



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

REJANE CARDOSO SOUZA

DOIS TIPOS DE MEMÓRIAS CONTRÁTEIS EM
MIOCÁRDIO DE MAMÍFERO

ARACAJU
2011

REJANE CARDOSO SOUZA

DOIS TIPOS DE MEMÓRIAS CONTRÁTEIS EM
MIOCÁRDIO DE MAMÍFERO

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia

ARACAJU
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S729d Souza, Rejane Cardoso
Dois tipos de memórias contráteis em miocárdio de mamífero / Rejane Cardoso Souza. – Aracaju, 2011.
00 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

Orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia.

1. Miocárdio - Contratilidade 2. Fisiologia do coração
3. Pesquisa experimental – Mamíferos I. Título.

CDU 612.172

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofísica do Coração (LBC) do Departamento de Fisiologia (DFS) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e contou com o suporte financeiro das Centrais Elétricas Brasileiras (ELETROBRAS/MME, Processo N° 23113.009351/03-67), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo N° 478581/2008-4) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe (FAPITEC, Aracaju/SE, Brasil, Edital Universal 07/2008).

Para

Maria Leda e Felix Souza,
e
Eduardo Antonio Conde Garcia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por me ter proporcionado força, motivação e equilíbrio para concluir esta importante etapa da minha vida;

Aos meus pais Felix Mariano Souza e Maria Leda Cardoso Souza, pelo amor incondicional, incentivo e cumplicidade. Obrigado por acreditarem e apoiarem os meus sonhos. Vocês representam um porto seguro;

Ao meu orientador Professor Doutor Eduardo Antonio Conde Garcia, por me ter recebido no seu laboratório, propondo-me a interessante linha de pesquisa desta dissertação e por ter compreendido minhas limitações, ajudando-me a superá-las. Agradeço também por me ter ensinado, através do exemplo e das atitudes sempre presentes, a verdadeira importância do professor para a formação profissional, cultural e emocional das pessoas;

Aos meus avós José Santo Souza, Mariana Gama Souza (*in memoriam*) aos tios Ivo Mariano, Verônica Reis Mariano Souza, Hermínia Dalva Souza, Ana Maria Mariano Souza, aos primos Ilmara Cristina Souza dos Santos, Marcio Henrique Souza e a minha afilhada Raquel Mariano, pelas orações e incentivo durante essa longa jornada de trabalho e estudos;

Aos meus irmãos Albert Cardoso Souza, pelo incentivo, Alex Cardoso Souza, pela sua amizade e Felix Mariano Souza Júnior, pelo exemplo de superação. Agradeço por ajudarem a constituir uma família com bases fortes e cheia de amor;

Ao Carlyle Rolemberg Andrade pelo companheirismo, carinho e incentivo aos meus sonhos. Agradeço por você ter despertado em mim um sentimento nobre, o Amor.

À amiga Daniela Gomes, por estar sempre presente, valorizando as minhas qualidades e alertando-me sobre os meus defeitos. Sei que você é uma irmã que me foi enviada por Deus;

À amiga Renata Barracho por estar sempre presente em minha vida com carinho e palavras de amizade;

À Sra Raimunda Rolemberg Andrade, Clóvis Santos Andrade, Clívia Rolemberg Andrade, Clifson Rolemberg Andrade, Cialely Rolemberg Andrade por manifestarem imenso carinho e palavras de conforto que tiveram grande importância nos momentos de angústia e ansiedade. Obrigada pelas orações;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biofísica do Coração do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe: Raquel Moreira de Britto (Farmacêutica e mestranda), pelo companheirismo nessa batalha; Adriana Karla de Lima (Farmacêutica, doutoranda), pelo incentivo, ajuda e pelos momentos de alegria; a Willian de Bulhões Brandão (Farmacêutico, mestrando), pela disposição para ajudar, sempre manifestada; a Antônio Nei de Santana Gondim (Farmacêutico e MSc), pelo apoio no início dessa jornada; Amilton Gustavo da Silva Passos, Sandra Valéria Santos de Cerqueira (Bióloga e mestranda), Silvia Caroline dos Santos Mendonça (Fisioterapeuta e MSc), Diego Oliveira Teixeira (Medicina, PIBIC), Ana Régia de Pontes Ferreira (Medicina, PIBIC), Lilian da Cruz Lino Salvador (Medicina, PIBIC), Larissa Habib Mendonça Gois (Medicina, PIBIC), Robson Alves dos Anjos Neto (Medicina, PIBIC), Margleice Marinho Vieira Rocha (Medicina, PIBIC), Marcos Antônio Lisboa Amorim (Medicina, PIBIC), Diego Leonardo Cruz L. Garcia (Medicina, PIBIC) e Diego Benone Santos (Medicina, PIBIC), a Diogo Lucas Campos Martins (Medicina, PIBIC), pelo incentivo para a conclusão desse trabalho, assim como a todos os que contribuíram com palavras ou manifestações de incentivo;

