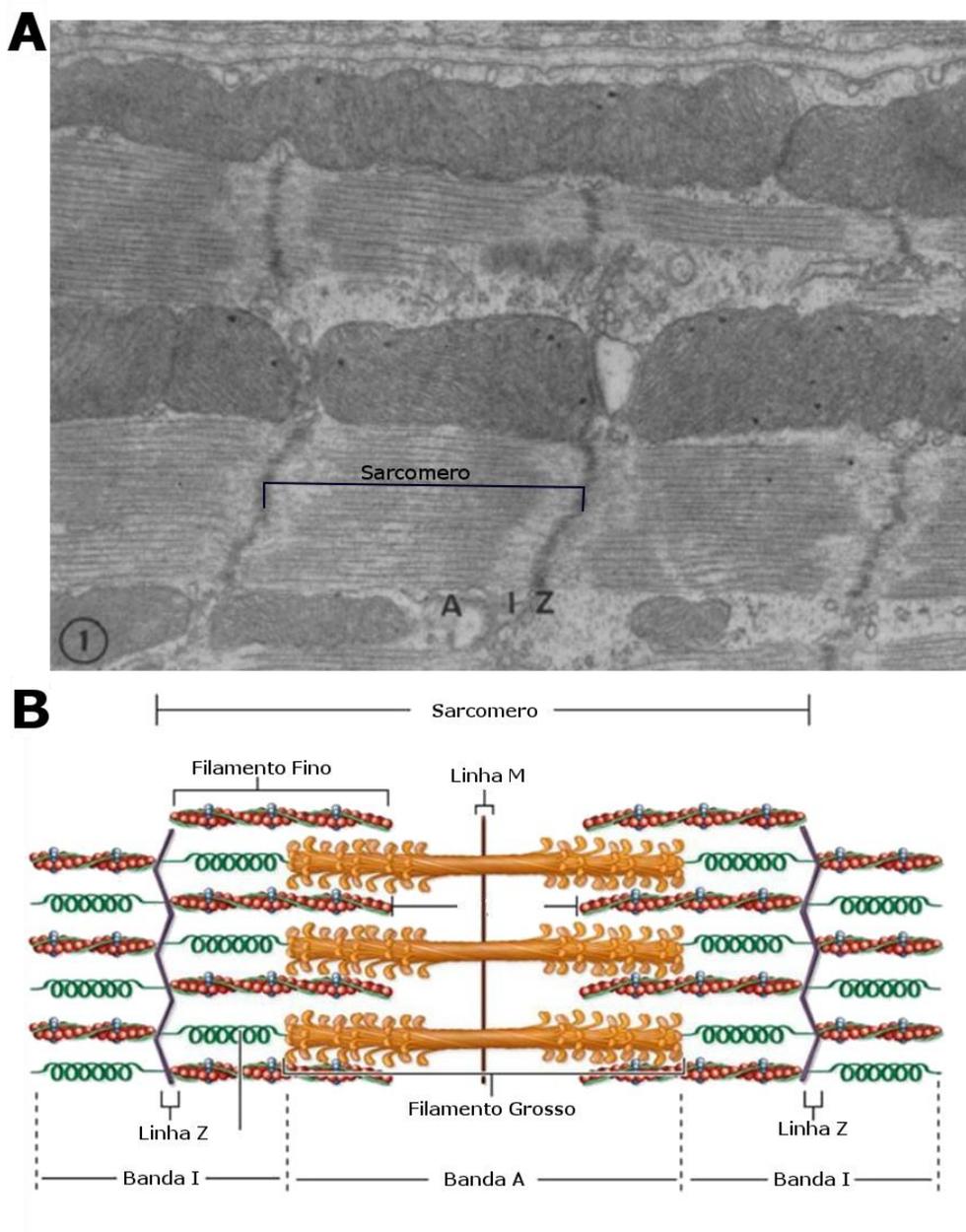


Figura 4. Estrutura do miofilamentos em miócitos cardíacos. Painel A mostra uma imagem de microscopia eletrônica do tecido cardíaco, mostrando a organização “estriada” dos sarcômeros e as respectivas bandas A e I juntamente com a linha Z; Modificado de (Stenger e Spiro, 1961). No painel B é mostrado uma figura esquemática da organização básica dos filamentos no sarcômero das células musculares cardíacas.

A figura 4A apresenta uma imagem de microscopia eletrônica do tecido cardíaco onde é possível notar estrias regularmente espaçadas (aproximadamente 2 μm) característica marcante do musculo estriado em geral, seja ele cardíaco ou esquelético. Essas unidades repetidas são denominadas de sarcômeros, delimitada entre duas linhas Z, que são responsáveis pela atividade contrátil do musculo estriado. No painel B da figura 4 é mostrado um desenho

esquemático da organização básica dos filamentos no sarcômero das células musculares cardíacas. Os miofilamentos são subdivididos em filamentos finos e grossos, os quais tem como principais proteínas a actina e miosina, respectivamente. Esses dois filamentos interagem entre si, causando um encurtamento do sarcômero que resulta na contração muscular (mecanismo que será discutido posteriormente). Os filamentos finos são constituídos por α -actina, nebulina (no coração representada principalmente pelo homólogo nebulette), e as proteínas reguladoras tropomiosina e o complexo de troponinas (C, I e T). A actina está presente na sua forma filamentosa (actina F) formada por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) em dupla hélice, onde cada cadeia de actina G se ancora à linha Z. A troponina (Tn) é um complexo heterotrimérico composto por três isoformas distintas: 1) troponina cardíaca C (cTnC), que possui sítios de ligação para o Ca^{2+} ; 2) troponina cardíaca I (cTnI), que cobre o sítio de interação da actina com a miosina e 3) troponina cardíaca T (cTnT), que é uma proteína se ancora à tropomiosina. A tropomiosina é filamento longo com duas cadeias polipeptídicas dobradas em dupla hélice, que junto com a troponina bloqueia o sítio de interação actina-miosina em condições de baixo Ca^{2+} intracelular (Berne *et al.*, 2004; Hinken e Solaro, 2007).

Os filamentos grossos são constituídos filamentos de miosina, cada um deles formado por duas cadeias pesadas (MHC) e dois pares de cadeias leves (LC), juntamente com a proteína C ligada à miosina (MyBP-C) e a titina. A MHC contém uma porção globular (conhecida também como Cabeça) onde reside o sítio de ligação com a actina e o sítio catalítico para o ATP. No coração de mamíferos é encontrado duas isoformas da MHC, α e β -MHC. O par de MHC podem formar um homodímero (duas cadeias α ou duas β) ou um heterodímero (uma α e uma β), sendo o homodímero $\alpha\alpha$ -MHC (ou miosina V_1) o mais predominante em pequenos roedores e a homodímero $\beta\beta$ -MHC (miosina V_3) sendo mais comum em humanos e mamíferos de grande porte. Cada MHC é ligada a uma cadeia leve regulatória e uma cadeia leve essencial. As cadeias leves ajudam a estabilizar e também papel regulatório na sensibilidade ao Ca^{2+} e na

velocidade de contração. Já a MyBP-C parece alterar a sensibilidade ao Ca^{2+} , modular a velocidade e força de contração. Ligada aos filamentos de miosina encontra-se a titina, que ancora os filamentos nas linhas M a Z. A titina tem uma parte extensível (localizada na banda I) formada pelas regiões PEVK (rica em prolina, glutamato, valina e lisina), uma região repetitiva de imunoglobulina (Ig) e uma região ajustável N2B. Essas três regiões formam a região “mola” que contribui para manter o sarcômero íntegro mesmo em situações de estiramento como no enchimento ventricular fisiológico (Hinken e Solaro, 2007; Hanft *et al.*, 2008).

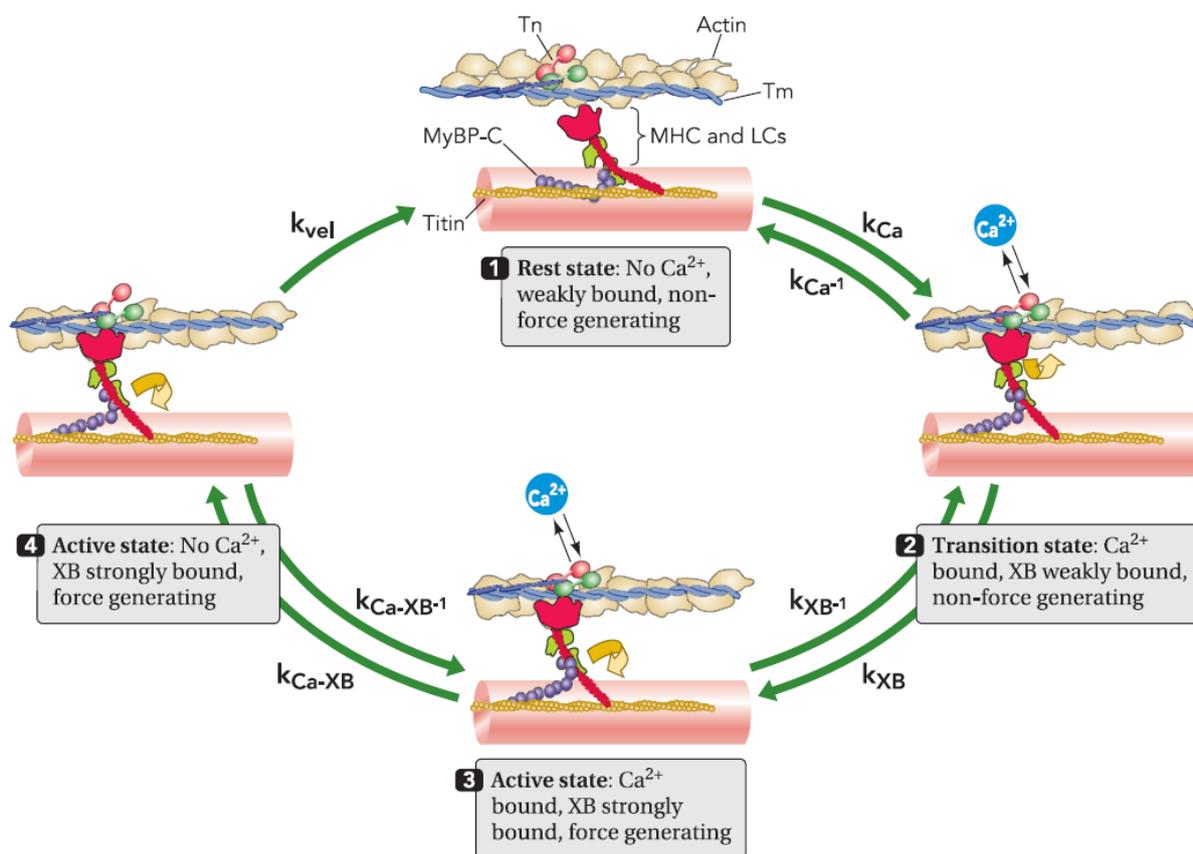


Figura 5. Formação das pontes cruzadas. Os filamentos finos de actina são mostrados com as proteínas reguladoras tropomiosina (Tm) e a troponina (Tn) com a unidade de ligação ao Ca^{2+} (cTnC) mostrado em vermelho, a unidade ligação à Tm (cTnT), em azul, e a unidade inibitória (cTnI) em verde. As pontes cruzadas dos filamentos grossos (XB) são mostrados com cadeia pesada de miosina e cadeias leves conjuntamente com a proteína C ligada à miosina (MyBP-C) e titina (Hinken e Solaro, 2007).

Durante a diástole as pontes cruzadas estão inicialmente fracamente ligadas em um estado de repouso que não gera força (Estado 1, figura 5). No estado de repouso, a concentração

de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) é baixa (em torno de 10^{-7} M), sendo que os sítios de ligação na cTnC ficam livres e assim a cTnI forma um complexo com ambos actina e cTnT. Isso reduz a afinidade da actina para miosina e a mantém a tropomiosina em uma posição que bloqueia a sítios de ligação na actina para as pontes cruzadas. O desencadeamento da geração de força e contração é iniciada por um estímulo elétrico que desencadeia o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e sua ligação com a cTnC, processo esse denominado acoplamento excitação contração (discutido a seguir). Com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ faz com que as pontes cruzadas e filamentos finos possam entrar em um estado de transição (Estado 2; Figura 5) determinado pela taxas de ligação (k_{Ca}) e desligamento ($k_{\text{Ca-1}}$) do Ca^{2+} com a cTnC. Este estado de "transição" envolve um aumento na ligação de cTnI para cTnC, o que alivia a inibição sobre a actina, e deslocamento da tropomiosina (causado pela cTnT) que desbloqueia os sitio de ligação do filamento fino. Estas alterações no filamento fino permitem a formação das pontes cruzadas (ligação actina-miosina), sendo esse um estado fortemente ligado e gerador de força (estado 3; Figura 5). As taxas de transição do estado 2 para o estado 3 (Figura 5; k_{XB} e $k_{\text{XB-1}}$), são determinadas por diversos aspectos que incluem a magnitude e tipo sobrecarga sobre o músculo e se correlacionam com a liberação dos produtos da hidrólise de ATP pela cabeça da miosina (ADP e Pi). Um aspecto importante é que no estado 3, as pontes cruzadas fortemente ligadas também induzem um ativação cooperativa do filamento fino que aumenta a afinidade do cTnC ao Ca^{2+} . Este mecanismo de ativação parece ser particularmente importante no miócitos cardíaco em comparação com o músculo esquelético, onde mudanças relativamente pequenas na relação da ligação das pontes cruzadas com a sensibilidade ao Ca^{2+} . A consequência destes mecanismos de cooperação é ilustrada por estado 4 na Figura 5, que indica que certa parte da população de pontes cruzadas permanece na ativa, ou seja, gerando força mesmo com a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hinken e Solaro, 2007; Hanft *et al.*, 2008).

1.3 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO CARDÍACO

O acoplamento excitação-contração é o processo que interliga a geração da atividade elétrica (Potencial de ação) com a atividade contrátil. Nesse processo, o Ca^{2+} atua como o principal segundo mensageiro intracelular que ativa os miofilamentos gerando a contração muscular. Sendo esse íon essencial para esse processo, as células musculares (em especial os miócitos cardíacos) tem mecanismos complexos para o manejo intracelular de Ca^{2+} . As células cardíacas apresentam muitos canais e transportadores no sarcolema (membrana plasmática da células musculares) que auxiliam o controle dos níveis de Ca^{2+} intracelular seja por transporte direto desse íon ou por modular o potencial transmembrana; o retículo sarcoplasmático (RS), retículo endoplasmático liso da células musculares, que armazena uma grande quantidade de Ca^{2+} para sua liberação maciça e breve durante a sístole onde na membrana dessa organela é encontrado diversos reguladores dos níveis de Ca^{2+} . A seguir serão discutidos os mecanismos de geração do potencial de ação em células cardíacas e como esse sinal inicia a liberação de Ca^{2+} e contração muscular.

1.3.1 POTENCIAL DE AÇÃO E CANAIS IÔNICOS

A permeabilidade dos íons através do sarcolema é possível graças a proteínas integrais de membrana denominadas de canais iônicos. Essas proteínas formam poros por onde ocorre a difusão dos íons de um lado para o outro da membrana, de acordo com o gradiente eletroquímico para o íon que é permeável pelo poro (Hille, 2001). Há uma grande variedade de canais iônicos. Uma das formas de classificação dessas proteínas é de acordo com detalhes do seu funcionamento. Alguns canais ativam, permitem a passagem de íons, com a ligação de determinado agente químico ao próprio canal ou por vias de segundo mensageiro, enquanto outros são ativados por mudanças no potencial transmembrana. Estes últimos são chamados de canais dependentes de voltagem. Os canais podem ser classificados também pelo íon ao qual são permeáveis. Alguns canais permitem que apenas um tipo particular de íon passe através

dele, como o Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ou Cl^- . Outros são seletivos a um grupo de íons, como cátions monovalentes ou cátions em geral (Aidley, 1996).

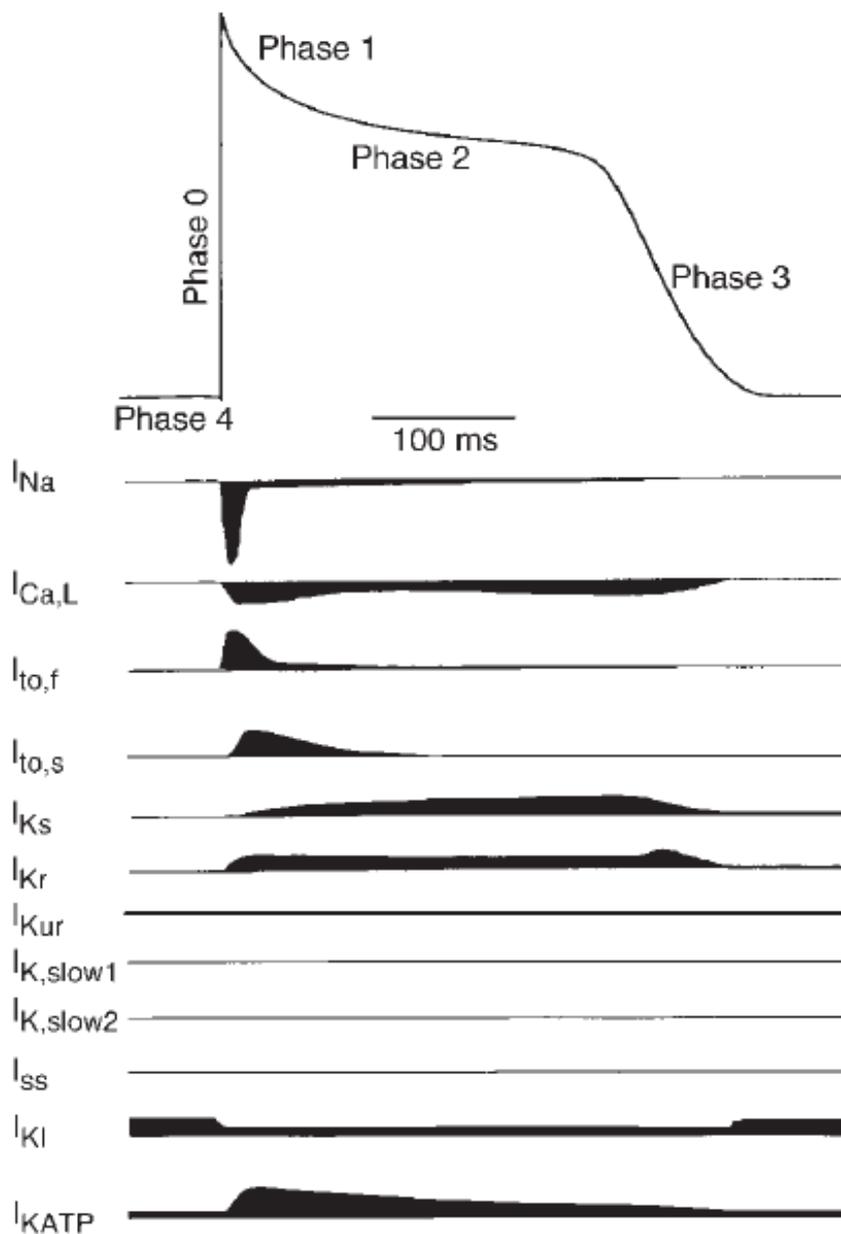


Figura 6. Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes. Fases do potencial de ação cardíaco e as principais correntes envolvidas (traçados inferiores) em cada fase (Nerbonne e Kass, 2005).

Os canais dependentes de voltagem apresentam papel essencial na função dos miócitos cardíacos, pois a geração do potencial (PA) de ação é dependente da atividade desses canais. O

PA é caracterizado por uma alteração transitória no potencial transmembrana chegando a valores positivos e retornando posteriormente ao potencial de repouso. O fenômeno pode durar de dezenas até centenas de milissegundos, dependendo da região do miocárdio e a espécie estudada. O PA é gerado quando algum estímulo despolariza a membrana o suficiente para atingir o valor limiar do PA. Esse valor limiar está relacionado diretamente com a ativação dos canais para sódio dependentes de voltagem (Na_v). Quando o estímulo não for suficiente para atingir o limiar, há apenas respostas locais e o PA não é deflagrado (Aidley, 1998).

A Figura 6 mostra um traçado típico do PA de um miócito ventricular humano juntamente com as correntes envolvidas em cada fase do PA. O formato do PA é dado pela ativação e inativação ou fechamento (estados não condutores) sequencial de diversos canais dependentes de voltagem no sarcolema. As fases do PA podem ser assim classificadas da seguinte forma (Nerbonne e Kass, 2005):

Fase 0: Ou conhecida como fase de despolarização, caracterizada pela abertura maciça dos Na_v e início da abertura do componente rápido da corrente transitória de saída de potássio (I_{to_f}).

Fase 1: Também conhecida como repolarização inicial, Nessa fase contribuem de forma mais ativa a I_{tof} e também ocorre a inativação dos Na_v (o que diminui a sua condutância). Devido a despolarização ocorrida na fase 0, tem início a ativação canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Ca_vL). A entrada do cálcio por estes canais é responsável pela ativação da maquinaria contrátil da célula.

Fase 2: Ou fase de platô, A ativação da corrente de cálcio iniciada na fase 1 é mantida na fase 2 junto com a inativação da I_{tof} . Isso que mantém o potencial transmembrana despolarizado, característica principal do platô no PA cardíaco. Contudo, outros canais de potássio dependentes de voltagem com uma cinética de ativação mais lenta (IK_s) começam a ser ativados.

Fase 3: Com a inativação da corrente de cálcio e aumento na condutância ao potássio promovida pelas correntes de potássio lentas contribuem para a repolarização do PA. Além disso, próximo ao final de repolarização, já com o potencial de membrana em valores negativos, os canais de potássio retificadores de entrada (IK1) aumentam sua condutância contribuindo ainda mais para a repolarização.

Fase 4: conhecido como potencial de repouso da célula. Nessa fase, boa parte dos canais dependentes de voltagem estão fechados e somente contribuem ativamente os IK1 e os canais de potássio sensíveis a ATP.