À Carla Maria Lins de Vasconcelos Araújo (Carlinha) (Biomédica, MSc, DSc e Professora Adjunta da UFS) pelo exemplo profissional, amizade e contribuição científica; a Evaleide Diniz de Oliveira (Fisioterapeuta, MSc, DSc e Professora Adjunta da UFS), pelo exemplo de perseverança e a Sandra Lauton Santos (DSc e Professora Adjunta UFS) pelo carinho;

À Marcli Costa da Silveira Libório, competente secretária do Departamento de Fisiologia/CCBS/UFS, pelo suporte administrativo;

À Maria Jane dos Santos e a Augustinho Cesário dos Santos, funcionários do Departamento de Fisiologia/CCBS/UFS, pelo suporte para o funcionamento do Laboratório de Biofísica do Coração;

À Professora Doutora Glória Isolina Boente Pinto Duarte e ao Professor Doutor Saad Lahlou, pelos ensinamentos e pela ajuda para o meu crescimento profissional;

Ao Professor Doutor Carlos Peres da Costa, pela preocupação com meu aprendizado, encorajamento nos momentos de dificuldade e por ter ajudado na escolha do meu orientador;

Aos professores que lecionaram as disciplinas do curso de pós-graduação do Programa de Mestrado do Departamento de Fisiologia da UFPE, assim como os professores do Programa de Mestrado do Departamento de Ciência da Saúde da UFS;

Aos meus colegas de turma do curso de Mestrado em Ciências Biológicas, do curso de Mestrado em Fisiologia da UFPE e aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFPE;

Ao amigo Joaldo Vicente do Nascimento, pela disposição em ajudar na conclusão deste trabalho e ao Rodrigo Bezerra Siqueira, pelas palavras de força e confiança na minha capacidade acadêmica;

À amiga Bernadete Pinheiro e a sua maravilhosa família, por me terem acolhido em Recife de forma carinhosa e fraternal;

Aos funcionários da secretaria de apoio/UFS e a todos os colegas do mestrado em Ciência da Saúde da UFS, assim como aos funcionários da secretaria de apoio/UFPE e aos colegas do mestrado em Fisiologia da UFPE que tanto contribuíram para o meu crescimento pessoal;

Aos meus colegas, Luciana Zago, Juliana Dantas, Andréia Maria Batista Barros, Karla Santos Mendonça, Ricardo Costa Dantas, Bianca Mello, Ildomário Santos Gomes, Josygrécia Silva, Fábio Coelho e Luciana Silva, que contribuíram para o sucesso desse sonho. Cada um, em momentos distintos, teve uma importante participação para a conclusão deste trabalho;

À Manuela Oliveira dos Santos, Coordenadora do setor de Fisioterapia do Hospital João Alves Filho atualmente Hospital de Urgência de Sergipe (HUSE), por ter adaptado os meus horários de trabalho, permitindo a minha dedicação a esta dissertação de mestrado;

À Universidade Federal de Sergipe, que, por meio do Laboratório de Biofísica do Coração, permitiu que este trabalho fosse realizado;

Às Centrais Elétricas Brasileiras (ELETROBRÁS), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe (FAP-SE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro que permitiu a realização dos experimentos necessários para esta dissertação.