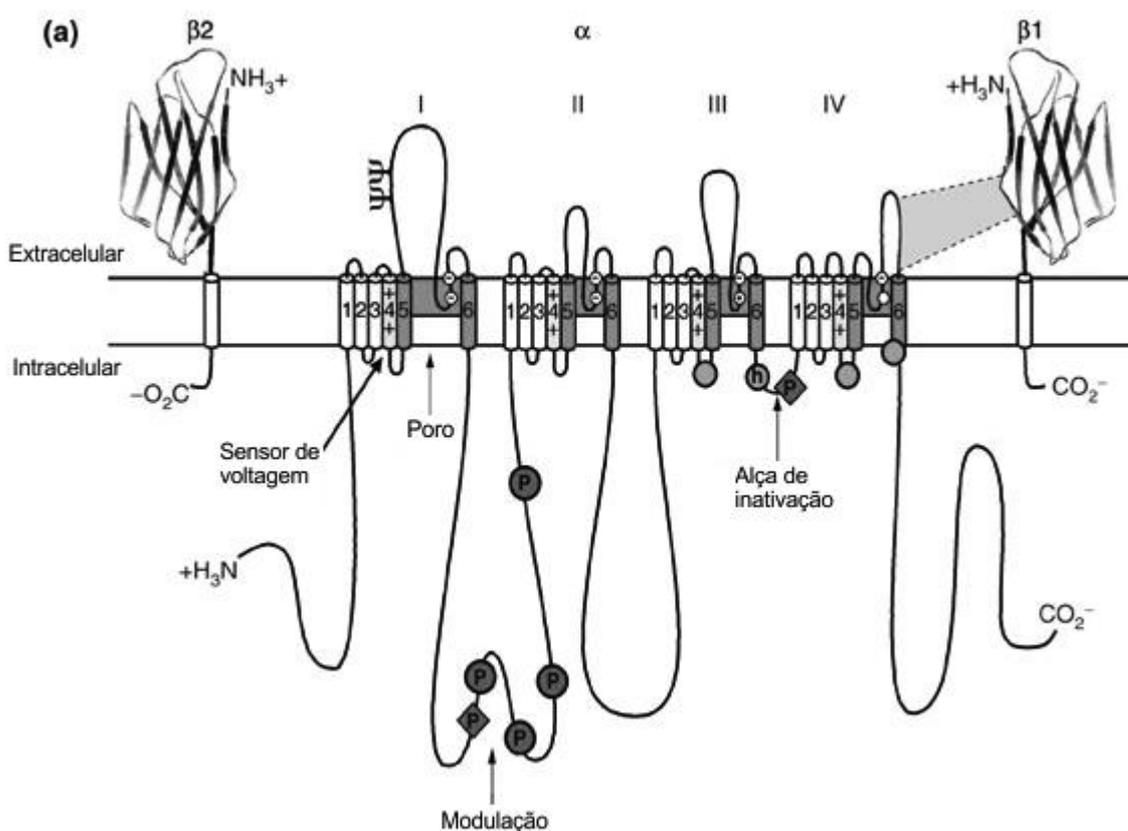


Figura 7. Estrutura básica dos canais dependentes de voltagem. Representação esquemática das subunidades dos Nav . Modificado de (Yu e Catterall, 2003).

A grande maioria dos canais dependentes de voltagem é constituída por uma subunidade alfa, unidade formadora do poro que por si só forma um canal funcional, podendo ou não possuir subunidades auxiliares, que permitem a modulação da atividade do canal. A estrutura esquemática da subunidade α dos Nav (que se apresenta similar nos outros canais dependentes

de voltagem) está mostrada na Figura 7. Essa subunidade apresenta 4 domínios (I a IV) similares cada um contendo seis segmentos transmembrana (S1 a S6), onde são ligados por alças. Em cada domínio o segmento S4 age como sensor de voltagem, devido a resíduos de aminoácidos carregados positivamente contidos nesse segmento que se movem de acordo com o campo elétrico existente na membrana (Yu e Catterall, 2003). Entre segmentos S5 e S6 há uma alça que tem reentrância inserida na região transmembrana do canal. Essa região forma o vestíbulo externo do poro e o filtro de seletividade dos canais (Catterall, Goldin, *et al.*, 2005; Catterall, Perez-Reyes, *et al.*, 2005).

A dependência de voltagem dos canais para sódio e outros canais dependentes de voltagem está ligado ao movimento de cargas dessas proteínas em resposta as alterações no campo elétrico na sarcolema. Os segmentos S4 (Figura 8, destacado em vermelho) apresentam uma serie de 4 ou mais resíduos de arginina ou lisina separados por dois resíduos hidrofóbicos cada que, de acordo com o campo elétrico transmembrana, se deslocam alterando o estado do canal (Bezanilla e Perozo, 2003). Quanto mais o potencial transmembrana é despolarizado maior a probabilidade dos segmentos S4 se descolarem e alterando a conformação do canal o tornando permeável (estado conhecido como “aberto”) enquanto em potenciais muito negativos a probabilidade desse deslocamento é baixa mantendo o canal em um estado não condutor “fechado” (Bezanilla e Perozo, 2003; Bezanilla, 2005). Quando ocorre uma despolarização, o processo de transição do estado fechado para aberto é denominado ativação, enquanto a transição de um estado aberto para fechado em resposta a repolarização rápida da membrana é conhecido como desativação. Com o tempo que a membrana está despolarizada, a probabilidade dos canais dependentes de voltagem mudarem para estado não condutor denominado “inativo” aumenta. O processo que os canais passam de abertos para inativados é chamado de inativação. O estado inativo se caracteriza por seu caráter refratário, ou seja, o canal não pode ser ativado quando está nesse estado. Para tornar os canais disponíveis para ativação se faz necessário que

a membrana seja repolarizada para que os canais transitem do estado inativo para fechado. O processo de inativação se mostra dependente de tempo que a membrana é mantida despolarizada, da voltagem da membrana e em alguns tipos de canais tais como os CavL ou de isoformas específicas dos Nav, podem ser dependentes também da concentração de cálcio próxima ao vestíbulo interno do poro por um processo dependente de calmodulina (Hille, 2001).

Como já citado, os Nav têm papel crucial na geração e propagação dos PA nos miócitos cardíacos. Os Nav são proteínas formadas por um complexo de uma subunidade α , com aproximadamente 260 kDa, associada a uma ou mais subunidades β de 33 kDa (Figura 7). Nove isoformas da subunidades α (Nav 1.1 a Nav 1.9) foram funcionalmente caracterizadas e uma décima isoforma (NaX) também deve funcionar como um canal para sódio (Catterall, Goldin, *et al.*, 2005).

Em cardiomiócitos são encontrados as isoformas Nav 1.1, 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6, sendo a Nav 1.5 a isoforma predominante nessas células (Nerbonne e Kass, 2005). O Nav 1.5 apresenta cinética de ativação e inativação extremamente rápidas e com condutância unitária de entorno de 20 pS. Apesar da inativação rápida e quase completa, na fase de platô do PA existe uma mínima probabilidade (1%) de que alguns canais de sódio possam ser ativados. Apesar de pequena, a corrente despolarizante gerada por esse componente tardio da corrente de sódio pode modular a fase 2, logo a duração total do PA. Em geral esse componente tardio da corrente de sódio é mínimo em miócitos saudáveis, entretanto em situações patológicas tais como a insuficiência cardíaca ou mutações no SCN5A (gene que codifica o Nav 1.5) esse componente é aumentado, o que leva a um prolongamento do PA que contribui para o aparecimento de arritmias (Nerbonne e Kass, 2005).

Os canais de cálcio dependentes da voltagem mediam o influxo de Ca^{2+} nas células cardíacas na fase 2 do PA. Baseado em características biofísicas e farmacológicas, as diferentes correntes de cálcio são designadas de tipo L, N, P, Q, R e T. Os as correntes tipo L, N, P/Q e R

podem ser classificadas com ativadas por alta voltagem, por serem ativadas em potenciais bastante despolarizados. Os canais de cálcio ativados por alta voltagem são formado por complexos de uma subunidade $\alpha 1$ de 190-250 kDa formadora do poro juntamente com um conjunto de subunidades auxiliares que incluem o complexo $\alpha 2\delta$ e alguns casos a subunidade γ . Atualmente foram identificadas 10 isoformas da subunidade $\alpha 1$, quatro complexos $\alpha 2\delta$ e duas isoformas γ (Catterall, 2000).

Em miócitos cardíacos, as correntes de cálcio do tipo L são predominantes, principalmente a isoforma Cav1.2, codificados pelo gene CACNA1C. Esses canais apresentam baixa condutância (9 pS) e são altamente sensíveis aos fármacos da classe das dihidropiridinas, assim sendo descritos frequentemente também como receptores de dihidropiridinas. A ativação dos CavL cardíacos em resposta a despolarização do sarcolema é mais lenta comparada com as dos Nav, assim esses canais não contribuem significamente na fase 0 e pouca participação na fase 1. A corrente despolarizante gerada pelo influxo de Ca^{2+} por esses canais é o fator determinante para o platô do PA cardíaco. A início da fase 3 depende da inativação dos CavL, esses canais apresentam uma inativação rápida dependente de voltagem e também do próprio Ca^{2+} que flui pelo canal e também da $[Ca^{2+}]_i$ (Catterall, Perez-Reyes, *et al.*, 2005; Nerbonne e Kass, 2005).

Mudanças na corrente de cálcio nos miócitos cardíacos, além de modular a duração da fase 2 e assim do PA, controlam diretamente quantidade de Ca^{2+} no sarcoplasma que influencia a contratilidade celular. Sendo o oposto verdadeiro, correntes que modulem a duração da fase 2, controlam indiretamente a quantidade de Ca^{2+} que flui pelos CavL durante o potencial de ação, sendo a duração do PA cardíaco um fator importante para o controle da contração (Nerbonne e Kass, 2005).

Diferente dos canais de sódio e cálcio quem tem uma diversidade relativamente limitada, os canais para potássio é o maior e mais diversos grupos de canais iônicos

representado por aproximadamente 70 genes conhecidos no genoma de mamíferos. Sendo os canais de potássio dependentes de voltagem a maior família com 40 desses genes divididos em 12 subfamílias. Outra grande família dos canais de potássio é formada pelos retificadores de entrada, que reúne mais 15 genes divididos em 7 subfamílias (Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005). Apesar dessa imensa heterogeneidade, as correntes de potássio no miocárdio podem ser separadas em 3 grandes grupos: correntes transientes de saída (I_{to_f} e I_{to_s}), que ativam e inativam rapidamente; correntes retificadoras retardadas (I_{K_s}), com diferentes cinéticas de ativação e com inativação mais lenta; e as correntes retificadoras de entrada (I_{K1}), que tem maior condutância em potenciais transmembrana bastante negativos (Nerbonne e Kass, 2005).

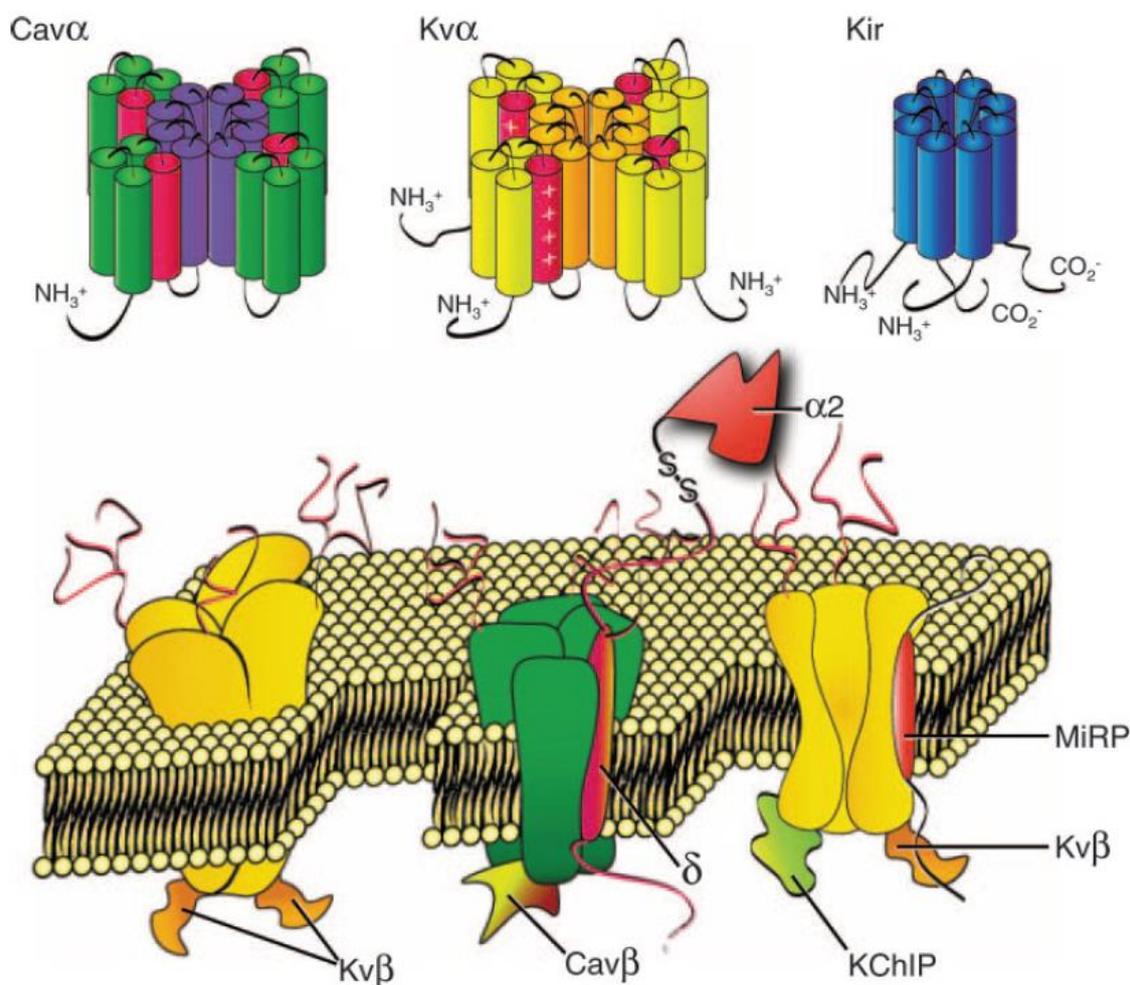


Figura 8. Arranjo molecular dos canais dependentes de voltagem. Representação esquemática das subunidades dos Cav , Kv e K_{IR} . (Nerbonne e Kass, 2005)

Diferente dos canais dependentes de voltagem, os retificadores de entrada são formados

por um tetrâmero de quatro subunidades α , com dois segmentos transmembrana cada (Figura 8). A dependência de voltagem desses canais é dada pelo mecanismo de retificação observado quando as células são despolarizadas. A condutância desses canais é elevada quando a célula está em potenciais negativos em relação ao potencial de equilíbrio do potássio, entretanto a condutância é reduzida à medida que a célula é despolarizada. Isso faz com que a corrente de flui por esses canais seja em sua maioria de entrada, com uma pequena corrente de saída em potenciais despolarizados porém próximos ao potencial de equilíbrio do potássio. Esse mecanismo de retificação é na realidade um bloqueio dependente de voltagem, sendo poro interno do canal bloqueado por diferentes poliaminas (tais como espermina, espermidina, putrescina) com contribuição de ions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) contidos no citoplasma (Anumonwo e Lopatin, 2010).

Apesar de ser baixa, essas correntes de saída que fluem pelos retificadores de entrada desempenha um papel importante na fase 3 do PA cardíaco, auxiliando na repolarização e determinando a duração do PA. Já que os retificadores de entrada têm condutância elevada em valores próximos ao potencial de equilíbrio do potássio, esses canais promovem estabilidade do elétrica dos miócitos cardíacos em torno do mesmo. Mutações ou condições patológicas que levem a perda ou ganho de função dos retificadores de entrada estão associadas diretamente a mudanças na duração do PA (e do intervalo QT) e o surgimentos de arritmias (Nerbonne e Kass, 2005; Anumonwo e Lopatin, 2010).

Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) são formados por tetrâmeros de quatro subunidades α , com seis segmentos transmembrana cada tendo o segmento S4 carregado, sendo um dos principais responsáveis pela dependência de voltagem (Figura 8). Devido a sua cinética rápida de ativação, a corrente transiente de potássio (I_t) atua principalmente na fase de repolarização inicial e no platô do PA cardíaco. Em camundongos, a densidade desse subtipo de corrente de potássio é bastante elevada, o que é determinante para a duração do PA, onde o

mesmo é bastante curto nesses animais. Isso é primordial para manter a alta frequência cardíaca característica em mamíferos de pequeno porte. Já em mamíferos maiores que tem regimes de frequência cardíacas bem menores, a densidade da Ito é significativamente reduzida, o que contribui para um PA mais prolongado devido a uma fase 1 bastante discreta. Nesses animais, modificações na Ito tem uma menor influência sobre a duração do PA, entretanto tem efeito dramático sobre para fase 1 do PA e na consequente entrada de cálcio pela ativação dos canais de cálcio (Patel e Campbell, 2005; Sun e Wang, 2005).

Atualmente, são descritos dois subtipos de correntes transiente de saída, a Ito rápida (I_{to_f}) e lenta (I_{to_s}). A principal diferença entre essas correntes é a cinética de inativação, tanto tempo para inativação quanto tempo para recuperação. Em camundongos, essas correntes têm cinéticas de inativação constantes de tempo para inativação na casa de poucas dezenas e centenas de milissegundos, respectivamente. Em contraste, as correntes IK_s apresentam constantes de tempo acima de 1 s (Xu *et al.*, 1999). As isoformas da subunidade α , K_V 4.2 e 4.3 são responsáveis pelas correntes I_{to_f} , enquanto a isoforma K_V 1.4 codifica a corrente I_{to_s} . Em diversas espécies, as correntes Ito têm densidades diferentes de acordo com a região e em apresentam um gradiente através da parede do ventrículo esquerdo, onde a densidade é maior em células localizadas no epicárdio em comparação com células do endocárdio (Patel e Campbell, 2005).

Já as correntes IK_s tem cinética de ativação e inativação bem mais lenta. Sua participação é principalmente na fase 3 do PA cardíaco. Essas correntes podem são codificadas por diversas isoformas dos K_V que diferem de acordo com a espécie estudada. Em camundongos, modelo animal usado nesse estudo, a isoforma K_V 1.5 parece ser a principal responsável pela corrente IK_s (Xu *et al.*, 1999).

1.3.2 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INDUZIDA POR CÁLCIO

O fenômeno de liberação de cálcio induzida por cálcio (LCIC) é primordial para o acoplamento excitação-contração cardíaco. O mesmo interliga a atividade elétrica (através do PA) com o aumento de cálcio intracelular que é o gatilho para a formação das pontes cruzadas e geração de força. A LCIC nos miócitos cardíacos é bem regulada devido a uma estrutura bem organizada do sarcolema e do RS, bem como os canais e transportadores contidos nessas estruturas.

O sarcolema dos cardiomiócitos apresentam invaginações irregulares que geralmente se encontram perpendiculares ao eixo longitudinal da fibra. Essas invaginações contínuas do sarcolema tem formato tubular e faz com que parte do sarcolema chegue ao interior da fibra. Devido a essas características essas estruturas são conhecidas como túbulos transversos (ou túbulos t). Os túbulos t tem como principal função aproximar o sarcolema das proteínas contráteis e organelas intracelulares (principalmente o RS), isso é especialmente importante devido as grandes dimensões da células cardíaca e necessidade de transmissão extremamente rápida do estímulo elétrico por toda extensão celular. Devida a íntima relação entre os túbulos t e o RS, os mesmos formam uma estrutura denominada de díade. A justaposição de um conjunto de Cav 1.2 na membrana do túbulo t com um grupo receptores de rianodina do tipo 2 (RYR2) na membrana do RS juncional (jRS) formam o elemento funcional da díade, conhecido como “couplon” ou unidade liberadora de cálcio (Scriven *et al.*, 2013).

A ativação dos Cav 1.2 no túbulo t, o pequeno influxo de Ca^{2+} através desses canais aumenta a concentração desse íon no constricto espaço entre a membrana túbulo t e RS, aqui chamado de fenda diádica (Figura 9). Esse aumento localizado da concentração de cálcio aumenta a probabilidade de abertura dos RYR2, que inicia a liberação de Ca^{2+} armazenado no lúmen do RS para o citoplasma da célula cardíaca. Isso faz com que $[Ca^{2+}]_i$ se eleve na região próxima ao couplon. Fenômeno conhecido como LCIC. Quando esse evento ocorre de forma

isolada, temporal e espacialmente, o aumento de cálcio localizado causado pela LCIC é denominado de “spark” de Ca^{2+} . O spark é considerado como unidade elementar da LCIC, onde um spark corresponde a ativação de um couplon (Bers, 2002; Cheng e Lederer, 2008). Os sparks de Ca^{2+} podem ocorrer de forma espontânea mesmo em células em repouso, mecanismo este importante para o controle da carga de Ca^{2+} no RS, ou quando estimulados por mudanças no potencial transmembrana.

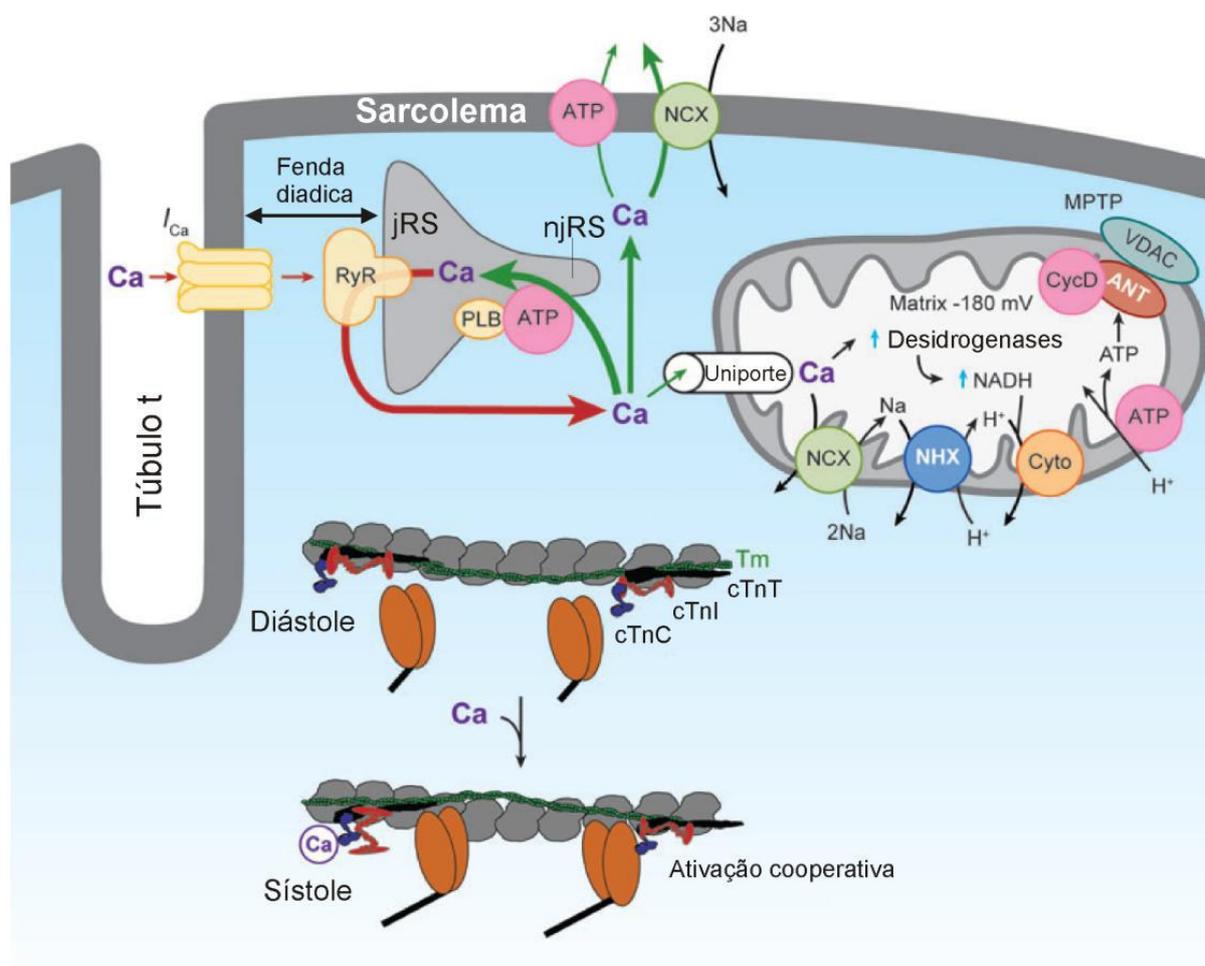


Figura 9. Controle da concentração de cálcio intracelular em células cardíacas. Com a despolarização causada pelo início do PA, ocorre ativação da corrente de cálcio (I_{Ca}) que eleva o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na fenda diádica que ativam os RYRs que inicia a liberação de Ca^{2+} do lúmen do jRS para o citoplasma. O Ca^{2+} liberado aumenta a concentração intracelular deste íon, que então liga-se a cTnC, ativando os miofilamentos contráteis e promovendo a sístole. Aqui estão ilustrados os quatro principais mecanismos de redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 1) Trocador Na/Ca (NCX); 2) SERCA2a (em cor rosa na membrana do RS); 3) A bomba de Ca^{2+} sarcolema (em cor rosa no sarcolema) e 4) O uniporte mitocondrial de Ca^{2+} . Tais mecanismos contribuem para a redução do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e o relaxamento. A espessura das setas indica a contribuição relativa de cada mecanismo para redução dos níveis de Ca^{2+} . Modificado de (Bers, 2008).

A geração do PA gera uma despolarização generalizada que ativa diversos Cav 1.2 nos túbulos t, essa ativação massiva inicia a LCIC de diversos couplons ao longo de toda a extensão do cardiomiócito. Os sparks iniciados pela ativação dos couplons se somam causando um aumento rápido e sincronizado da $[Ca^{2+}]_i$ em toda a célula, iniciando a geração de pontes cruzadas e assim a sístole, como mostrado na figura 9 (Bers, 2002). Após cessado o PA, assim a entrada de Ca^{2+} via $CavL$, é necessário que os níveis de Ca^{2+} caiam para ocorrer a diástole e enchimento cardíaco. Os mecanismos de redução da $[Ca^{2+}]_i$ se divide basicamente em dois principais componentes: a recaptação para o SR e a extrusão pela membrana sarcolemal. Também ocorre uma captação de Ca^{2+} para mitocôndria via o uniporte na membrana mitocondrial interna (ilustrado na figura 9), entretanto esse mecanismo é muito discreto comparado aos outros (Bers, 2008).

A recaptação de Ca^{2+} para o SR é possível devido a presença do transportador ativo cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA; do inglês Sarcoplasmatic Reticulum Calcium ATPase). Esse transportador bombeia esse íon para o lúmen do RS contra um grande gradiente de concentração, consumindo ATP no processo. No tecido cardíaco, onde a isoforma SERCA2a é mais abundante, a recaptação por esse transportador representa de 70 a 90%, dependendo da espécie, da remoção do Ca^{2+} durante a diástole (Bers, 2008).

Sendo o principal mecanismo de remoção do Ca^{2+} citosólico, a atividade da SERCA2a é altamente regulada. O principal regulador da atividade da SERCA é o inibidor endógeno fosfolambano (PLB), proteína integral de membrana com 52 resíduos de aminoácidos. Quando os níveis de Ca^{2+} estão baixos, o PLB interage com a SERCA e inibe sua atividade por reduzir a afinidade da mesma pelo Ca^{2+} . Quando os níveis citosólicos de Ca^{2+} estão elevados, essa interação é reduzida o que alivia a SERCA da sua inibição e inicia o processo de recaptação do Ca^{2+} (Periasamy *et al.*, 2008). Essa interação entre PLB e SERCA também pode ser modulada pela fosforilação da PLB. São bem descritos dois sítios de fosforilação da PLB, um no resíduo

de Serina na posição 16 e outro resíduo de Treonina na posição 17. Esses resíduos são fosforilados pelas Serina/Treonina cinases: Proteína Cinase A (PKA) e a Proteína Cinase II dependente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMKII), respectivamente. De forma similar que ocorre com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a fosforilação da PLB reduz a interação da mesma com a SERCA, que eleva sua atividade, esse mecanismo é um dos principais responsáveis pelos efeitos na contratilidade cardíaca pela ativação adrenérgica abordada no próximo tópico (Periasamy *et al.*, 2008).

Como mostrado na figura 9, outra parte considerável do Ca^{2+} é removido através da membrana sarcolemal através de dois transportadores: 1) Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA, do inglês plasma membrane Ca^{2+} ATPase); e o 2) Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Entretanto, o fluxo de Ca^{2+} através da PMCA através da membrana plasmática é bastante pequeno em relação com NCX, que atua como principal mediador da remoção do Ca^{2+} a cada ciclo cardíaco. O NCX é um transportador ativo secundário que transporta três íons Na^+ na troca de um íon Ca^{2+} . De acordo com os gradientes de ambos os íons e o potencial transmembrana, esse trocador pode funcionar causando extrusão (modo direto) ou influxo (modo reverso) de Ca^{2+} . No coração a expressão desse transportador está limitada a uma única isoforma NCX1 e sua distribuição é bastante ampla, sendo encontrado na superfície celular e também no túbulo t, próximo aos couplons (Scriven e Moore, 2013).

Devido a assimetria das cargas transportadas, o NCX tem natureza eletrogênica que pode despolarizar ou repolarizar a membrana de acordo com o seu modo de funcionamento. Quando está funcionando no seu modo direto para extrusão do cálcio, o NCX gera uma corrente despolarizante que contribui para duração do PA cardíaco, principalmente no final da fase 2 e durante a fase 3. Assim a função do NCX tem influência direta sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e no potencial transmembrana, com isso esse transportador tem papel importante no aparecimento de eventos arrítmicos (Bers, 2002; 2006).

1.4 SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O sistema nervoso autônomo (SNA) desempenha uma função essencial para manutenção e modulação de diversos processos fisiológicos. O SNA se divide em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), onde funcionalmente os dois apresentam uma via motora com dois neurônios, sendo um neurônio pré-ganglionar, cujo o corpo está localizado no sistema nervoso central e um neurônio pós-ganglionar que o corpo se localiza em um dos gânglios autonômicos. Uma das principais diferenças entre as duas porções do SNA está na localização dos neurônios. No SNP os neurônios pré-ganglionares estão localizados no encéfalo e na medula espinhal sacral e os gânglios estão próximas ou nas paredes dos órgãos efetores. Já o SNS os neurônios pré-ganglionares estão localizados nos segmentos torácicos e lombares da medula espinhal e os gânglios estão localizados afastados dos órgãos efetores (Berne *et al.*, 2004).

No sistema cardiovascular, o SNS exerce diversos efeitos tais como acelerar a frequência cardíaca, aumentar a contratilidade cardíaca, causar uma redução da capacidade venosa e vasoconstrição das artérias de resistência (Triposkiadis *et al.*, 2009). A coordenação da atividade simpática que ocorre através dos reflexos cardiovasculares e outros mecanismos regulatórios incluindo o SNP, sistema renina-angiotensina-aldosterona, etc., o que possibilita o controle preciso do fluxo sanguíneo e pressão arterial a curto e longo prazo (Charkoudian e Rabbitts, 2009). Um aumento na atividade simpática também pode ser determinante para a manutenção da função cardíaca, por exemplo, em situações de quando em exercício físico intenso ou situações de fuga ou luta. Em casos de declínio na capacidade contrátil do coração, que pode ser agudo como o infarto do miocárdio ou crônico como uma sobrecarga pressórica (Mann e Bristow, 2005), ocorre à ativação de subseqüentes mecanismos compensatórios neuro-humorais tais como eixo renina-angiotensina-aldosterona, o sistema de citocinas e o SNS (Floras, 2009).

No coração, a ativação do SNS através da ativação dos receptores adrenérgicos pós-juncionais promove o aumento na frequência cardíaca (Cronotropismo positivo), na força de contração (Inotropismo positivo) e na taxa de relaxamento (Lusitropismo positivo). Esses efeitos estão principalmente ligados a estimulação dos receptores adrenérgicos do subtipo β (β AR) que tem como isoforma mais predominante a β_1 AR, representando cerca de 75 a 80% dos β AR no miocárdio, seguida da isoforma β_2 AR (15 a 18%) e β_3 AR (2 a 3%) (Lympopoulos *et al.*, 2013).

Quando estimulados, os β_1 ARs ativam a proteína Gs, a qual aumenta a produção de cAMP pela ativação da enzima adenilil ciclase. O aumento na concentração de cAMP é responsável pela ativação da cinase PKA. A PKA fosforila diversos alvos importantes para o acoplamento excitação-contração cardíaco tais como: $CavL$, PLB, RYR2, cTnI e MyBP-C (Bers, 2002). A fosforização da PLB aumenta a receptação do cálcio para o retículo sarcoplasmático ao remover a inibição que esse peptídeo exerce sobre a SERCA2b presente no RS dos cardiomiócitos. Esse fenômeno acelera a redução da concentração de cálcio intracelular, constituindo o principal fator relacionado ao lusitropismo positivo associado à ativação β -adrenérgica (Bers, 2002), e aumenta os estoques que cálcio no retículo sarcoplasmático. Esse aumento na carga de cálcio do retículo, em conjunto com o aumento na probabilidade de abertura dos RYR2 e dos Cav 1.2 causados pela fosforilação via PKA, favorece o aumento na concentração intracelular de cálcio durante eventos de contração celular, mecanismo que explica o aumento da força de contração associada à ativação β -adrenérgica (Bers, 2002; Luo e Anderson, 2013).

Apesar de esses receptores atuarem na manutenção da função cardíaca, a ativação dos mesmos também tem diversos efeitos deletérios quando os receptores são continuamente e excessivamente estimulados. A ativação dos receptores β_1 ARs está relacionado ao início do processo de hipertrofia e apoptose no cardiomiócito, hiperplasia de fibroblastos cardíacos e

vasoconstricção (Mann e Bristow, 2005; Floras, 2009). Tais efeitos advindos do aumento na atividade simpática são descritos como pontos importantes para o desenvolvimento progressivo de diversas doenças cardiovasculares que incluem a insuficiência cardíaca (Brum *et al.*, 2002; Mann e Bristow, 2005).

A atividade elétrica das células cardíacas é fundamental para o funcionamento desse órgão e se apresenta modificada em boa parte das disfunções cardíacas. Diversos estudos demonstram que a insuficiência cardíaca está intimamente vinculada ao remodelamento eletrofisiológico dos cardiomiócitos principalmente prolongando a duração do potencial de ação (PA) associado com reduções nas correntes de potássio, o que facilita a geração de fenômenos de arritmia (Li *et al.*, 2000; Petkova-Kirova *et al.*, 2006; Aiba e Tomaselli, 2010). Outros estudos descrevem um aumento na corrente de sódio tardia como fator determinante no aumento da concentração de cálcio durante o período diastólico associado à insuficiência cardíaca (Aiba e Tomaselli, 2010; Undrovinas *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2011). Apesar de controverso, modificações nas correntes de cálcio também são observadas nessa síndrome, tendo ou não correlação com mudanças na expressão dos CaV 1.2. Entretanto, quando a corrente de cálcio do tipo L é reduzida pelo knock-down para a subunidade α_{1C} dos Ca_vL, essa redução da densidade da corrente de cálcio tipo L desencadeia um estado de insuficiência cardíaca que características compatíveis com outras disfunções cardíacas já descritas (Goonasekera *et al.*, 2012).

O prolongamento do PA é fator importante também para o acoplamento excitação-contracção e o manejo do Ca²⁺ intracelular nas disfunções cardíacas. O prolongamento do PA junto com uma menor LCIC e uma maior quantidade de sódio intracelular faz com que o NCX funcione por mais tempo no modo reverso durante o PA. Isso causa uma maior entrada de Ca²⁺ para auxiliar a contracção debilitada, o que talvez explique o aumento da expressão do NCX em boa parte dos modelos de insuficiência cardíaca (Bers, 2006). Concomitante com o aumento na

expressão do NCX temos que ocorre uma diminuição na expressão da SERCA. Com isso, uma parte do Ca^{2+} que seria recaptado para o RS passa a ser removido pelo NCX, isso diminui a carga de Ca^{2+} no RS que fica disponível para utilização no próximo ciclo cardíaco reduzindo a contratilidade celular. Essa redução na expressão da SERCA também reduz a velocidade do decaimento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que reduz a velocidade de relaxamento comprometendo assim a diástole (Bers, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A insuficiência cardíaca representa a principal causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS), a partir dos 65 anos, e uma das principais causas de mortalidade e morbidade relacionadas a doenças cardiovasculares. No Brasil, é estimado que para o tratamento desta síndrome sejam gastos cerca de 450 milhões de reais (somados gastos diretos e indiretos) anualmente dos cofres públicos (Lessa, 2001; Araujo *et al.*, 2005).

Diversas evidências demonstram a participação do aumento no tônus simpático na progressão de várias disfunção cardíacas, entretanto ainda existem algumas lacunas não preenchidas sobre a participação do SNS no desenvolvimento das disfunções cardíacas. Os modelos empregados em sua maioria não são adequados para o estudo do papel do SNS nos efeitos deletérios observados (Brum *et al.*, 2002).

A retroalimentação inibitória das sinapses adrenérgicas é um fator essencial para o controle do tônus simpático. Hein e colaboradores (1999), descreveram que os receptores pré-sinápticos adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} modulam a liberação de neurotransmissores, principalmente no SNS. Além disso, foi mostrado que camundongos duplo knock-out dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (DKO) apresentam hiperatividade simpática e aumento de noradrenalina plasmática, e que a longo prazo, esses animais desenvolvem hipertrofia cardíaca, redução na capacidade física e na contratilidade cardíaca além de modificações ultraestruturais do cardiomiócito e apresentam nível de mortalidade elevado para a idade analisada (Hein *et al.*, 1999; Brum *et al.*, 2002). Devido a essas características, esse modelo se mostra interessante para o estudo do papel do aumento do tônus simpático no desenvolvimento e progressão de disfunções cardíacas.

Foi demonstrado que nesse modelo de hiperatividade simpática ocorre uma modificação na expressão de diversas proteínas relacionadas à função cardíaca. Ocorre uma redução na SERCA2, aumento da expressão do NCX e na expressão das proteínas da via

calcineurina/NFAT (Rolim *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009). Devido a isso é observado uma diminuição do transiente citoplasmático de cálcio, o que contribui para redução da contratilidade cardíaca nesse modelo (Bartholomeu *et al.*, 2008). Além de um aumento nos níveis de angiotensina 2 e na atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE) no miocárdio (Pereira *et al.*, 2009).

Apesar de estes estudos demonstrarem que em diversas situações patológicas ocorre um remodelamento eletrofisiológico em conjunto com alterações na contratilidade do miócito ventricular, ainda é desconhecido qual é o papel do aumento do tônus simpático na modificação da função dos canais iônicos nos cardiomiócito e sua relação com ambos: a condução e propagação do estímulo elétrico através do músculo cardíaco, bem como a manutenção de sua função contrátil.

O presente estudo objetivou avaliar o papel da hiperatividade simpática no remodelamento do acoplamento excitação-contração durante o desenvolvimento de disfunções cardíacas, principalmente focando na atividade eletrofisiológica dos miócitos ventriculares. Para isso usamos o modelo genético de hiperatividade simpática pelo knock-out dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} . A expectativa do trabalho é de que o aumento da atividade simpática induza um remodelamento eletrofisiológico no cardiomiócitos tais como modificações na duração do potencial de ação vinculado a alterações na densidade das correntes iônicas envolvidas nesse fenômeno, e que a alteração na morfologia do potencial de ação se relacione com modificações previamente observadas na contratilidade cardíaca e sinalização de cálcio.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil do acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos ventriculares de camundongos que apresentam hiperatividade simpática pela depleção (knock-out) dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} .

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongos selvagens e com hiperatividade simpática.
- Analisar as possíveis alterações sobre os parâmetros eletrofisiológicos do potencial de ação em cardiomiócitos através da técnica do patch-clamp no modo de “Current clamp”.
- Observar através da microscopia confocal mudanças no transiente de cálcio dos miócitos isolados de animais selvagens e com hiperatividade simpática.
- Investigar possíveis alterações nas correntes macroscópicas dos canais dependentes de voltagem e do trocador sódio-cálcio em cardiomiócitos através da técnica patch-clamp no modo de “Voltage clamp”.
- Verificar os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em cardiomiócitos através de sondas fluorescentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes institucionais e da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA - UFMG) sem restrição aos procedimentos propostos (Protocolo nº. 340 / 2013).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos DKO em um fundo genético C57BL6/J e os seus controles selvagens (WT), com idades de 3 e 7 meses provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício na Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram gentilmente cedidos pela Profa. Patrícia Chakur Brum (EEFE-USP). Com sete meses de idade, os camundongos DKO apresentam disfunção cardíaca associada à intolerância ao exercício, e maior taxa de mortalidade (Brum *et al.*, 2002; Rolim *et al.*, 2007; Bartholomeu *et al.*, 2008). Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG em um ciclo 12:12 h de claro-escuro, num ambiente com temperatura controlada com livre acesso à ração e água.

4.3 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

Para a medida indireta da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial média (PAM) nos animais WT e DKO, utilizamos um pletismógrafo de cauda para roedores (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT). Os camundongos foram primeiramente acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico onde eram aquecidos e ventilados. O tubo limita os movimentos do animal, o que se faz necessário para uma maior precisão das medidas. Em seguida, a cauda dos animais foi encaixada a um manguito de borracha que foi adaptado à região proximal e ligado ao esfigmomanômetro para inflar e desinflar automaticamente em intervalos fixos de 50 s. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso que captava os sinais a serem

enviados e registrados em um computador. A PAM e a FC foram calculadas automaticamente pelo software a partir dos dados obtidos.

4.4 OBTENÇÃO DOS CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

Para obtenção dos cardiomiócitos, os animais foram sacrificados ao atingirem idades de 3 ou 7 meses de vida. Após o sacrifício, os corações foram cuidadosamente removidos, canulados através do tronco aórtico e então montados em um sistema de Langendorff de pressão constante, onde foram perfundidos em um sistema de fluxo retrógrado. Os cardiomiócitos ventriculares foram então isolados enzimaticamente como descrito previamente (Shioya, 2007). Nesse processo, os corações foram perfundidos com solução livre de cálcio (CIB), contendo (em mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 22 de glucose, 25 HEPES, e 0,4 EGTA (pH 7,4), mantidas a 37°C durante 3 min, para limpeza do coração. Após esse processo, a solução CIB livre de cálcio é substituída por CIB (sem EGTA) contendo 0,3 mM CaCl₂, 1 mg/ml de colagenase tipo II, 0,06 mg/ml protease tipo XXIII, e 0,06 mg/ml de tripsina, a qual foi perfundida por 3-5 minutos. O coração foi então removido da cânula e os ventrículos serão separados, cortados em pedaços pequenos, submetidos a 8 min de digestão adicionais a 37°C, com CIB suplementado com colagenase, tripsina, protease e com CaCl₂ 0,7 mM. Após essas duas etapas de digestão enzimática, as células foram isoladas do tecido por meio de agitação leve utilizando pipeta de transferência. Essa solução contendo as células isoladas foi então filtrada, centrifugada à 1000 rpm por 30 s, ressuspendidas e mantida em solução CIB contendo 1,2 mM CaCl₂ e 2 mg/ml de albumina bovina sérica (BSA) por 10 min a 37°C. Finalmente, as células foram centrifugadas novamente (1000 rpm por 30 s) e mantidas em solução de Tyrode com a seguinte composição (em mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 11 de Glicose, 5 HEPES e 1,8 CaCl₂ (pH ajustado para 7,4). As células isoladas foram utilizadas nos experimentos por no máximo 6h após o término do processo de isolamento.

4.5 REGISTROS DE CONTRATILIDADE CELULAR E ELETROFISIOLOGIA

O registro da contratilidade de miócitos isolados foi realizado em sistema de detecção de borda por uma câmera de alta-velocidade (IonOptix, Milton, USA) em temperatura ambiente. As células ficaram em uma câmara de perfusão preenchida com solução de banho montada em um microscópio invertido (Nikon TS-100, Nikon Instruments Inc, Japão). Foi utilizada uma frequência de 200 Hz para a aquisição das imagens, e o comprimento do cardiomiócito calculado através da distância entre as duas extremidades da célula, e registrado em tempo real em computador previamente calibrado para as objetivas utilizadas. Para induzir as contrações foi utilizado um estímulo elétrico (40 V; 4 ms) provido por um estimulador (Grass Instruments, USA) conectado a dois eletrodos metálicos paralelos, imersos na solução Tyrode que continha as células isoladas. A frequência de estimulação variou de 1 Hz a 3 Hz de acordo com o experimento a ser realizado.