RESUMO

A capacidade de o miocárdio memorizar foi estudada inicialmente por Rosenbaum (1982), que, entre outros, relataram uma memória elétrica no coração. Todavia, Rios e cols. (1975) e Moreira (1977) foram os primeiros a descrever a existência de memória contrátil no miocárdio de anfíbio. Eles propuseram um modelo matemático para representar esse fenômeno. A nossa proposta, contudo, visou caracterizar dois tipos de memórias contráteis. Uma delas inibe o inotropismo (memória depressora, MD) e a outra, o estimula (memória excitadora, ME). A hipótese central deste trabalho propõe que, quando o coração é desafiado por um novo ambiente (nutrientes, químicos, pH etc.), ele redefine sua atividade contrátil para que possa alcançar um novo estado de equilíbrio. Para expressar tal comportamento, o miocárdio cria memórias, visando ajustar a amplitude das forças geradas. Isto se dá por meio do balanço entre a carga de MD e de ME de cada batimento. Neste trabalho, a expressão e a acumulação destas memórias foram estudadas em átrio de cobaia, utilizando-se dois descritores para cada uma delas – um estático, o IKMDmax e IKMEmax, que representam o incremento máximo de carga de MD e ME, respectivamente, e outro dinâmico – VmedAMD e VmedAME - que está associado à velocidade de apagamento de cada memórias. As preparações foram ensaiadas com diferentes protocolos experimentais como os descritos por Seed & Walker (1988), Shimizu, et al. (2000) e Conde-Garcia (não publicado). Os resultados mostraram que a memória contrátil difere do fenômeno relativo à memória elétrica do miocárdio, porque, elevando-se o potássio externo de 2,7 para 7,0 mM, não houve variação significativa dos descritores, pois, para $n = 3$, o IKMDmax passou de $82,09 \pm 1,58$ para $81,56 \pm 2,01\%$ ($p > 0,05$), o IKMEmax passou de $83,36 \pm 0,56$ para $90,12 \pm 17,92\%$ ($p > 0,05$), a VmedAMD variou de $-1,36 \pm 0,67$ para $-1,13 \pm 0,42\text{gf/s}$ ($p > 0,05$) e a VmedME foi alterada de $-2,09 \pm 1,65$ para $-1,56 \pm 1,41\text{gf/s}$ ($p > 0,05$). A expressão e a acumulação das memórias são fenômenos que

dependem do transiente intracelular de cálcio nas células miocárdicas. A elevação do cálcio extracelular de 1,37 para 5,47mM, para n = 3, alterou o IKMDmax: de $87,56 \pm 2,33$ para $63,83 \pm 3,78\%$ ($p < 0,05$); IKMEmax: $84,36 \pm 0,54$ para $13,91 \pm 0,11\%$ ($p < 0,05$); VmedAMD: $-2,58 \pm 0,71$ para $-1,20 \pm 0,37$ gf/s ($p < 0,05$) e VmedME: $-0,90 \pm 0,13$ para $-0,34 \pm 0,05$ gf/s ($p < 0,05$). A adição de 5mM de cafeína à solução controle do banho fez o IKMDmax variar de $79,88 \pm 3,48$ para $56,68 \pm 6,62\%$ ($p < 0,05$); o IKMEmax de $77,14 \pm 1,02$ para $28,54 \pm 2,11\%$ ($p < 0,05$); a VmedAMD de $-1,78 \pm 0,50$ para $-0,60 \pm 0,10$ gf/s ($p < 0,05$) e a VmedME $-1,74 \pm 0,64$ para $-0,33 \pm 0,14$ gf/s ($p < 0,05$). Nas condições experimentais deste estudo, uma dada contração recebe informações depressoras e excitadoras que foram geradas pelos últimos dez batimentos.

Palavras-chave: miocárdio; contratilidade; memória depressora; memória excitadora; cobaia.