Os registros do potencial de ação e das correntes iônicas foram realizados através de um amplificador EPC-10 (HEKA Elektronik, Germany) e gravadas em computador através do software de aquisição PACTHMASTER (HEKA Elektronik, Germany) nos modos “Current clamp” (para o potencial de ação) e “Voltage clamp” (para as correntes iônicas). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20-25°C). As pipetas para os registros eletrofisiológicos foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) com um puxador de micropipeta (PP-830, Narishige, Japão). Após preenchidas com a solução específica, para cada registro a resistência das pipetas variaram de 0,8 a 2 MΩ. O movimento da pipeta foi controlado por um micromanipulador (MP-285, Sutter Instrument, EUA) acoplado ao microscópio (Nikon TS-100, Nikon Instruments Inc, Japão).

Após a formação do selo (resistência superior à 1 GΩ) a capacitância de membrana e resistência do selo foram medidas através de rotinas pré-programadas no software de aquisição utilizado, e a capacitância e resistência em série foram compensadas eletronicamente através

de comandos existentes no próprio amplificador.

Para o registro das correntes iônicas, a solução interna (dentro da pipeta) e externa foram específicas para o isolamento da corrente a ser estudada (descritas nas Tabelas 1 a 4). Tetraetilamônio (TEA) e Césio (Cs^+) foram utilizados para o bloqueio e substituição iônica das correntes de potássio, respectivamente. Cádmio (Cd^{2+}) foi utilizado para o bloqueio das correntes de cálcio e N-metil-D-glucamina (NMDG) para substituição do sódio. Todas as células foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV quando não estimuladas pelos protocolos descritos na seção de resultados.

Tabela 1 – Solução interna usada para o registro do Potencial de ação.

Solução Interna	
Concentração (mM)	
KCl	20
HEPES	10
KOH	130
Aspartato	130
MgCl.6H ₂ O	2
NaCl	5

Obs: Nos registros de potencial de ação, foi utilizado Tyrode como solução externa.

Tabela 2 – Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes de potássio.

Solução Externa		Solução Interna	
	Concentração (mM)		Concentração (mM)
NMDG	140	KCl	140
KCl	5.6	MgCl ₂ .6H ₂ O	1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5	EGTA	11
CdCl ₂ .H ₂ O	0.1	HEPES	10
Glicose	11		
HEPES	10		
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.8		

Tabela 3 – Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes de cálcio.

Solução Externa		Solução Interna	
	Concentração (mM)		Concentração (mM)
TEA-Cl	150	CsCl	140
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5	MgCl ₂ .6H ₂ O	1
Glicose	11	HEPES	10
HEPES	10	EGTA	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.8	Na ₂ ATP	5

Tabela 4 – Soluções externa e interna usadas para o registro das correntes do trocador sódio-cálcio.

Solução Externa		Solução Interna	
	Concentração (mM)		Concentração (mM)
NaOH	145	NaCl	20
Aspartato	145	MgCl ₂ .6H ₂ O*	1.19
HEPES	5	HEPES	10
MgCl ₂ .6H ₂ O	2	TEA-Cl	20
CaCl ₂ .2H ₂ O	1	EGTA	40
BaCl ₂ .2H ₂ O	2	CsOH	60
Ouabaina	0.05	CaCl ₂ .2H ₂ O	33.8
Nicardipina	0.002	Aspartato	40

4.6 MICROSCOPIA CONFOCAL E DE FLUORESCÊNCIA

Para as medidas realizadas através de microscopia confocal e de fluorescência, após isoladas, as células foram carregadas com a sonda específica para o tipo de registro a ser realizado. Para microscopia confocal e o registro do transiente de cálcio, as células foram carregadas utilizando a sonda Fluo-4 na sua forma acetoximetil (AM) éster por 30 minutos (temperatura ambiente) na concentração de 5 μ M em solução de Tyrode. Já para a microscopia de fluorescência as células foram carregadas por 30 minutos usando as sondas DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína) diacetato ou DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína-diacetato) nas concentrações de 10 e 3 μ M, respectivamente. Após o período de carregamento as células foram então centrifugadas e ressuspensas em solução de Tyrode, onde permaneceram por mais 10 minutos para desesterificação das sondas.

Para o registro dos transientes de cálcio foi utilizada a técnica de microscopia confocal através do sistema Zeiss LSM 510 meta (Carl Zeiss, Alemanha) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI – ICB – UFMG). As células ficaram em uma

câmara de perfusão preenchida com solução Tyrode, e a sonda foi excitada por uma luz obtida através de um laser de argônio com comprimento de 488 nm, e a luz emitida foi filtrada por um filtro passa-alta de 505 nm antes de ser coletada por um tubo fotomultiplicador. De forma similar aos registros de contratilidade celular, para induzir os transientes de cálcio foi utilizado um estímulo elétrico (40 V; 4 ms) com frequência de 1 Hz. As células foram estimuladas por pelo menos 10 segundos antes do início das varreduras. As varreduras sucessivas (3500 vezes) foram realizadas em uma única linha de 512 pixels ao longo do eixo transversal dos cardiomiócitos evitando qualquer região nuclear. O “pinhole” foi ajustado para valores de resolução espacial de 2 μm e cada varredura durou 1,92 ms totalizando 6,7 s de registro para cada célula. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizados pela fluorescência de basal (F_0) e estão expressas como F/F_0 .

Os registros das imagens através da microscopia de fluorescência foram realizados no microscópio Nikon Eclipse Ti (Nikon, Japão) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI – ICB – UFMG). As células ficaram em uma placa de 35 mm com fundo de vidro, preenchida com solução Tyrode e as sonda DAF e DCF (2',7'-diclorofluoresceína; forma fluorescente do DCFH-DA) foram excitadas por uma luz obtida através de uma luz de xenônio (Lambda DG4, Sutter Instrument, EUA) previamente filtrada em 480/30 nm, e a luz emitida foi filtrada por um filtro de 535/40 nm antes de ser coletada por uma câmera CCD. Os parâmetros de aquisição das imagens (Ganho da câmera e tempo de exposição) foram mantidos os mesmos ao longo de todos os experimentos. Após a subtração da fluorescência do fundo, a intensidade média da fluorescência de cada célula foi contabilizada.

4.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas das amostras das células isoladas foi feita pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Este método consiste na adição de 0,02mL do

homogenato, 2,5mL da mistura nas proporções de 100:1:1: Na₂CO₃ (2%), CuSO₄ (1%) e tartarato duplo de sódio (2%). Depois de incubar por 20 minutos adicionou-se 0,25mL do reagente de folin sendo a leitura realizada em 660nm. Utilizou-se BSA como padrão.

As amostras das células isoladas foram homogeneizadas no gelo em um tampão Tris: 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM Na₂EDTA, 1mM MgCl₂, 1% Nonidet P40, 0.3% Triton X-100, 0.5% SDS e 100mM DTT. O homogenato foi centrifugado a 10.000g por 30 min a 4°C e o sobrenadante aliqotado e imediatamente congelado a -80°C. As proteínas usadas foram aplicadas em quantidades iguais no gel de eletroforese. As amostras das proteínas foram misturadas com um tampão desnaturante de SDS-PAGE e aquecidas a 95°C por 3 min. As corridas das amostras foram realizadas em um gel de poliacrilamida 10%, posteriormente foi realizada a transferência para uma membrana de nitrocelulose. As bandas de proteínas na membrana, para conferir a eficiência da transferência, foram detectadas usando o corante ponceau-s. A seguir a membrana foi incubada com os anticorpos específicos nas diluições recomendadas e uma peroxidase conjugada a um anticorpo secundário. O sinal foi detectado usando-se o sistema de detecção para western blot (ImageQuant LAS 4000, GE, EUA). As imagens obtidas foram analisadas a partir dos níveis de proteínas com o uso do software IMAGE-J.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. (n), onde E.P.M. é o erro padrão da média e n representará o número de experimentos. As médias foram consideradas diferindo significativamente entre si se o valor de P para a rejeição da hipótese nula foi ajustado como sendo $\leq 0,05$. Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t de Student não pareado, para comparação de mais de dois grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguido de um pós-teste de comparação múltipla entre pares, quando apropriado.

Os parâmetros da contratilidade celular foram obtidos a partir de rotinas pré-

programadas no software IonWizard (IonOptix, USA). Para cada célula foi utilizada a média de cinco contrações para o cálculo dos parâmetros. Já os parâmetros do PA e das correntes foram obtidos através do software PACTHMASTER (HEKA Elektronik, Germany).

A condutância das correntes macroscópicas foi calculada a partir do valor do pico da corrente através da equação $I = (E_m - E_{rev}) * \frac{G_{max}}{1 + e^{(V_a - E_m)/k_a}}$, onde E_{rev} é o potencial de reversão estimado da corrente, e em seguida normalizado usando a condutância máxima (G_{max}).

O plot da relação da condutância sobre a G_{max} em função do potencial foi ajustado com a função de Boltzmann, $G = \frac{G_{max}}{1 + e^{(E_m - V_a)/k_a}}$, para determinar o potencial para metade da ativação máxima

(V_a) e o fator de inclinação (k_a). A dependência da voltagem para inativação da corrente de cálcio do tipo L foi avaliada após um pré-pulso de 500 ms para vários potenciais seguido por pulso de 300 ms a 0 mV. A corrente disponível foi representada graficamente em função da voltagem, e a curva de estado estacionário para disponibilidade da corrente, ou seja, a fração dos canais abertos em estado condutor em relação ao total foi ajustado a partir de uma função que segue a distribuição de Boltzmann, por meio da equação $I/I_{max} = \frac{1}{1 + e^{(E_m - V_h)/k_h}}$, para

determinar o potencial para metade da inativação máxima (V_h) e o fator de inclinação (k_h). A

discriminação dos componentes da corrente de potássio foi realizada de acordo com Xu e colaboradores (1999). O decaimento das correntes registradas no potencial de 60 mV foram ajustadas pela soma de três exponenciais: $(A_1 * e^{-t/\tau_1}) + (A_2 * e^{-t/\tau_2}) + (A_3 * e^{-t/\tau_3}) + C$.

De acordo com a constante de tempo para inativação as correntes foram divididas em 3 componentes I_{of} , I_{os} e I_{Ks} , sendo A_n a amplitude da corrente respectivamente, juntamente com o valor C , correspondente ao componente sustentado (I_{ss}) da corrente.

5 RESULTADOS

Os experimentos foram realizados em animais com 7 meses de idade. Nessa faixa de idade é esperado que os animais DKO já apresentem disfunções cardiovasculares (Brum et al., 2002; Rolim et al., 2007; Oliveira et al., 2009). Os animais DKO apresentaram frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) elevada, compatíveis com o quadro de hiperatividade simpática (Figura 10). Estes animais também apresentaram peso e relação de peso do coração / peso corporal semelhante aos do grupo WT e um leve aumento na capacitância das células isoladas (Tabela 5).

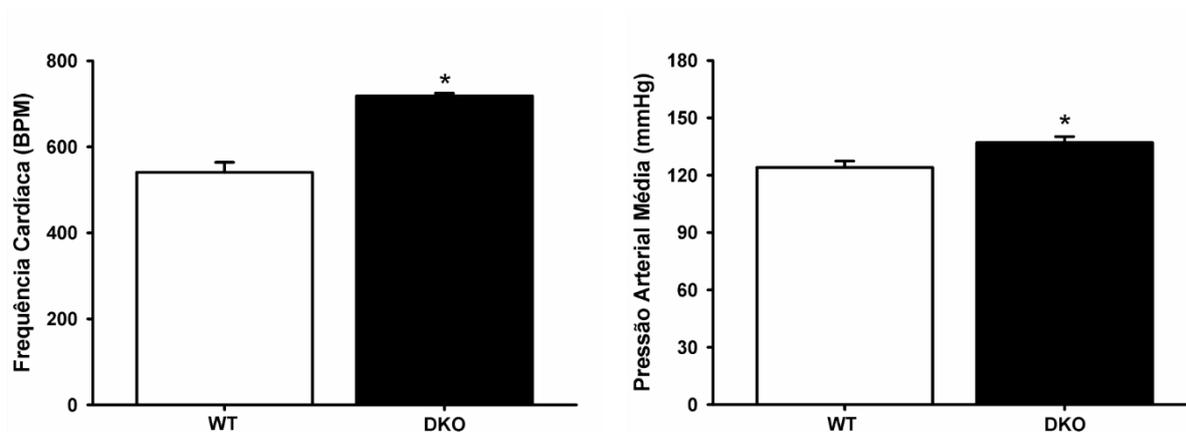


Figura 10. Frequência cardíaca e pressão arterial média dos animais WT e DKO. Os animais DKO apresentam frequência cardíaca e pressão arterial média elevadas característico da hiperatividade simpática. * $P < 0,05$ comparado ao grupo WT.

Tabela 5 – Peso corporal e relação peso do coração / peso corporal dos animais com 7 meses.

	Wild Type (WT) (n=16)	$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO) (n=17)
Peso corporal (g)	$31.6 \pm 0,6$	30.4 ± 0.4
Peso do Coração / Peso Corporal (mg/g)	$7,4 \pm 0.2$	7.7 ± 0.1
Capacitância (pF)	189.8 ± 3.9 (n = 80)	214.8 ± 4.9 (n = 131)

As células isoladas dos camundongos DKO apresentaram déficit contrátil quando estimuladas na frequência de 1 Hz (Figura 11). As células desse grupo também apresentaram fração de encurtamento de $6,4 \pm 0,3$ % com o tempo para 50% do relaxamento de $49,8 \pm 2,0$ ms, valores que diferem dos obtidos no grupo WT: $9,5 \pm 0,8$ % e $41,2 \pm 1,0$ ms. Quando a

frequência de estímulo foi aumentada para 3 Hz, a fração de encurtamento e as velocidades máxima da contração e do relaxamento permaneceram menores no grupo DKO em comparação ao WT (Figura 12; Tabela 6).

Quando as células de ambos os grupos foram estimuladas com isoproterenol (ISO; 100 nM) foi observado um efeito inotrópico e lusitrópico positivo (Figura 12; Tabela 6). De forma surpreendente, as diferenças observadas anteriormente entre os dois grupos foram abolidas. Mostrando que apesar das células apresentarem contratilidade celular reduzida, elas apresentam a sinalização adrenérgica intacta (com isso a reserva cardíaca). Todos os parâmetros da contratilidade celular de ambos os grupos estão sumarizados na Tabela 6.

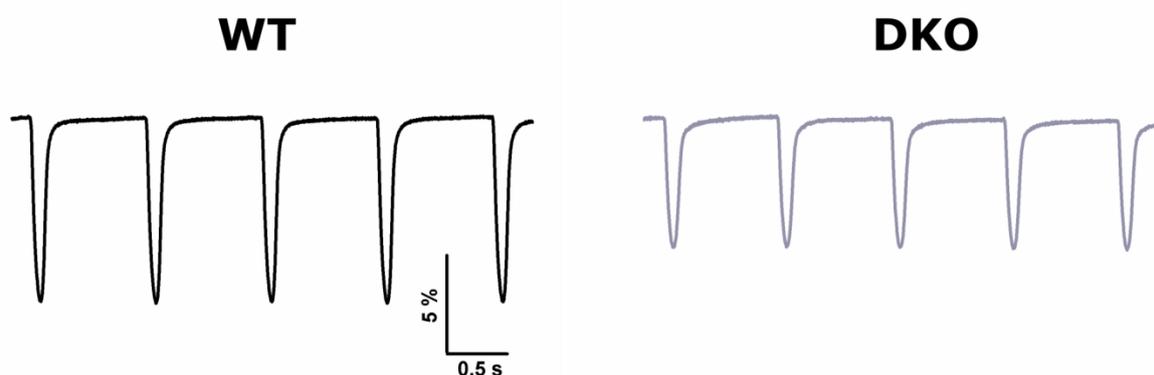


Figura 11. Traçado representativo da contração celular dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) induzida 1 Hz de frequência de estímulo. Nessa frequência é possível observar uma redução significativa na fração de encurtamento das células do grupo DKO.

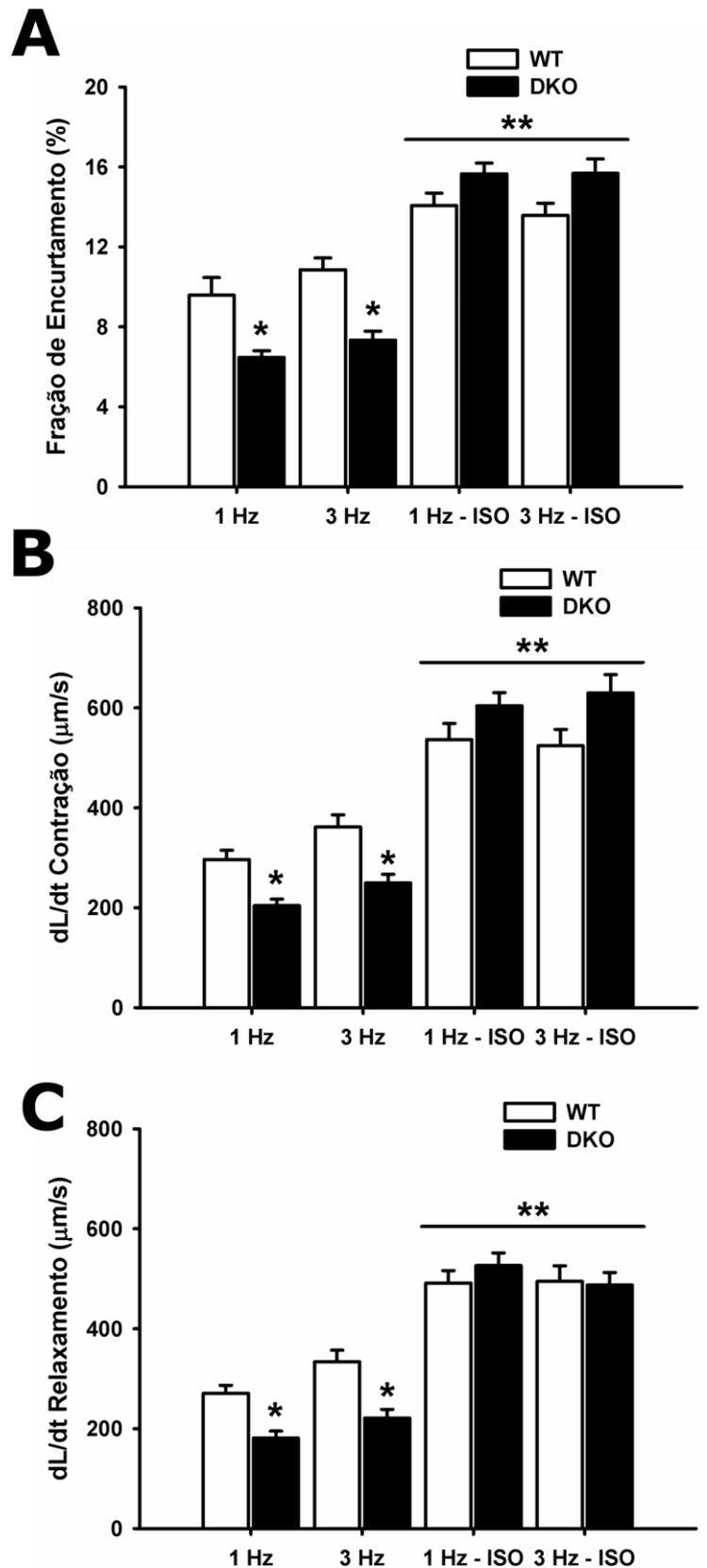


Figura 12. A hiperatividade simpática causa déficit contrátil. Menor fração de encurtamento (A), velocidade de contração (B) e de relaxamento (C) em comparação ao grupo WT. A exposição das células à isoproterenol (ISO; 100nM) tem efeito inotrópico e lusitrópico positivo restaurando a contratilidade celular do grupo DKO. * $P < 0,05$ comparado ao WT na mesma frequência de estímulo; ** $P < 0,05$ comparado ao mesmo grupo a 1 Hz sem Isoproterenol.

Tabela 6 – Parâmetros da contratilidade celular dos animais WT e DKO com 7 meses de idade.

	Wild Type (WT)				$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO)			
			Isoproterenol				Isoproterenol	
	1 Hz (n=53)	3 Hz (n=46)	1 Hz (n=35)	3 Hz (n=29)	1 Hz (n=62)	3 Hz (n=53)	1 Hz (n=32)	3 Hz (n=23)
Comprimento diastólico (μm)	136,9 \pm 3,5	135,5 \pm 3,6	133,8 \pm 3,5	134,2 \pm 3,9	145,9 \pm 4,0	143,0 \pm 3,8	137,2 \pm 4,9	135,8 \pm 5,5
Fração de encurtamento (%)	9,5 \pm 0,8	10,8 \pm 0,5	14,0 \pm 0,6**	13,5 \pm 0,6**	6,4 \pm 0,3*	7,3 \pm 0,4*	15,6 \pm 0,5**	15,6 \pm 0,7**
Tempo para o pico (ms)	89,9 \pm 2,0	79,7 \pm 1,4**	76,9 \pm 2,4**	67,5 \pm 1,4**	88,5 \pm 1,9	76,4 \pm 1,7**	74,0 \pm 2,1**	67,0 \pm 1,2**
dL/dt da contração ($\mu\text{m/s}$)	296,5 \pm 18,2	361,3 \pm 24,4	536,4 \pm 32,4**	524,1 \pm 32,8**	203,9 \pm 13,1*	249,4 \pm 17,6*	604,0 \pm 26,3**	629,9 \pm 36,6**
dL/dt do relaxamento ($\mu\text{m/s}$)	270,7 \pm 15,9	333,5 \pm 23,2	491,1 \pm 25,2**	494,7 \pm 31,0*	181,0 \pm 13,9*	220,8 \pm 17,7*	526,1 \pm 25,5*	487,2 \pm 25,3*
50% do relaxamento (ms)	41,2 \pm 1,0	38,3 \pm 0,9**	37,2 \pm 2,6**	33,1 \pm 2,5**	49,8 \pm 2,0*	42,6 \pm 1,6**	35,9 \pm 0,9**	35,1 \pm 1,1*
90% do relaxamento (ms)	82,4 \pm 2,2	67,3 \pm 1,5**	68,2 \pm 3,8**	59,3 \pm 2,9**	96,1 \pm 4,2*	77,8 \pm 2,9**	67,6 \pm 3,0**	64,9 \pm 3,1**

* P < 0,05 comparado ao WT na mesma frequência de estímulo; ** P < 0,05 comparado ao mesmo grupo a 1 Hz sem Isoproterenol.