ABSTRACT

In the heart, the existence of an electrical memory was firstly reported by Rosenbaum et al. (1982), but Rios et al. (1975) and Garcia Moreira (1977) were those that firstly described the existence of contractile memories in the amphibian myocardium. These authors developed a mathematical model for representing such phenomenon. In the present study, we aimed to characterize two kinds of contractile memories occurring in the mammalian myocardium. One of them, depresses the tissue (the depressant memory, DM) and the other one acts by stimulating it (the excitatory memory, EM). The pivotal rationale guiding this work was: when the heart is challenged by changing the environment sources like nutrients, chemicals, temperature, etc., its behavior changes in order to optimize the energy expenditure associated with its contractility. This adaptation process allows to be reached a new state of dynamic equilibrium. In order to express such behavior, the tissue creates contractile memories for adjusting the amplitude of myocardial forces. This is provided by balancing the load of DM and EM available at each myocardial beat. The expression and accumulation of these memories were studied in the guinea pig atria submitted to the experimental protocols described previously by Seed & Walker (1988), Shimizu (2000), and Conde-Garcia (not published). The expression and accumulation of myocardial memories were described by employing two static descriptors, LODMmax and LOEMmax. They stand for the maximum load of depressant memory and the

maximum load of excitatory memory, respectively. Furthermore, another pair of dynamic descriptors was also used to measure the maximum rate of erasing of the depressant memory (MREDM) and the other one to measure the maximum rate of erasing of the excitatory memory (MREEM). The static descriptors represent the transference of load of both memories but the dynamic descriptors were related to the rate of erasing of such memories. Our results brought us onto the following conclusions: 1. contractile memories are a phenomenon apart from the electrical memory because rising the external potassium from 2.7 to 7.0 mM did not modify ($n = 4$) LODMmax that changed from $82,09 \pm 1,58$ to $81,56 \pm 2,01\%$ ($p > 0,05$), LOEMmax from $83,36 \pm 0,56$ to $90,12 \pm 17,92\%$ ($p > 0,05$), MREDM changed from $-1,36 \pm 0,67$ to $-1,13 \pm 0,42\text{gf/s}$ ($p > 0,05$), and MREED from $-2,09 \pm 1,65$ to $-1,56 \pm 1,41\text{gf/s}$ ($p > 0,05$). 2. However, the expression and accumulation of DM and EM are affected by the intracellular calcium transient. The increase of extracellular calcium from 1,37 to 5,47mM ($n = 3$) reduced LODMmax: from $87,56 \pm 2,33$ to $63,83 \pm 3,78\%$ ($p < 0,05$); LOEMmax from $84,36 \pm 0,54$ to $13,91 \pm 0,11\%$ ($p < 0,05$); MREDM from $-2,58 \pm 0,71$ to $-1,20 \pm 0,37\text{gf/s}$ ($p < 0,05$) and MREEM from $-0,90 \pm 0,13$ to $-0,34 \pm 0,05\text{gf/s}$ ($p < 0,05$). Adding 5mM caffeine to the bath solution also reduced LODMmax from $79,88 \pm 3,48$ to $56,68 \pm 6,62\%$ ($p < 0,05$); LOEMmax from $77,14 \pm 1,02$ to $28,54 \pm 2,11\%$ ($p < 0,05$); MREDM from $-1,78 \pm 0,50$ to $-0,60 \pm 0,10\text{gf/s}$ ($p < 0,05$), and MREED from $-1,74 \pm 0,64$ to $-0,33 \pm 0,14\text{gf/s}$ ($p < 0,05$); 3. In the experimental condition employed in this work, a given beat receives both depressant and excitatory information built by the last ten beats.

Keywords: Myocardium, contractility, depressant memory, excitatory memory, guinea pig