Para o melhor entendimento da redução observada na contratilidade celular, foram realizados registros das correntes de cálcio que estão envolvidas na liberação de cálcio induzida por cálcio, mecanismo essencial para contração do músculo cardíaco. Como pode ser observado na Figura 13, os miócitos do grupo DKO tiveram uma menor densidade de corrente ($-9,6 \pm 0,6$ A/F) que os miócitos do grupo WT ($-14,3 \pm 0,6$ A/F). As correntes de cálcio apresentaram uma dependência de voltagem que corresponde aos Ca_vL . A ausência de qualquer corrente detectável na faixa de -70 a -50 mV demonstra que os canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo T não tem expressão significativa em ambos os grupos (Figura 14A). Apesar da condutância reduzida, não foi observado nenhuma alteração na dependência para ativação e inativação dos Ca_vL (Figura 15A e B; Tabela 7).

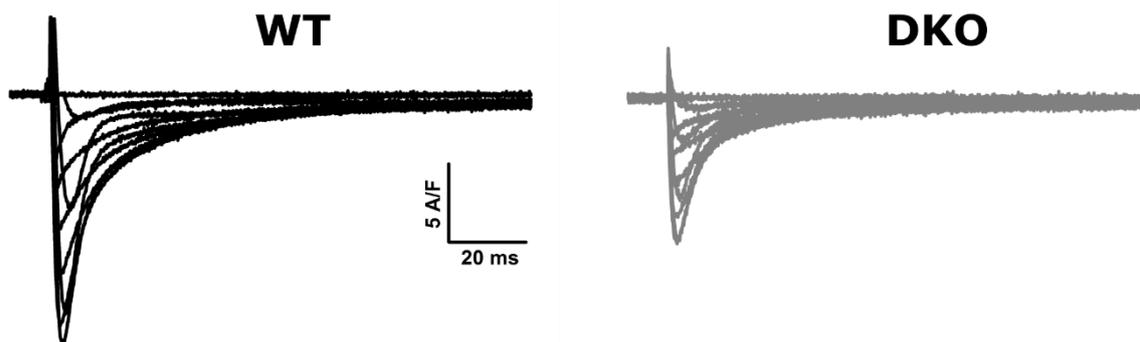


Figura 13. Traçado representativo da corrente de cálcio dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza). As células do grupo DKO apresentam redução significativa na densidade de corrente de cálcio.

Similar ao observado na contratilidade celular, quando os cardiomiócitos foram estimulados com ISO (100 nM), houve um aumento da corrente dos Ca_vL compatível com efeito inotrópico positivo da estimulação dos receptores βAR em ambos os grupos (Figura 14B e C). Após o estímulo, as células de ambos os grupos tiveram densidade de corrente (Figura 14C) e dependência para ativação e inativação similares (Figura 15C e D). Novamente demonstrando que a sinalização adrenérgica está intacta. Os dados das correntes de cálcio estão todas agrupadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros da corrente de cálcio do tipo L nos cardiomiócitos dos animais WT e DKO.

	Wild Type (WT)		$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO)	
	(n = 25)	Isoproterenol (n = 16)	(n = 29)	Isoproterenol (n = 18)
Densidade de corrente (A/F)	$-15,2 \pm 0,8$	$-19,0 \pm 0,7$	$-10,3 \pm 0,8^*$	$-20,9 \pm 1,1$
V1/2 da Ativação (mV)**	-16,2	-24,8	-16,7	-27,2
V1/2 da Inativação (mV)**	-35,8	-41,4	-39,0	-40,1
Condutância Relativa (S/F)**	215,1	253,5	160,0	264,2

* $P < 0,05$ comparado com o WT. ** valor obtido através do ajuste dos dados.

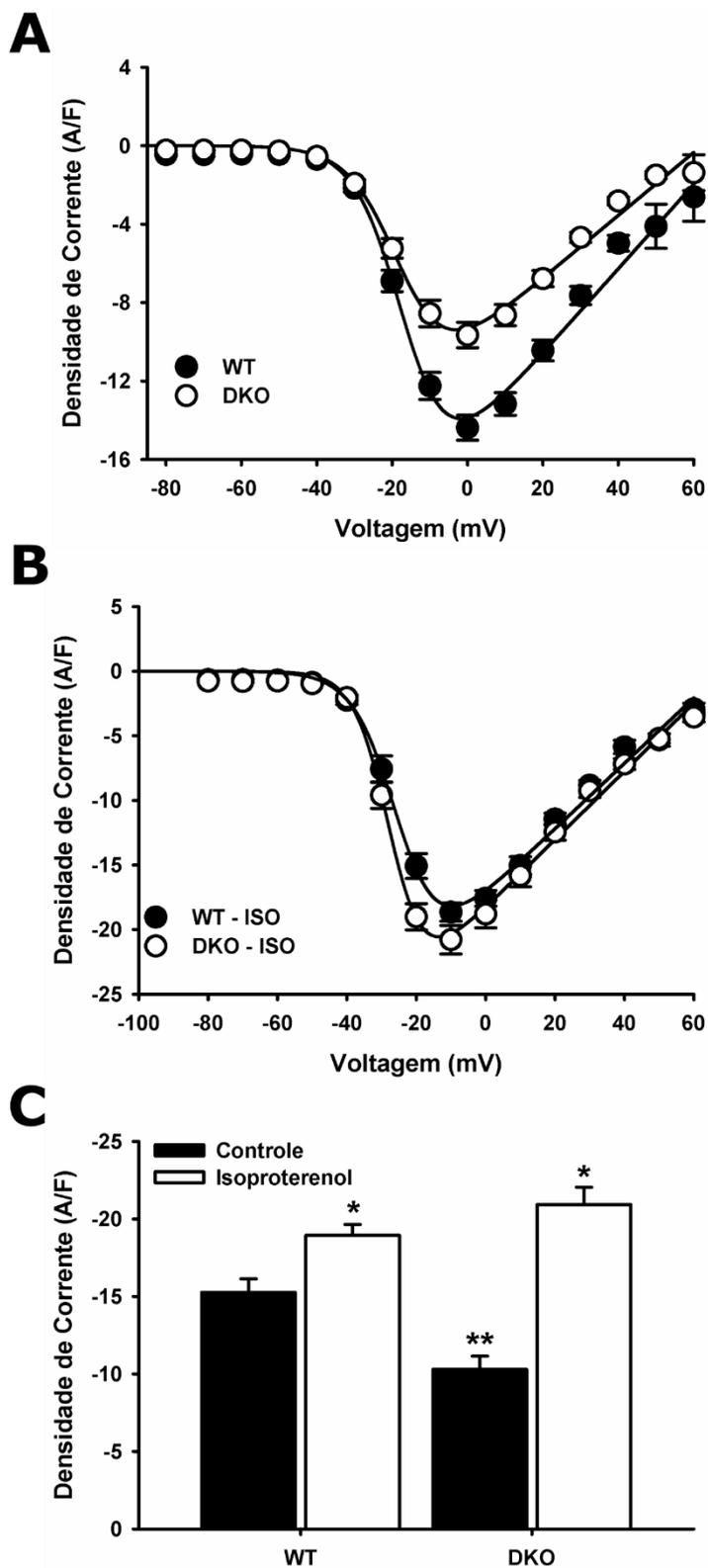


Figura 14. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam menor corrente de cálcio (A e C) em comparação ao grupo WT. A exposição das células à isoproterenol (ISO; 100nM) aumenta a densidade de corrente (B) abolindo as diferenças entre os dois grupos (C). * $P < 0,05$ ao mesmo grupo sem Isoproterenol; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo WT sem Isoproterenol.

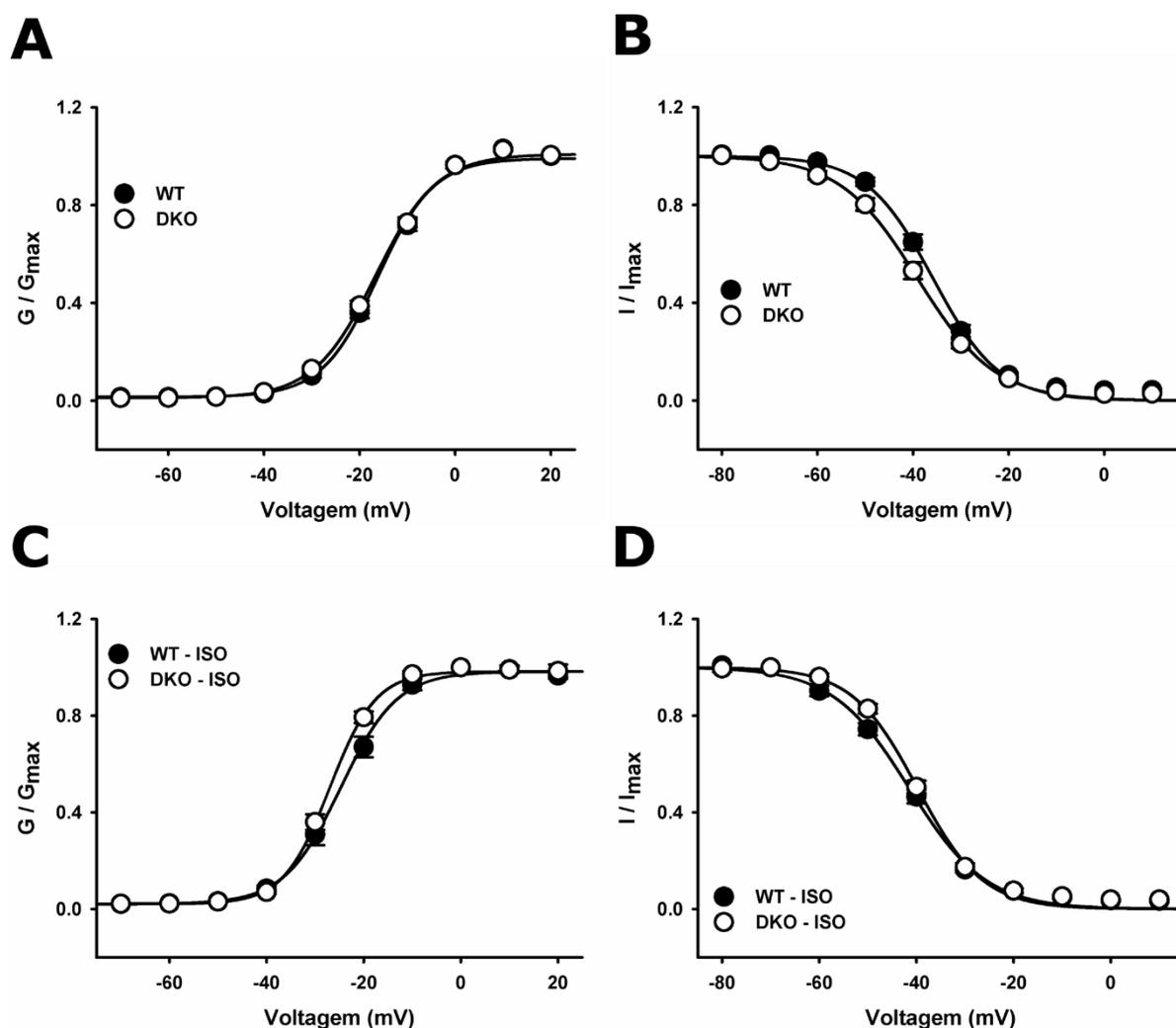


Figura 15. Dependência de voltagem das correntes de cálcio do tipo L. Cardiomiócitos dos animais DKO tem dependência para ativação (A) e inativação (B) das correntes de cálcio similares ao grupo WT mesmo na presença de ISO (C e D).

Corroborando com os dados mostrados previamente, quando estimulados eletricamente (1 Hz), os cardiomiócitos dos animais DKO respondem com um transiente de cálcio de amplitude reduzida ($2,7 \pm 0,4 F/F_0$; $n = 83$) em relação aos seus congêneres WT ($3,2 \pm 0,5 F/F_0$; $n = 90$), como pode ser observado nas Figuras 16 e 17A. Além disso, o transiente de cálcio das células do grupo DKO tem um decaimento mais lento quando comparado as células do grupo WT (Figura 17C), mas sem mudar o tempo para aumento dos níveis de cálcio citosólico (Figura 17B). A frequência de ondas de cálcio também foi similar em ambos os grupos: 8,7% das células WT apresentaram ondas ($0,12 \pm 0,05$ ondas/10s) e 11,4% das células DKO apresentaram ondas de cálcio ($0,28 \pm 0,10$ ondas/10s).

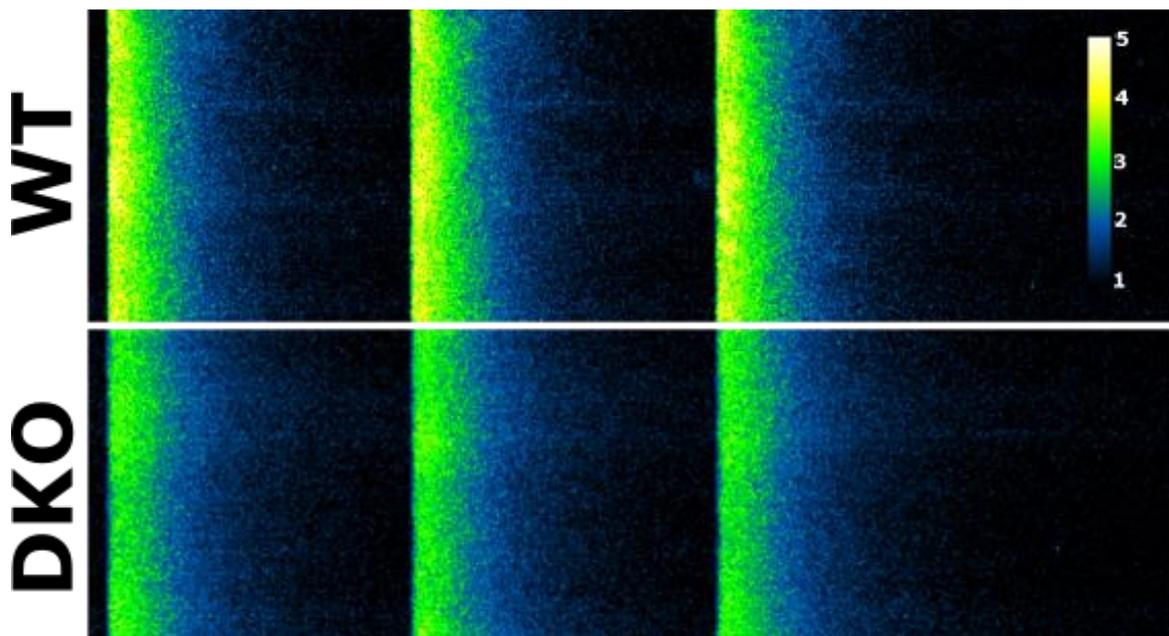


Figura 16 - Imagem representativa do transiente de cálcio dos animais WT e DKO. A barra de calibração do canto superior direito mostra os níveis de intensidade da fluorescência (F/F_0) para a pseudo-coloração utilizada.

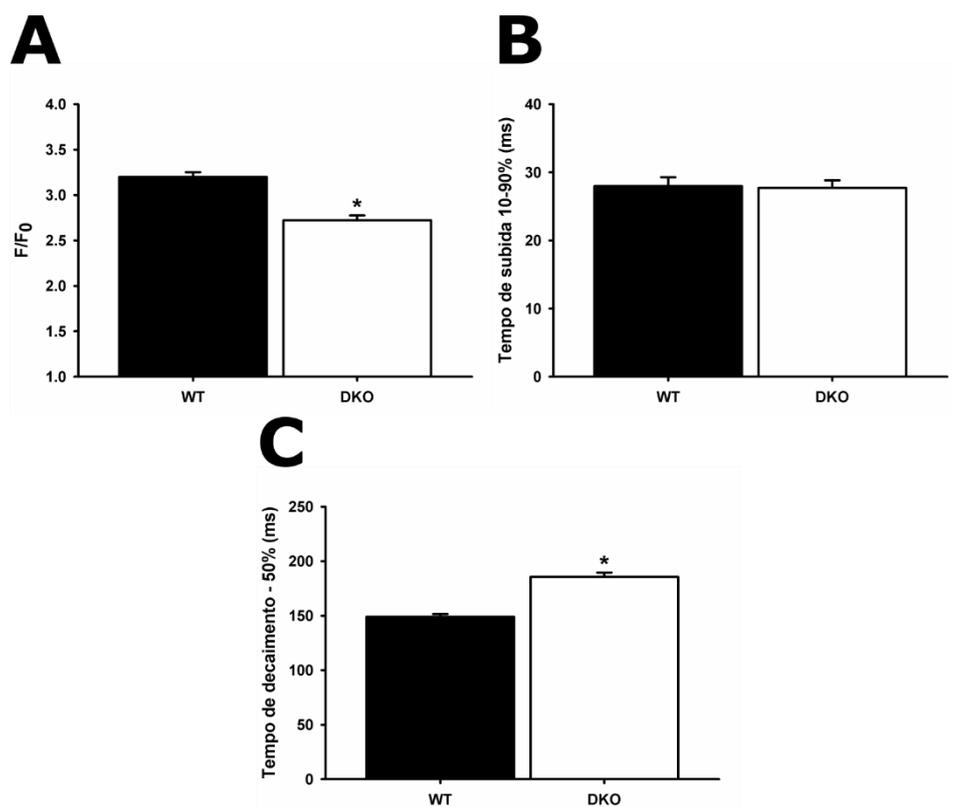


Figura 17. Parâmetros do transiente de cálcio. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam menor amplitude do transiente de cálcio (A) e com decaimento mais lento (C) em comparação ao grupo WT. Sem alterações na fase de subida do transiente (B). * $P < 0,05$ comparado ao grupo WT sem Isoproterenol.

Para ganhar melhor entendimento do resto do processo de acoplamento excitação-contracção cardíaco na hiperatividade simpática crônica, investigamos possíveis alterações no PA em miócitos ventriculares. Os cardiomiócitos isolados dos animais DKO apresentaram um prolongamento acentuado do PA frente aos do grupo WT (Figura 18). Ocorreu um aumento no tempo para 50% ($14,8 \pm 1,3$ ms) e 90% ($205,5 \pm 11,6$ ms) da repolarização no grupo DKO quando comparados com o WT: $7,2 \pm 0,7$ e $136,5 \pm 14,7$ ms, respectivamente. Houve uma redução também na velocidade máxima da repolarização, apresentando valores de $-13,1 \pm 1,1$ V/s no grupo DKO e $-22,0 \pm 2,1$ no grupo WT na frequência de 1 Hz (Figura 19).

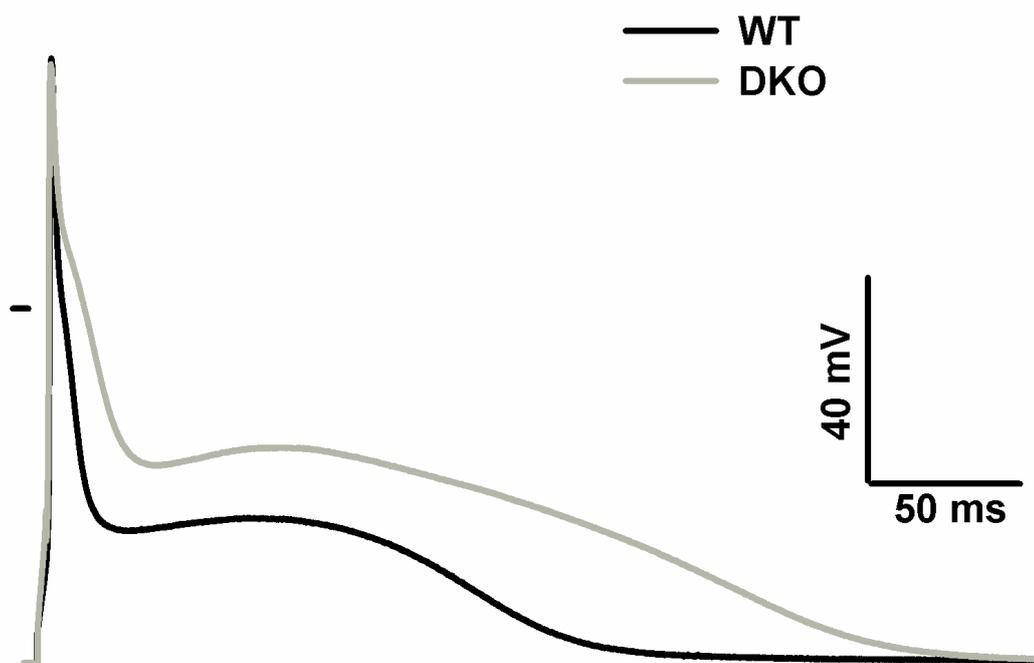


Figura 18. Traçado representativo do potencial de ação dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza). Evidenciando o prolongamento do PA que ocorre em diversas etapas da repolarização nas células do grupo DKO.

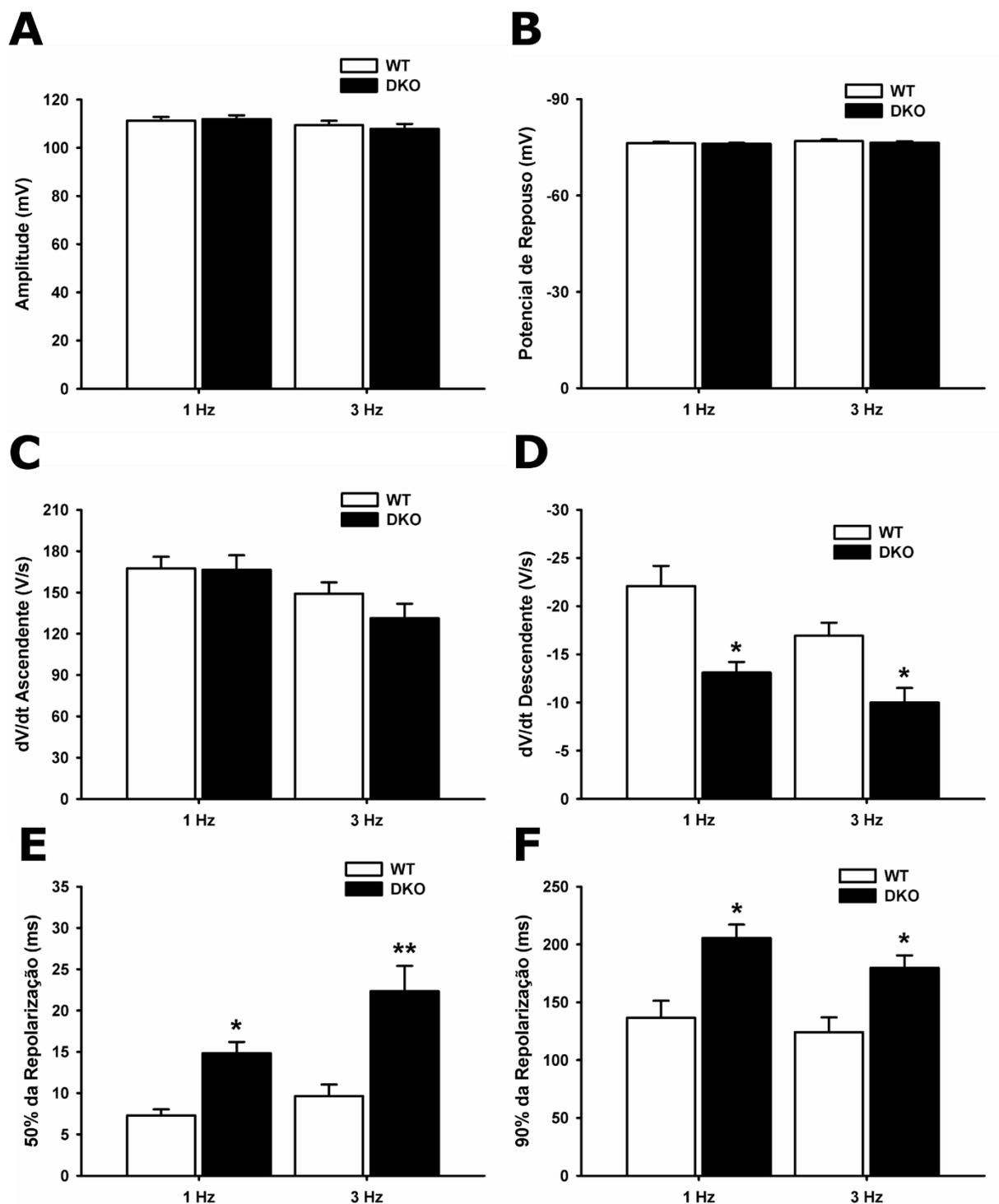


Figura 19. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam prolongamento do PA. Sem alterações na amplitude do PA (A), potencial de repouso (B) e velocidade máxima da despolarização (C). Entretanto foi observado uma menor velocidade máxima da repolarização (D) com um aumento para o tempo para repolarizar 50% (E) e 90% (F) do PA, e com decaimento mais lento (C) em comparação ao grupo WT. * $P < 0,05$ comparado ao WT na mesma frequência de estimulação; ** $P < 0,05$ comparado ao WT a 3 Hz e DKO a 1 Hz.

Apesar de mudanças drásticas na repolarização, os outros parâmetros do PA relacionados a despolarização tais como amplitude e a velocidade máxima da despolarização (Figura 19A e C), bem como o potencial de repouso (Figura 19B) se apresentaram similares em ambos os grupos. Também não foram observados eventos de arritmia nos PA analisados. Todos os valores obtidos nos experimentos de PA dos animais com 7 meses de idade estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros do potencial de ação dos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 7 meses de idade.

	Wild Type (WT)		$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO)	
	1 Hz (n=34)	3 Hz (n=24)	1 Hz (n=32)	3 Hz (n=26)
Potencial de repouso (mV)	-76.2 ± 0.4	-76.9 ± 0.5	-65.0 ± 0.3	-65.4 ± 0.4
Overshoot (mV)	34.9 ± 1.3	32.5 ± 1.5	46.8 ± 1.4	42.4 ± 1.7
Amplitude (mV)	111.2 ± 1.5	109.3 ± 1.8	111.9 ± 1.5	107.8 ± 2.0
+dV/dt (V/s)	167.4 ± 8.4	149.1 ± 8.2	166.5 ± 10.5	131.2 ± 10.5
-dV/dt (V/s)	-22.0 ± 2.1	-16.9 ± 1.3	$-13.1 \pm 1.1^*$	$-10.0 \pm 1.5^*$
10% da repolarização (ms)	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	$2.2 \pm 0.4^{**}$
50% da repolarização (ms)	7.2 ± 0.7	9.6 ± 1.4	$14.8 \pm 1.3^*$	$22.3 \pm 3.0^{**}$
90% da repolarização (ms)	136.5 ± 14.7	124.1 ± 12.7	$205.5 \pm 11.6^*$	$179.6 \pm 10.8^{**}$

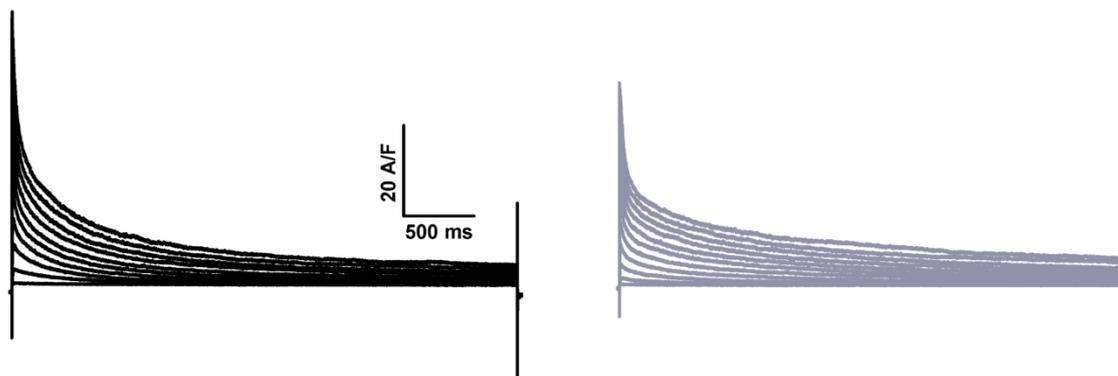
* P < 0,05 comparado ao WT na mesma frequência de estimulação; ** P < 0,05 comparado ao WT a 3 Hz e DKO a 1 Hz.

Nos cardiomiócitos dos animais DKO com 7 meses tem contratilidade celular reduzida e apresentam prolongamento tanto no relaxamento quando na repolarização do PA. Então, conduzimos experimentos para averiguar as correntes iônicas envolvidas na fase de repolarização, as correntes de saída e retificadora de entrada de potássio e também a corrente do trocador sódio-cálcio (NCX).

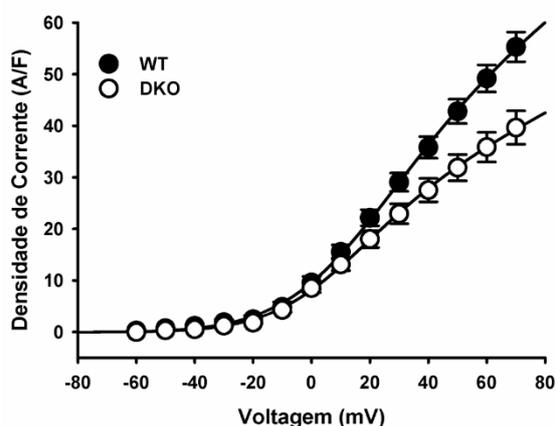
Similar ao observado para a corrente de cálcio, a densidade de corrente de saída de potássio está reduzida nas células dos animais DKO ($39,6 \pm 3,2$ A/F) em relação a corrente das células do grupo WT ($55,6 \pm 2,9$ A/F) (Figura 20). O decaimento das correntes de saídas no potencial de 60 mV foi ajustado através da soma de três exponenciais (ver materiais e métodos) para diferenciar os diferentes tipos de corrente de potássio envolvidas. Com isso foi possível

constatar que a principal corrente afetada nas células dos animais DKO foi o componente rápido da corrente transitória de saída (I_{to_f}) que teve sua densidade reduzida ($16,5 \pm 1,7$ A/F) quando comparado com o grupo WT ($22,7 \pm 1,9$ A/F), como mostrado na Figura 21A. Apesar da densidade dos outros componentes da corrente de potássio serem semelhantes entre os grupos, devido a redução da I_{to_f} , os componentes lento (I_{K_s}) e sustentado (I_{ss}) tem uma maior contribuição para a somatório das correntes de saída de potássio (Figura 21B; Tabela 8).

A



B



C

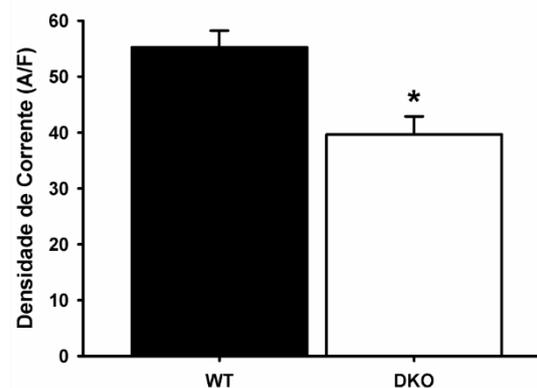


Figura 20. A hiperatividade simpática crônica reduz a corrente de saída de potássio. (A) Traçado representativo da corrente de potássio dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza). (B) Relação Corrente-Voltagem para corrente de potássio. (C) Densidade de corrente no pico da corrente. * $P < 0,05$ comparado ao grupo WT.

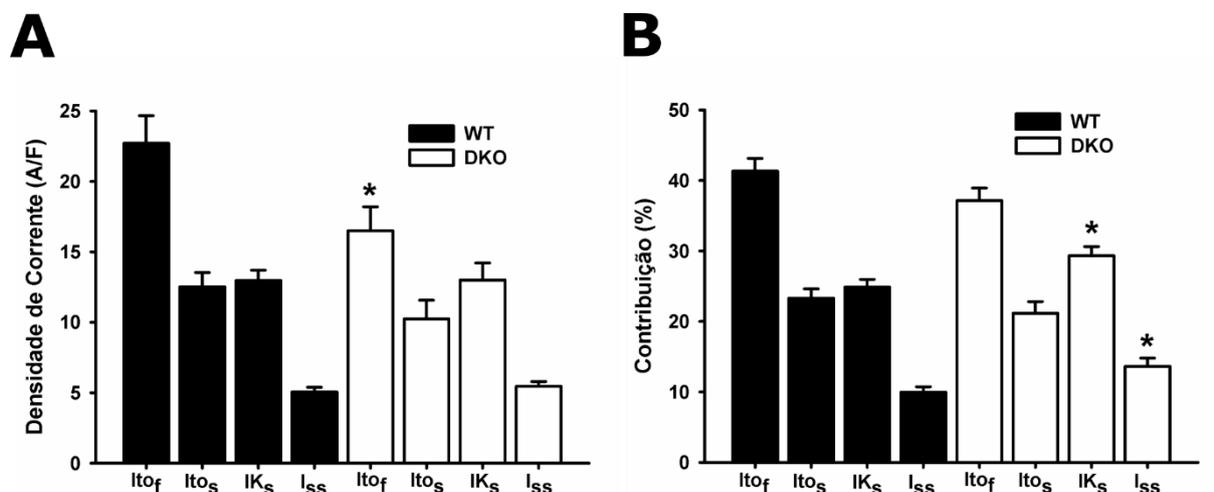


Figura 21. A hiperatividade simpática crônica reduz a corrente transitente rápida de saída de potássio. (A) Densidade de corrente dos componentes da corrente de saída. (B) Contribuição dos componentes para a corrente total de saída. * $P < 0,05$ comparado ao grupo WT.

A corrente retificadora de entrada é outra corrente importante para a repolarização e bem como a manutenção do potencial de repouso dos miócitos cardíacos. Quando realizados os registros dessas correntes não foi possível detectar nenhuma alteração significativa entre os grupos (Figura 22 e Tabela 9). As correntes retificadoras de entrada nos cardiomiócitos do grupo DKO (-28.8 ± 1.1 A/F) não diferem dos observados no grupo WT (-31.5 ± 1.4 A/F). O que corrobora com a ausência de qualquer modificação no potencial de repouso nos animais DKO.

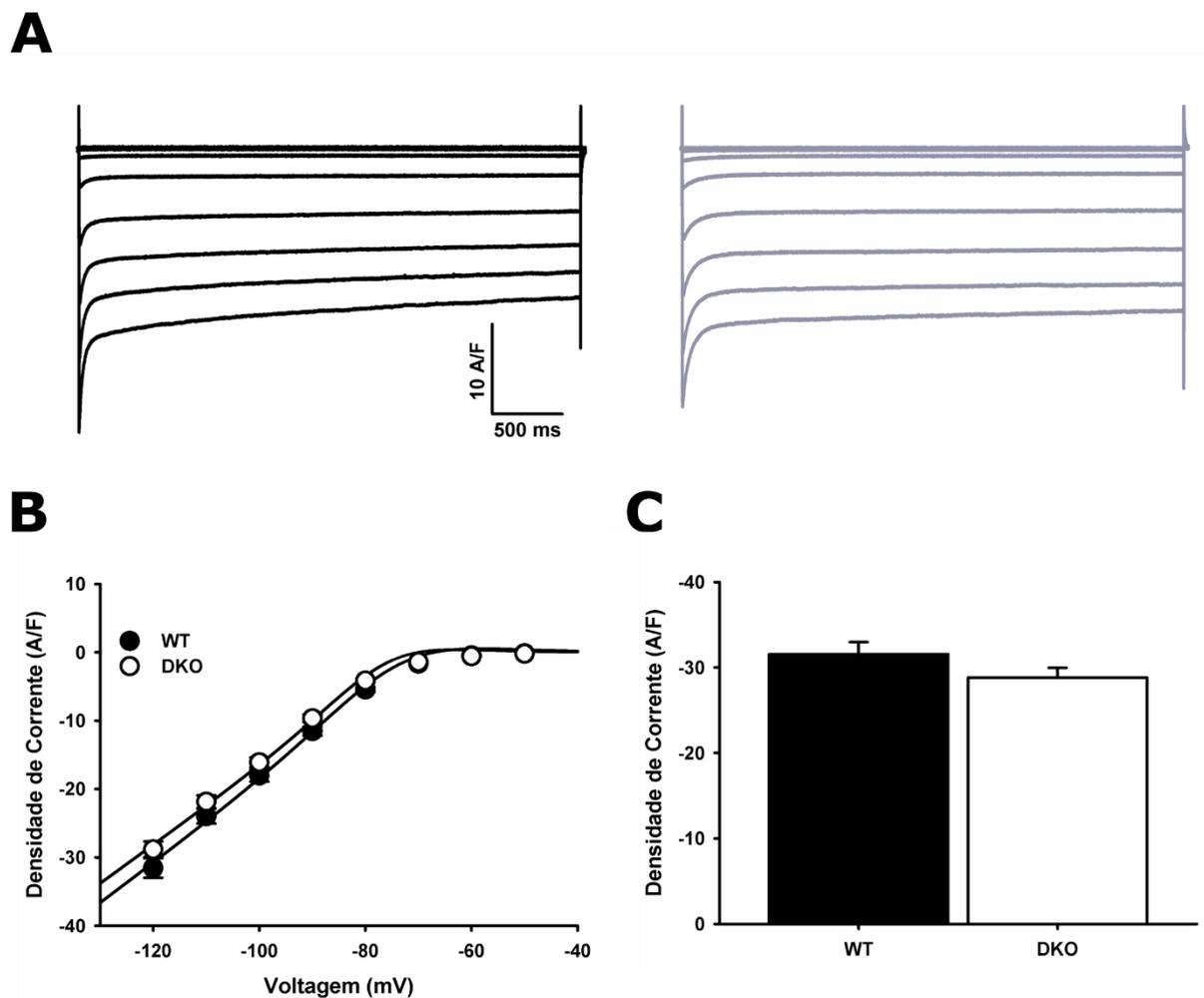


Figura 22. A hiperatividade simpática crônica não altera as correntes de potássio retificadoras de entrada dos cardiomiócitos. (A) Traçado representativo da corrente de entrada dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza). (B) Relação Corrente-Voltagem para corrente de entrada. (C) Densidade de corrente no pico da corrente retificadora.

Tabela 9 – Parâmetros das correntes de potássio nos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 7 meses.

	Wild Type (WT) (n=31)	$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO) (n=34)
Densidade de corrente de saída (A/F)	55,6 ± 2,9	39,6 ± 3,2*
Densidade de corrente de entrada (A/F)	-31,5 ± 1,4	-28,8 ± 1,1
Condutância relativa de saída (S/F)**	413,1	287,9
Condutância relativa de entrada (S/F)**	582,5	564,2
Densidade de corrente da I_{tof} (A/F)	22,7 ± 1,9	16,5 ± 1,7*
Tau I_{tof} (ms)	42,8 ± 2,1	46,0 ± 1,5
Contribuição da I_{tof} (%)	41,3 ± 1,8	37,1 ± 1,8
Densidade de corrente da I_{tos} (A/F)	12,5 ± 1,0	10,2 ± 1,3
Tau I_{tos} (ms)	343,0 ± 16,9	334,0 ± 21,5
Contribuição da I_{tos} (%)	23,2 ± 1,3	21,1 ± 1,6
Densidade de corrente da I_{Ks} (A/F)	12,9 ± 0,7	13,0 ± 1,2
Tau I_{Ks} (ms)	1973,4 ± 136,0	1979,9 ± 133,8
Contribuição da I_{Ks} (%)	24,8 ± 1,1	29,3 ± 1,3*
Densidade de corrente da I_{ss} (A/F)	5,0 ± 0,3	5,4 ± 0,3
Contribuição da I_{ss} (%)	10,0 ± 0,7	13,6 ± 1,1*

* $P < 0,05$ comparado com o WT. ** valor obtido através do ajuste dos dados.

Além de participar na extrusão do cálcio do citosol, o NCX pela sua característica eletrogênica afeta diretamente o potencial transmembrana, principalmente na fase de repolarização do PA cardíaco. Nos animais com hiperatividade simpática observamos um aumento da corrente sensível a 5 mM de Níquel (Figura 23A e B), utilizado nesse estudo para bloquear a corrente do NCX. Nos animais DKO, a densidade de corrente foi de 0.40 ± 0.02 A/F (n = 18), valor significativamente maior que os 0.26 ± 0.04 A/F (n = 9) observados nos animais WT. Dando suporte a esse resultado, encontramos que as células isoladas do grupo DKO tem um aumentado nível de expressão do NCX quando comparado ao observado no grupo WT (Figura 23C).

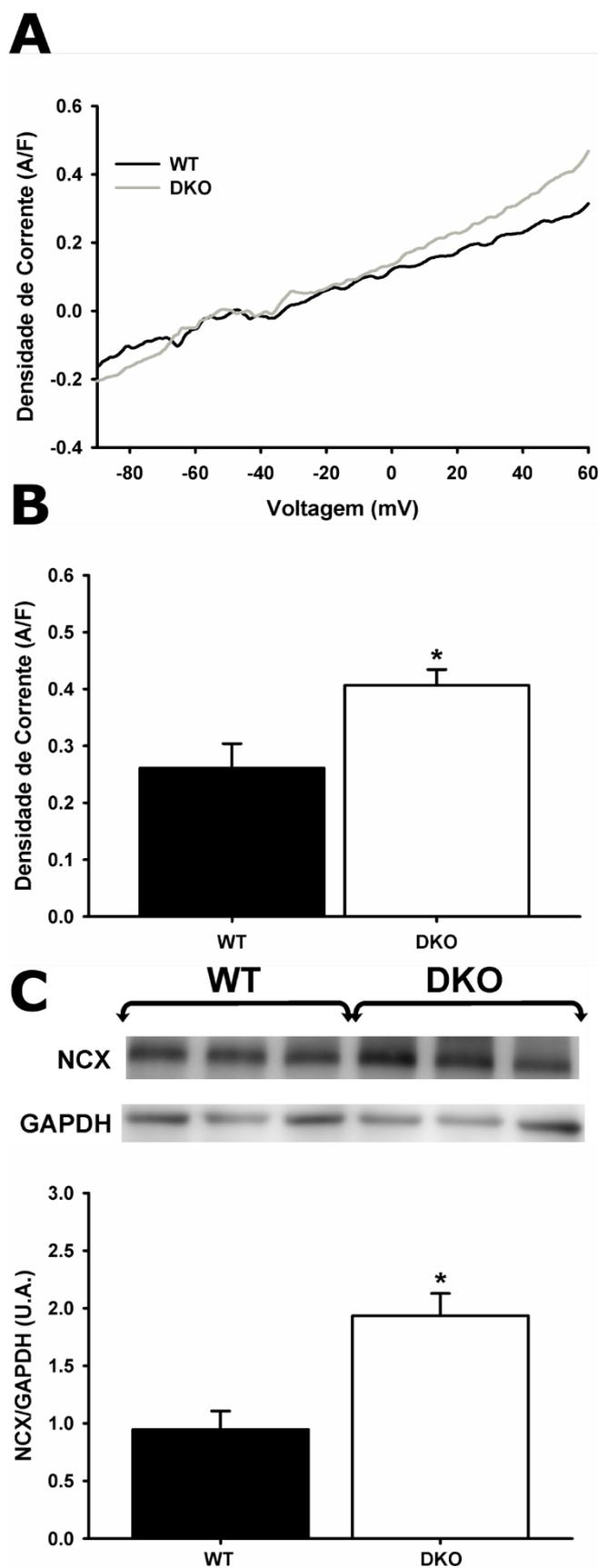


Figura 23. Corrente e expressão do NCX. Cardiomiócitos dos animais DKO apresentam aumento na corrente sensível a níquel (5 mM), atribuída ao NCX (A). Além de um aumento na densidade de corrente (B) é observado também um aumento no nível de expressão do trocador (C). * $P < 0,05$ comparado ao

grupo WT.

Para averiguar a participação de possíveis moduladores endógenos do acoplamento excitação-contração cardíaco utilizamos as sondas fluorescentes DAF e DCF, para avaliar os níveis de produção de óxido nítrico (NO, do inglês Nitric Oxide) e das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), respectivamente. Como pode ser visto nas figuras 24 e 25A, a fluorescência produzida pela sonda DAF não diferiu entre as células dos animais DKO e WT, demonstrando que os níveis de NO nessas células são similares. Entretanto quando observamos a fluorescência da sonda DCF, as células isoladas dos animais DKO tem um claro aumento nos níveis de ROS quando comparado as células dos animais WT (Figura 24 e 25B).

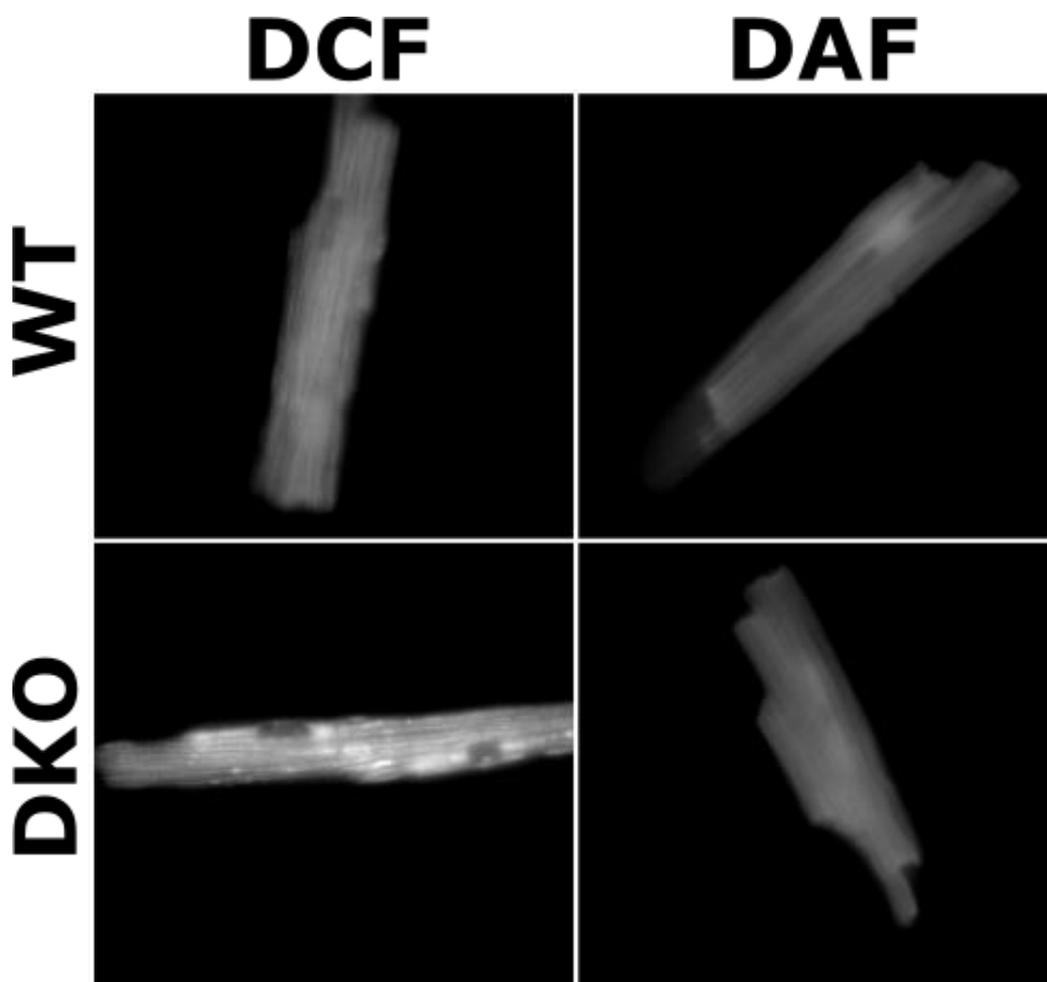


Figura 24. Níveis de ROS e NO. Imagem da fluorescência das sondas DAF (níveis de NO) e DCF (níveis de ROS) em células isoladas de animais WT e DKO. É possível observar um aumento na fluorescência do DCF nas células do grupo DKO.

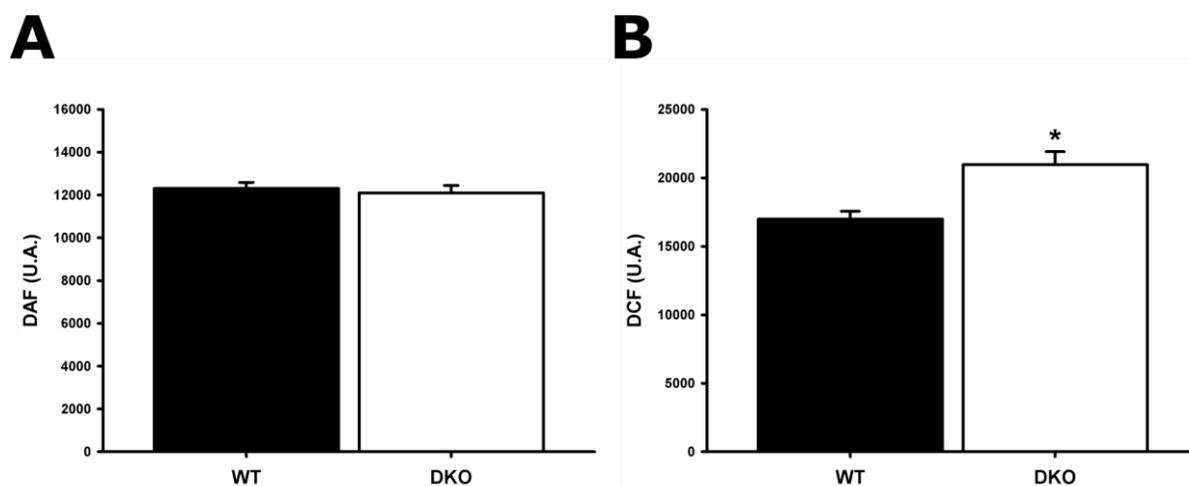


Figura 25. Níveis de fluorescência das sondas DAF (A) e DCF (B) em células isoladas de animais WT e DKO. As células do grupo DKO apresentam maiores níveis de ROS quando comparados ao grupo WT, porém sem alterações nos níveis de NO. * $P < 0,05$ comparado ao grupo WT.

Para averiguar se as alterações no acoplamento excitação-contração observadas são advindas de uma adaptação à hiperatividade simpática crônica realizamos experimentos com animais jovens (3 meses) para verificar se os mesmos já apresentavam alterações ainda nessa fase da vida. Nessa idade os animais DKO apresentaram peso reduzido e células isoladas com menor capacitância quando comparado com os WT, entretanto a relação peso do coração / peso do corpo não foi alterado (Tabela 10).

Tabela 10 – Peso corporal e relação peso do coração / peso corporal dos animais com 3 meses.

	Wild Type (WT) (n=6)	$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO) (n=6)
Peso corporal (g)	$27,5 \pm 0,7$	$24,8 \pm 0,8^*$
Peso do Coração / Peso Corporal (mg/g)	$7,7 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,2$
Capacitância (pF)	$139,1 \pm 7,9$ (n = 18)	$171,8 \pm 6,5^*$ (n = 21)

* $P < 0,05$ comparado ao grupo WT.

Os cardiomiócitos de ambos os grupos com 3 meses apresentaram um bom padrão de encurtamento tendo uma fração de encurtamento de $7,5 \pm 0,7$ % com o tempo para 50% do relaxamento de $43,7 \pm 1,2$ ms nas células do grupo WT quando estimulados a 1 Hz. Enquanto

os cardiomiócitos do grupo DKO com 3 meses apresentam parâmetros de contratilidade celular similares com $8,6 \pm 0,6$ % de fração de encurtamento e $41,9 \pm 2,1$ ms de tempo para 50% do relaxamento (Figura 26). Em ambos os grupos, isoproterenol e o aumento da frequência de estimulação (3 Hz) tiveram um efeito inotrópico e lusitrópico positivo que não diferiram entre os grupos. Os parâmetros da contratilidade celular de todos animais com 3 meses estão sumarizados na Tabela 11.

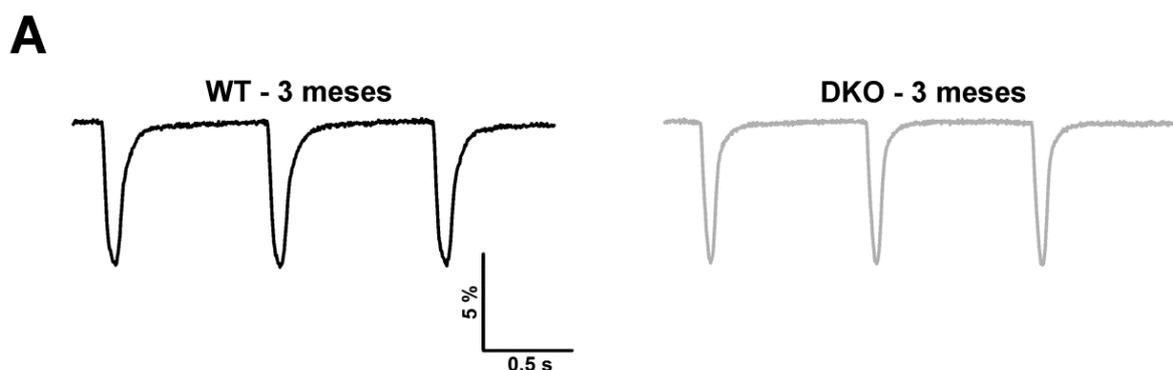


Figura 26. Traçado representativo da contração celular dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) com 3 meses. As contrações foram induzidas à 1 Hz de frequência de estímulo. Não foi possível observar alterações significativas na contratilidade celular entre os grupos.

Similar ao observado com a contratilidade celular, o PA das células de ambos os grupos se mostrou similar nos diversos parâmetros analisados (Figura 27). Por exemplo, a amplitude do PA foi de $110,7 \pm 1,8$ mV e $112,4 \pm 1,3$ mV para os grupos WT e DKO, respectivamente. Outro parâmetro importante, o tempo para repolarização não sofreu mudanças em nenhum dos 3 pontos analisados. Também não foram observadas mudanças nos parâmetros eletrofisiológicos quando as células foram estimuladas na frequência de 3 Hz. Os parâmetros do PA estão sumarizados na Tabela 12.

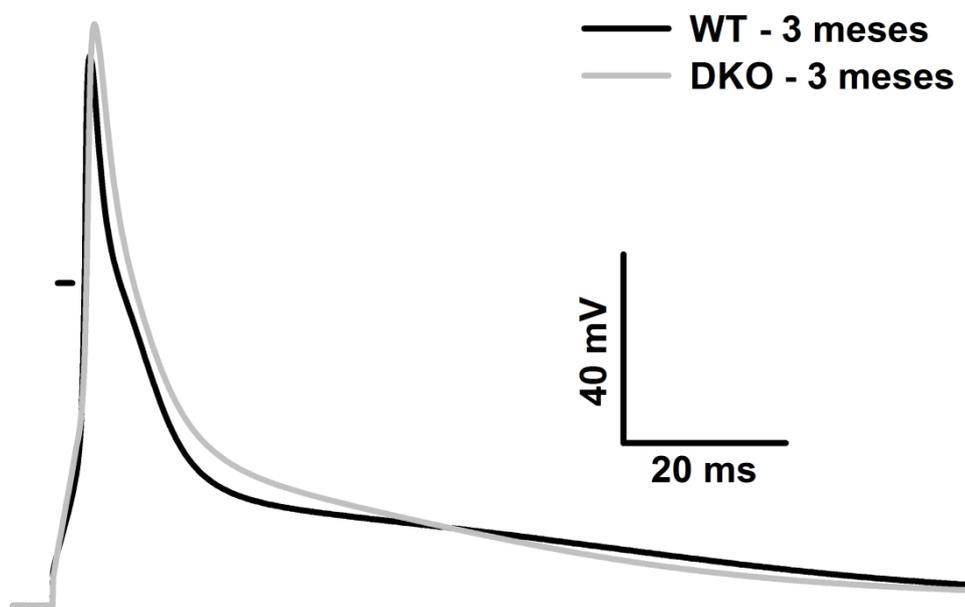


Figura 27. Traçado representativo do potencial de ação dos animais WT (Preto) e DKO (Cinza) com 3 meses. De forma similar a contratilidade celular, não foi observado alterações nas propriedades elétricas dos cardiomiócitos em ambos os grupos.

Tabela 11 – Parâmetros da contratilidade celular dos animais WT e DKO com 3 meses de idade.

	Wild Type (WT)				$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO)			
			Isoproterenol				Isoproterenol	
	1 Hz (n=22)	3 Hz (n=22)	1 Hz (n=18)	3 Hz (n=15)	1 Hz (n=23)	3 Hz (n=19)	1 Hz (n=19)	3 Hz (n=19)
Comprimento diastólico (μm)	150,1 \pm 5,6	150,1 \pm 5,3	138,3 \pm 4,0	136,5 \pm 4,5	121,0 \pm 3,6	117,8 \pm 4,1	128,4 \pm 4,2	127,3 \pm 4,2
Fração de encurtamento (%)	7,5 \pm 0,7	10,6 \pm 0,7*	10,4 \pm 1,1*	12,0 \pm 1,2*	8,6 \pm 0,6	11,4 \pm 0,9*	12,2 \pm 0,7*	12,8 \pm 0,7*
Tempo para o pico (ms)	84,5 \pm 3,0	77,9 \pm 2,1	67,3 \pm 2,2*	67,3 \pm 2,2*	83,01 \pm 3,3	80,3 \pm 4,5	69,6 \pm 2,8*	64,9 \pm 1,8*
dL/dt da Contração ($\mu\text{m/s}$)	243,8 \pm 20,1	378,4 \pm 28,5*	429,1 \pm 60,2*	474,5 \pm 58,0*	226,8 \pm 18,0	319,7 \pm 26,2*	437,2 \pm 34,4*	477,9 \pm 31,5*
dL/dt do relaxamento ($\mu\text{m/s}$)	203,3 \pm 16,2	341,9 \pm 23,9*	388,5 \pm 52,4*	444,8 \pm 47,5*	202,7 \pm 19,7	321,2 \pm 28,5*	426,2 \pm 32,0*	472,2 \pm 31,2*
50% do relaxamento (ms)	43,7 \pm 1,2	35,7 \pm 1,2*	31,8 \pm 1,7*	27,2 \pm 1,0*	41,9 \pm 2,1	32,4 \pm 1,3*	28,6 \pm 0,9*	26,1 \pm 0,9*
90% do relaxamento (ms)	104,1 \pm 4,0	74,3 \pm 3,1*	74,4 \pm 5,8*	57,8 \pm 3,9*	105,7 \pm 6,1	67,8 \pm 3,6*	65,9 \pm 4,0*	57,3 \pm 3,7*
Tau (ms)	47,3 \pm 2,9	33,8 \pm 1,4*	30,3 \pm 2,4*	26,1 \pm 1,2*	47,5 \pm 2,1	37,6 \pm 2,0*	31,1 \pm 1,9*	30,0 \pm 1,7*

* P < 0,05 comparado ao mesmo grupo a 1 Hz sem Isoproterenol (ANOVA seguido por Tukey).

Tabela 12 – Parâmetros do potencial de ação dos cardiomiócitos dos animais WT e DKO com 3 meses de idade.

	Wild Type (WT)		$\alpha 2a/ \alpha 2c$ KO (DKO)	
	1 Hz (n=15)	3 Hz (n=13)	1 Hz (n=16)	3 Hz (n=12)
Potencial de Repouso (mV)	-64,4 \pm 0,6	-64,0 \pm 0,6	-65,2 \pm 0,5	-65,0 \pm 0,6
Overshoot (mV)	46,2 \pm 1,5	44,2 \pm 1,5	49,4 \pm 1,4	47,1 \pm 1,7
Amplitude (mV)	110,7 \pm 1,8	108,2 \pm 2,0	112,4 \pm 1,3	112,8 \pm 1,9
+dV/dt (V/s)	122,4 \pm 8,2	108,5 \pm 8,0	128,6 \pm 12,7	102,7 \pm 9,8
-dV/dt (V/s)	-21,4 \pm 1,6	-19,8 \pm 1,7	-23,9 \pm 6,3	-15,3 \pm 1,8
10% da repolarização (ms)	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2
50% da repolarização (ms)	5,2 \pm 0,7	5,5 \pm 0,8	7,5 \pm 1,2	8,9 \pm 1,7
90% da repolarização (ms)	61,1 \pm 7,7	68,3 \pm 9,7	54,1 \pm 7,7	89,4 \pm 9,6

6 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que no modelo genético de hiperatividade simpática, ocorre uma disfunção contrátil em cardiomiócitos ventriculares por um remodelamento de diversos canais iônicos e transportadores essenciais para o acoplamento excitação-contração. Essas alterações foram observadas antes de uma hipertrofia severa e sem comprometimento da sinalização adrenérgica.

A redução na contratilidade é um ponto comum em diversas disfunções cardíacas, incluindo a insuficiência cardíaca. Entretanto, o déficit contrátil pode não se apresentar em certas condições tais como: frequência cardíacas baixas, ausência de catecolaminas e outros (Houser e Margulies, 2003). No presente trabalho, o modelo de hiperatividade simpática endógena, gerada pela deleção dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} , reduziu a fração de encurtamento e velocidade máxima da contração e relaxamento em 1 e 3 Hz de estimulação, que se correlaciona com uma redução na densidade da corrente de cálcio.

Em geral, os modelos que causam aumento da estimulação adrenérgica, pela administração de isoproterenol em animais ou no meio de cultura de cardiomiócitos isolados, causam uma redução na contratilidade cardíaca (Suzuki *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002; Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011). Entretanto, uma concomitante redução na densidade de corrente de cálcio nem sempre se apresenta nesse modelo. Apesar de estudos mostrarem diminuição nas correntes de cálcio (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), em alguns casos ocorre uma manutenção da corrente macroscópica (Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011). Essa relativa inconsistência pode ser devido à uma não uniformidade da administração de isoproterenol, onde alguns resultados variam de acordo com o modelo animal, dose utilizada e tempo de tratamento.

A redução das correntes de cálcio induz diretamente um processo de disfunção contrátil (Goonasekera *et al.*, 2012). Contudo, na insuficiência cardíaca uma redução da contratilidade celular pode não ter correlação direta com uma diminuição na densidade de

corrente de cálcio do tipo L (Bers, 2006), e se apresenta com mais frequência em fases mais tardias (Aiba e Tomaselli, 2010). Além disso, uma diminuição da expressão dos CavL é algo que não está presente em todos os casos (Pitt *et al.*, 2006). Entretanto, é possível uma redistribuição onde há queda considerável na corrente de cálcio na membrana do túbulo T, devido a um remodelamento do mesmo, com concomitante aumento na membrana sarcoplasmática (Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011). Esse remodelamento do túbulo T é um fator importante para transição entre um estado hipertrófico e a insuficiência cardíaca, pois tem íntima relação com função contrátil (Wei *et al.*, 2010).

Já em humanos, nas fases finais da insuficiência cardíaca, em muitos casos, não são observadas diferenças entre as correntes de cálcio macroscópicas (Aiba e Tomaselli, 2010), uma possível explicação é que a probabilidade de abertura dos CavL unitários se encontra aumentada, em células de pacientes com insuficiência cardíaca por um provável aumento na fosforilação desses canais ou redistribuição das subunidades (Schröder *et al.*, 1998). Porém, no presente estudo, não foram observados nenhuma mudança na dependência de voltagem para ativação ou inativação que se correlacionam com um estado de fosforilação ou mudança das subunidades. Além disso, algumas cinases importantes para a modulação dos CavL como a CaMKII não apresenta mudanças no seu perfil de expressão no presente modelo (Oliveira *et al.*, 2009).

Os possíveis mecanismos envolvidos na redução na densidade de corrente de cálcio observada na hiperatividade simpática são: 1) A hipertrofia celular, e logo a capacitância, encontradas nesse estudo e em outros envolvendo a estimulação β -adrenérgica exógena (Zhang *et al.*, 2005; Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011). 2) O aumento na expressão ou atividade das fosfatases no tecido cardíaco, tais como o aumento na expressão de PP1 no modelo DKO (Rolim *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009), bem como aumento da atividade das fosfatases e o

efeito sobre os Ca_vL no túbulo T, como mostrado no modelo de administração de isoproterenol (Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011).

Sendo o aumento da atividade simpática o gatilho primário para a disfunção contrátil nesse modelo, parece que se faz necessário um tempo relativamente prolongado (alguns meses para modelos murinos) para que estimulação adrenérgica elevada evolua para disfunção contrátil propriamente dita. Fato que é demonstrado aqui e em outros estudos que animais DKO jovens apresentam função cardíaca normal apesar da aumentada atividade do SNS (Hein *et al.*, 1999; Brum *et al.*, 2002). O fato de que os β AR estarem constantemente sobre forte estimulação pode causar uma dessensibilização dos mesmos e diminuir a reserva cardíaca. É amplamente aceito que na insuficiência cardíaca ocorre uma queda na expressão dos β AR, bem como seu desacoplamento das respectivas proteínas G, mecanismo mediado via GRKs (Lymperopoulos *et al.*, 2013). Isso desencadeia um desarranjo na sinalização β -adrenérgica, que reduz de forma severa a reserva cardíaca, o que compromete a capacidade do coração de responder a demandas aumentadas de débito cardíaco (Houser e Margulies, 2003).

No modelo que utilizamos de hiperatividade simpática, a estimulação com isoproterenol normalizou os parâmetros de contratilidade celular e da corrente de cálcio, demonstrando que a sinalização adrenérgica continua intacta e com um certo grau de reserva contrátil. Isso corrobora com estudos anteriores, com o mesmo modelo onde a disfunção cardíaca causada pela hiperatividade simpática não parece se relacionar com uma possível dessensibilização ou queda na expressão dos β AR (Brum *et al.*, 2002). Nos modelos de administração de isoproterenol, o aumento da corrente de cálcio pela estimulação β -adrenérgica se mostra intacta, quando a exposição ocorre por um curto período de tempo, como em cultura de células (Zhang *et al.*, 2002) ou por 21 dias de administração subcutânea em camundongos (Horiuchi-Hirose *et al.*, 2011), e tem uma redução após 4 meses da administração de doses de 340 mg/kg por 2 dias (Zhang *et al.*, 2005). Juntamente com resultados mostrados nesse estudo,

o cenário mais provável é que a hiperatividade simpática crônica leve a um quadro de disfunção contrátil, que inicialmente ocorre a partir da redução das correntes de cálcio do tipo L e do manejo de cálcio por uma alteração de proteínas chaves nesse processo (Rolim *et al.*, 2007; Bartholomeu *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009), isso sem alterações na sinalização β -adrenérgica.

Outra alteração importante encontrada nos animais com hiperatividade simpática foi um aumento na duração do PA, devido a uma fase de repolarização mais lenta. O prolongamento do PA é característico do quadro de insuficiência cardíaca independente da causa primária, sendo um fator importante para o surgimento de eventos arrítmicos (Aiba e Tomaselli, 2010; Coronel *et al.*, 2013). O prolongamento do PA é um mecanismo importante para a manutenção da contratilidade frente ao déficit contrátil característico da insuficiência cardíaca, já que controla diretamente a corrente de cálcio, gatilho primário da LCIC (Bers, 2002). Isso é evidenciado pelo fato que, mesmo células saudáveis quando estimuladas usando o PA prolongado (similares ao observado na insuficiência cardíaca) respondem com um transiente de cálcio de maior amplitude, devido a uma maior entrada de cálcio através dos CavL, e um concomitante aumento na carga de cálcio do RS (Louch *et al.*, 2010).

Sendo o PA, um balanço orquestrado entre correntes despolarizantes e repolarizantes, qualquer desequilíbrio entre elas leva a mudanças significativas. Entretanto, apesar do prolongamento ser um fator comum em diversas disfunções cardíacas, os elementos envolvidos podem diferir consideravelmente (Aiba e Tomaselli, 2010). No coração, as correntes repolarizantes são um conjunto diverso de subtipos de correntes de potássio, e as correntes despolarizantes formadas principalmente das correntes dos Nav, CavL e NCX (Coronel *et al.*, 2013). A hiperatividade simpática não alterou os parâmetros que são diretamente ligados aos Nav (amplitude, $+dV/dt$), e a corrente dos CavL está menor. Então o prolongamento da fase de repolarização observado tem uma correlação direta com: 1) redução das correntes de potássio;

2) aumento na corrente e expressão do NCX.

Uma redução na densidade da corrente de potássio é demonstrada em modelos de administração de isoproterenol em animais (Aflaki *et al.*, 2014) e em cultura de células (Zhang *et al.*, 2002), bem como em outros modelos de insuficiência cardíaca (Aiba e Tomaselli, 2010). Entretanto quando analisamos a contribuição dos subtipos das correntes de potássio, verificamos que não tivemos reduções em componentes mais lentos (advinda dos retificadores retardados) e da corrente dos retificadores de entrada. Apesar de serem muito importantes para o controle da duração do potencial de ação em grandes mamíferos, as correntes dos retificadores retardados têm papel discreto em modelos de pequenos roedores. Já no caso dos retificadores de entrada, sua diminuição acontece em fases finais da insuficiência cardíaca em humanos, e tem um papel importante junto com a sensibilidade dos RYR para a geração de arritmias (Myles *et al.*, 2015). Entretanto, no modelo de estimulação adrenérgica crônica usado nesse estudo, não há aumento na frequência de ondas de cálcio, eventos típicos quando há aumento da sensibilidade dos RYR, e de outros eventos arrítmicos no PA. Levando em conta que não há mudanças na IK1, demonstramos que ao menos em fases iniciais da insuficiência cardíaca induzida pela hiperatividade simpática, o prolongamento do PA não se correlaciona com eventos arrítmicos.

O maior responsável pela diminuição da densidade de corrente de potássio obtida em nossos experimentos foi uma queda na densidade da Ito. A redução na Ito é a modificação mais comum na insuficiência cardíaca (Aiba e Tomaselli, 2010). Essa corrente tem uma grande contribuição na duração do PA em pequenos roedores, mas não tem grande influência em mamíferos maiores. Entretanto é o principal responsável pela repolarização inicial (fase 1) em cardiomiócitos de mamíferos de maior porte, tais como caninos (Greenstein *et al.*, 2000; Sun e Wang, 2005). Devido ao seu papel modulador da fase 1 do potencial de ação, essa corrente controla indiretamente o fluxo inicial de cálcio pelos CavL, e assim o CICR e a contratilidade.

Quando há uma redução da Ito, a repolarização da fase 1 é menos proeminente, isso aumenta o fluxo de cálcio nessa fase do PA, o que aumenta a liberação de cálcio pelo RS e conseqüentemente a contração celular (Dong *et al.*, 2010).

O aumento da expressão do NCX e seu papel no controle da concentração de cálcio intracelular é algo já descrito no modelo DKO (Rolim *et al.*, 2007), e aqui relacionamos o aumento da corrente do NCX com o prolongamento do PA na hiperatividade simpática crônica. Na insuficiência cardíaca (inclusive no modelo usado nesse estudo), há uma diminuição na expressão da SERCA, que leva a um retardo na diminuição dos níveis de cálcio intracelular na diástole. De modo compensatório, é necessário um aumento da extrusão de cálcio via NCX, na tentativa de manter o relaxamento em níveis normais (Bers, 2006). Além disso, o modo reverso do NCX pode auxiliar na entrada de cálcio na fase de sístole, principalmente na insuficiência cardíaca, onde há menor liberação de cálcio pelo RS e maior concentração de sódio intracelular (Dipla *et al.*, 1999; Bers, 2006). A corrente do NCX tem natureza despolarizante e também participa diretamente na fase de repolarização do PA cardíaco. Na insuficiência cardíaca há um aumento na corrente do NCX, em ambos os modos, e pode alterar drasticamente a forma do PA de acordo com o estado da célula cardíaca, tais como concentração de cálcio e sódio intracelular (Hobai e O'rourke, 2000; Armoundas *et al.*, 2003). Em camundongos saudáveis, uma induzível superexpressão de NCX1 causa um pronunciado prolongamento do PA sem alterar de forma significativa a amplitude e potencial de repouso (Wang *et al.*, 2009). Além disso a superexpressão de NCX1 por si não altera os transientes de cálcio e a contratilidade em níveis fisiológicos de cálcio extracelular. Para que os efeitos do aumento da corrente de NCX sobre esses parâmetros se tornem aparentes, é preciso um desbalanço de cálcio pela alteração da função das proteínas envolvidas no seu transporte, resultado direto do processo de insuficiência cardíaca (Wang *et al.*, 2009).

Além de enzimas que controlam a fosforilação e função de canais iônicos e

transportadores, outros reguladores endógenos como as ROS são importantes para a modulação da função contrátil. O estado redox da célula é dado principalmente pelo balanço entre a produção de ROS e sua remoção por sistemas antioxidantes (Tsutsui *et al.*, 2011). Na insuficiência cardíaca esse balanço é perdido, devido à um aumento na produção de ROS por diversas fontes (Mitocôndria, NAD(P)H Oxidase e outros) com concomitante déficit no aparato antioxidante (Tsutsui *et al.*, 2011). Esse estado de estresse oxidativo tem uma grave influência não só diretamente no tecido cardíaco como em todo o sistema cardiovascular, seja diretamente atuando sobre o coração e vasos causando um déficit contrátil e hipertensão, ou indiretamente elevando a pressão arterial através da modulação renal e do sistema nervoso central que é modificada pelas ROS (Brown e Griendling, 2015).

A estimulação β -adrenérgica, além dos seus efeitos inotrópico e lusitrópicos nos miócitos cardíacos, aumenta a produção mitocondrial de ROS de forma dependente de PKA e independente de cálcio (Nagasaka *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2011). Sendo assim, os efeitos da estimulação β -adrenérgica parecem depender, ao menos em parte, da produção de ROS. A apoptose induzida pela ativação dos β AR em cardiomiócitos é inibida consideravelmente através da adição exógena ou superexpressão de enzimas antioxidantes (Remondino *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que na presença de alguns antioxidantes, 100nM de isoproterenol, teve seus efeitos sobre a contratilidade celular, transiente de cálcio e corrente de cálcio significativamente reduzidos (Andersson *et al.*, 2011). No presente trabalho, mostramos que a hiperatividade crônica aumenta a produção basal de ROS em cardiomiócitos ventriculares. No mesmo modelo já havia sido demonstrado um aumento do estresse oxidativo em pequenas artérias, causando uma diminuição na biodisponibilidade do NO, o que contribui para um aumento no tônus vascular (Couto *et al.*, 2014).

No que concerne a contratilidade cardíaca, as ROS têm efeito depressor na contratilidade atuando diretamente em diversas proteínas dos miofilamentos e modulando a

função de diversas cinases envolvidas no controle dessas proteínas (Steinberg, 2013). Na insuficiência cardíaca em humanos, os filamentos de actina e tropomiosina tem maior nível de oxidação e nitrosilação (no caso da tropomiosina) e a oxidação desses filamentos se correlaciona diretamente com uma queda na viabilidade celular (aumento nos níveis de troponina I no plasma) e disfunção contrátil (redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo) (Canton *et al.*, 2011). Além disso, diversas proteínas envolvidas no transporte de cálcio nas células cardíacas, são direta ou indiretamente moduladas pelas ROS. O desbalanço no estado redox reduz a função da SERCA e aumenta o vazamento de cálcio do RS via RYR, o que contribui para uma redução na carga de cálcio do RS e assim uma redução no transiente de cálcio e, por conseguinte, a contratilidade celular (Zima *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2013). Entretanto as correntes de cálcio podem sofrer uma redução quando expostas a agentes oxidantes (provavelmente por oxidação direta dos resíduos de cisteína) ou um aumento pela oxidação das cinases tais como: a CaMKII, PKA e PKC (Wagner *et al.*, 2013). Já as correntes do NCX parecem sofrer um aumento quando expostos a um nível elevado de ROS ou xantina oxidase (Goldhaber, 1996).

Além do aumento da corrente do NCX, o aumento nos níveis de ROS pode auxiliar no prolongamento do potencial de ação observado na hiperatividade simpática por modular a densidade da Ito. Quando cardiomiócitos são expostos a 5 mM de glutatona oxidada na solução intracelular (dentro da pipeta de patch), a Ito é reduzida em 27% enquanto não há modificações nas correntes dos retificadores de entrada (Rozanski e Xu, 2002). Essa redução induzida pela glutatona oxidada foi revertida pelo tratamento com o agente redutor ditioneitol (Rozanski e Xu, 2002). Além disso, ROS pode causar uma modificação na dinâmica dos microtubulos nas células cardíacas, similar ao que ocorre em modelos de infarto do miocárdio (Drum *et al.*, 2016). Essa mudança na dinâmica dos microtubulos induzida por ROS reduz a densidade da Ito por uma diminuição na expressão dos Kv4.2 e Kv4.3 na membrana sarcoplasmática (Drum *et*

al., 2016).

7 CONCLUSÃO

A hiperatividade simpática crônica induzida pela deleção dos receptores adrenérgicos α_2A e α_2C reduz a contratilidade em cardiomiócitos ventriculares por uma redução na liberação de cálcio pelo RS, e a uma menor densidade da corrente de cálcio, porém sem alterações da sinalização β -adrenérgica. Essas mudanças são acompanhadas por um prolongamento do potencial de ação cardíaco causado pela redução da I_{to} e aumento da corrente do NCX, além de um aumento paralelo na produção de ROS. Esses resultados ajudam a compreender melhor o papel do aumento da atividade adrenérgica sobre canais iônicos e transportadores nas disfunções do sistema cardiovascular.

REFERENCIAS

- AFLAKI, M. et al. Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained beta-adrenergic activation in guinea pig hearts. **Circ Res**, v. 114, n. 6, p. 993-1003, Mar 14 2014. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.113.302982> >.
- AIBA, T.; TOMASELLI, G. F. Electrical remodeling in the failing heart. **Curr Opin Cardiol**, v. 25, n. 1, p. 29-36, Jan 2010. ISSN 1531-7080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907317> >.
- AIDLEY, D. J. **Ion channels: molecules in action**. 1. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- _____. **The Physiology of Excitable Cells**. 4th Edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998. ISBN 978-0521574211.
- ANDERSSON, D. C. et al. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 7, p. 1791-801, Apr 1 2011. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202838> >.
- ANUMONWO, J. M.; LOPATIN, A. N. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 1, p. 45-54, Jan 2010. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.013> >.
- ARAUJO, D. V. et al. [Cost of heart failure in the Unified Health System]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 422-7, May 2005. ISSN 0066-782X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917977> >.
- AROUNDAS, A. A. et al. Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. **Circ Res**, v. 93, n. 1, p. 46-53, Jul 11 2003. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000080932.98903.d8> >.
- BARTHOLOMEU, J. B. et al. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n. 2, p. 240-9, Aug 2008. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632114> >.
- BERNE, R. et al. **Fisiologia**. 5. São Paulo: Elsevier, 2004.
- BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, Jan 10 2002. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/415198a> >.
- _____. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 380-7, Dec 2006. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119150> >.
- _____. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 23-49, 2008. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455> >.

BEZANILLA, F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 4, p. 166-8, Apr 2005. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817390> >.

BEZANILLA, F.; PEROZO, E. The voltage sensor and the gate in ion channels. **Adv Protein Chem**, v. 63, p. 211-41, 2003. ISSN 0065-3233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629972> >.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. **Circ Res**, v. 116, n. 3, p. 531-49, Jan 30 2015. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.116.303584> >.

BRUM, P. C. et al. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 5, p. H1838-45, Nov 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384461> >.

CANTON, M. et al. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 57, n. 3, p. 300-9, Jan 18 2011. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2010.06.058> >.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 521-55, 2000. ISSN 1081-0706 (Print)1081-0706. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521> >.

CATTERALL, W. A.; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 397-409, Dec 2005. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382098> >.

CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 411-25, Dec 2005. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.4.5> >.

CHARKOUDIAN, N.; RABBITTS, J. A. Sympathetic neural mechanisms in human cardiovascular health and disease. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 9, p. 822-30, Sep 2009. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720780> >.

CHENG, H.; LEDERER, W. J. Calcium sparks. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1491-545, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00030.2007> >.

CORONEL, R. et al. Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2432-41, Dec 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23579069> >.

COUTO, G. K. et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors induces endothelial dysfunction in mouse small arteries: role of nitric oxide synthase uncoupling. **Exp Physiol**, v. 99, n. 10, p. 1427-38, Oct 2014. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2014.079236> >.

DIPLA, K. et al. The sarcoplasmic reticulum and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger both contribute to the Ca²⁺ transient of failing human ventricular

myocytes. **Circ Res**, v. 84, n. 4, p. 435-44, Mar 5 1999. ISSN 0009-7330 (Print)0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DONG, M. et al. Role of the transient outward current in regulating mechanical properties of canine ventricular myocytes. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 21, n. 6, p. 697-703, Jun 1 2010. ISSN 1045-3873. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1540-8167.2009.01708.x> >.

DRUM, B. M. et al. Oxidative stress decreases microtubule growth and stability in ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 93, p. 32-43, Apr 2016. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.02.012> >.

FLORAS, J. S. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 5, p. 375-85, Jul 2009. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628111> >.

GOLDHABER, J. I. Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. H823-33, Sep 1996. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOONASEKERA, S. A. et al. Decreased cardiac L-type Ca²⁺ channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 280-90, Jan 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133878> >.

GREENSTEIN, J. L. et al. Role of the calcium-independent transient outward current I_(to1) in shaping action potential morphology and duration. **Circ Res**, v. 87, n. 11, p. 1026-33, Nov 24 2000. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 473-508, Dec 2005. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.4.10> >.

HANFT, L. M.; KORTE, F. S.; MCDONALD, K. S. Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 4, p. 627-36, Mar 1 2008. ISSN 0008-6363 (Print)0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvm099> >.

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature**, v. 402, n. 6758, p. 181-4, Nov 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647009> >.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3rd. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2001. ISBN 0-87893-321-2.

HINKEN, A. C.; SOLARO, R. J. A dominant role of cardiac molecular motors in the intrinsic regulation of ventricular ejection and relaxation. **Physiology (Bethesda)**, v. 22, p. 73-80, Apr 2007. ISSN 1548-9213 (Print)1548-9221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00043.2006> >.

HOBAI, I. A.; O'ROURKE, B. Enhanced Ca²⁺-activated Na⁺-Ca²⁺ exchange activity in canine pacing-induced heart failure. **Circ Res**, v. 87, n. 8, p. 690-8, Oct 13 2000. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HORIUCHI-HIROSE, M. et al. Decrease in the density of t-tubular L-type Ca²⁺ channel currents in failing ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart**

Circ Physiol, v. 300, n. 3, p. H978-88, Mar 2011. ISSN 1522-1539.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193586> >.

HOUSER, S. R.; MARGULIES, K. B. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? **Circ Res**, v. 92, n. 4, p. 350-8, Mar 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12623873> >.

KLABUNDE, R. E. **Cardiovascular Physiology Concepts**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

KUBO, Y. et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 509-26, Dec 2005. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.4.11> >.

LESSA, Í. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 383-92, 2001.

LI, D. et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. **Circulation**, v. 101, n. 22, p. 2631-8, Jun 2000. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840016> >.

LOUCH, W. E. et al. Control of Ca²⁺ release by action potential configuration in normal and failing murine cardiomyocytes. **Biophys J**, v. 99, n. 5, p. 1377-86, Sep 2010. ISSN 1542-0086. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816049> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

LUO, M.; ANDERSON, M. E. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. **Circ Res**, v. 113, n. 6, p. 690-708, Aug 2013. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23989713> >.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circ Res**, v. 113, n. 6, p. 739-53, Aug 30 2013. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.113.300308> >.

MANN, D. L.; BRISTOW, M. R. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. **Circulation**, v. 111, n. 21, p. 2837-49, May 2005. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927992> >.

MISHRA, S. et al. Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 4, p. H1596-605, Oct 2011. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705762> >.

MYLES, R. C. et al. Decreased inward rectifying K⁺ current and increased ryanodine receptor sensitivity synergistically contribute to sustained focal arrhythmia in the intact rabbit heart. **J Physiol**, v. 593, n. 6, p. 1479-93, Mar 15 2015. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279638> >.

- NAGASAKA, S. et al. Protein kinase A catalytic subunit alters cardiac mitochondrial redox state and membrane potential via the formation of reactive oxygen species. **Circ J**, v. 71, n. 3, p. 429-36, Mar 2007. ISSN 1346-9843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322647> >.
- NERBONNE, J. M.; KASS, R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization. **Physiol Rev**, v. 85, n. 4, p. 1205-53, Oct 2005. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00002.2005> >.
- OLIVEIRA, R. S. et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 15, p. 3899-910, Aug 2009. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505981> >.
- PATEL, S. P.; CAMPBELL, D. L. Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. **J Physiol**, v. 569, n. Pt 1, p. 7-39, Nov 15 2005. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086223> >.
- PEREIRA, M. G. et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. **Eur J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 843-50, Apr 2009. ISSN 1439-6327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125280> >.
- PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G. J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 2, p. 265-73, Jan 15 2008. ISSN 0008-6363 (Print)0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvm056> >.
- PETKOVA-KIROVA, P. S. et al. Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor-alpha. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 5, p. H2098-107, May 2006. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339842> >.
- PITT, G. S.; DUN, W.; BOYDEN, P. A. Remodeled cardiac calcium channels. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41, n. 3, p. 373-88, Sep 2006. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901502> >.
- REMONDINO, A. et al. Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. **Circ Res**, v. 92, n. 2, p. 136-8, Feb 7 2003. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ROLIM, N. P. et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. **Physiol Genomics**, v. 29, n. 3, p. 246-52, May 2007. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244791> >.
- ROZANSKI, G. J.; XU, Z. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 34, n. 12, p. 1623-32, Dec 2002. ISSN 0022-2828 (Print)0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANCHES, P. C.; MOFFA, P. J. **Eletrocardiograma normal e patológico**. Sao Paulo: Editora Roca, 2011.

SCHRÖDER, F. et al. Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. **Circulation**, v. 98, n. 10, p. 969-76, Sep 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737516> >.

SCRIVEN, D. R.; ASGHARI, P.; MOORE, E. D. Microarchitecture of the dyad. **Cardiovasc Res**, v. 98, n. 2, p. 169-76, May 1 2013. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt025> >.

SCRIVEN, D. R.; MOORE, E. D. Ca(2)(+) channel and Na(+)/Ca(2)(+) exchange localization in cardiac myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 58, p. 22-31, May 2013. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.022> >.

SHIOYA, T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. **J Physiol Sci**, v. 57, n. 6, p. 327-35, Dec 2007. ISSN 1880-6546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980092> >.

STEINBERG, S. F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. **Circ Res**, v. 112, n. 2, p. 393-405, Jan 18 2013. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.111.300496> >.

STENGER, R. J.; SPIRO, D. THE ULTRASTRUCTURE OF MAMMALIAN CARDIAC MUSCLE. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 9, n. 2, p. 325-51, Feb 1 1961. ISSN 0095-9901 (Print)0095-9901. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUN, X.; WANG, H. S. Role of the transient outward current (Ito) in shaping canine ventricular action potential--a dynamic clamp study. **J Physiol**, v. 564, n. Pt 2, p. 411-9, Apr 15 2005. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2004.077263> >.

SUZUKI, M. et al. Altered inotropic response of endothelin-1 in cardiomyocytes from rats with isoproterenol-induced cardiomyopathy. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 3, p. 589-99, Sep 1998. ISSN 0008-6363 (Print)0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TRIPOSKIADIS, F. et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 19, p. 1747-62, Nov 3 2009. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.015> >.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 6, p. H2181-90, Dec 2011. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011> >.

UNDROVINAS, N. A. et al. Late sodium current contributes to diastolic cell Ca²⁺ accumulation in chronic heart failure. **J Physiol Sci**, v. 60, n. 4, p. 245-57, Jul 2010. ISSN 1880-6562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490740> >.

WAGNER, S. et al. Redox regulation of sodium and calcium handling. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 9, p. 1063-77, Mar 20 2013. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4818> >.

WANG, J. et al. Induced overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger transgene: altered myocyte contractility, [Ca²⁺]_i transients, SR Ca²⁺ contents, and action potential duration. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 2,

p. H590-601, Aug 2009. ISSN 0363-6135. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00190.2009> >.

WEI, S. et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. **Circ Res**, v. 107, n. 4, p. 520-31, Aug 2010. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576937> >.

XU, H.; GUO, W.; NERBONNE, J. M. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. **J Gen Physiol**, v. 113, n. 5, p. 661-78, May 1999. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228181> >.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biol**, v. 4, n. 3, p. 207, 2003. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620097> >.

ZHANG, L. M.; WANG, Z.; NATTEL, S. Effects of sustained beta-adrenergic stimulation on ionic currents of cultured adult guinea pig cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 3, p. H880-9, Mar 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834482> >.

ZHANG, Z. S. et al. Enhanced inhibition of L-type Ca²⁺ current by beta3-adrenergic stimulation in failing rat heart. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 315, n. 3, p. 1203-11, Dec 2005. ISSN 0022-3565 (Print)0022-3565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.105.089672> >.

ZIMA, A. V.; COPELLO, J. A.; BLATTER, L. A. Effects of cytosolic NADH/NAD(+) levels on sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release in permeabilized rat ventricular myocytes. **J Physiol**, v. 555, n. Pt 3, p. 727-41, Mar 16 2004. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055848> >.