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Traçados eletrocardiográficos e vetocardiográficos obtidos em coração de cão.....	31
Figura 2 - Micrografia eletrônica dos discos intercalares.....	34
Figura 3 - Micrografia eletrônica mostrando, em corte longitudinal, um sarcômero.....	35
Figura 4 - Relação comprimento-tensão de um sarcômero.....	39
Figura 5 - Esquema dos mecanismos envolvidos no processo de excitação-contração do cardiomiócito.....	42
Figura 6 - Comparação entre os mecanismos de acoplamento excitação-contração em células ventriculares e atriais.....	43
Figura 7 - Esquema geral da montagem do átrio esquerdo de cobaia.	49
Figura 8 - Registros gravados em computador e obtidos durante a estimulação-controle.....	50
Figura 9 - Equipamentos geradores de pulsos usados na montagem experimental.....	51
Figura 10 - Esquema dos equipamentos eletrônicos usados para criar a lógica de pulsos.....	52
Figura 11 - Exemplo representativo do traçado experimental da força de contração atrial.....	53
Figura 12 - Sequência de contrações usada para o estudo das memórias.....	54
Figura 43 - Esquema do gerador de alarme sonoro.....	56
Figura 14 - Sistema de conversão analógico-digital.....	56
Figura 15 - Estratégia experimental usada para estudar a expressão e a acumulação das memórias.....	62
Figura 16 – Experimento representativo sobre a adaptação do átrio	

esquerdo às condições experimentais.....	65
Figura 17 - Esquema do experimental usado para determinar a Curva de Restituição Mecânica do miocárdio.....	68
Figura 18 - Curva de Restituição Mecânica média do átrio esquerdo de cobaia.....	70
Figura 19 - Variação do IKMD em função do tempo.....	71
Figura 20 - Esquema do protocolo experimental usado para avaliar as variações de amplitude da 1aCPEx.....	72
Figura 21 - Variação do IKME em função de diferentes IAEx.....	74
Figura 22 - Influência do número de CCond (I –II) sobre a acumulação da MD e ME.....	75
Figura 23 - Influência do número de CCond (III-IV) sobre a acumulação da MD e ME.....	76
Figura 24 - Influência do número de CCond (V-VI) sobre a acumulação da MD e ME.....	77
Figura 25 - Influência do número de CCond (VII-VIII) sobre a acumulação da MD e ME.....	78
Figura 26 - Influência do número de CCond (IX-X) sobre a acumulação da MD e ME.....	79
Figura 27 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEx e do número de CCond.....	86
Figura 28 - Incremento de carga de ME em função do IAEx e do número de CCond.....	87
Figura 29 – Traçados referentes à resposta inotrópica do átrio em diferentes concentrações de potássio extracelular.....	89
Figura 30 - Variação do IKMD e VmedAMD em função do IAEx e da concentração extracelular de potássio.....	91
Figura 31 - Variação do IKME e VmedAME em função do IAEx e da concentração extracelular de potássio.....	92
Figura 32 - Efeito da expressão e da VmedAMD em função do IAEx, do número de CCond e da concentração extracelular de potássio.....	93
Figura 33 - Efeito da expressão e da VmedAME em função do IAEx, do número de CCond e da concentração extracelular de potássio.....	94

Figura 34 – Avaliação do bloqueio muscarínico sobre a amplitude das extrassístoles e da 1a.CPEx.....	95
Figura 35 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEx e do bloqueio muscarínico.....	97
Figura 36 - Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEx e do bloqueio muscarínico.....	98
Figura 37 - Efeito do IAEx, do número de CCond e do bloqueio muscarínico sobre o IKMD e a VmedAMD.....	99
Figura 38 - Efeito do bloqueio muscarínico sobre o IKME e a VmedAME em função do IAEx, do número de CCond.....	100
Figura 39 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx antes e após o bloqueio de correntes de potássio.....	101
Figura 40 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEX e do bloqueio de correntes de potássio.....	103
Figura 41 - Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEx e do bloqueio de correntes de potássio.....	104
Figura 42 - Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre o IKMD e da VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond.....	105
Figura 43 - Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre o IKME e a VmedAME, em função do IAEx, do número de CCond.....	106
Figura 44 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx, em função do IAEx e da concentração extracelular de cálcio (1,37 e 2,05 mM).....	108
Figura 45 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx, em função do IAEx e da concentração extracelular de cálcio (5,47 e 9,59 mM).....	109
Figura 46 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEx e da concentração extracelular de cálcio.....	111
Figura 47 - Variação do IKME a da VmedAME em função do IAEx e da concentração extracelular de cálcio.....	112
Figura 48 - Efeito da concentração extracelular de cálcio sobre o IKMD e a VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond.....	113

Figura 49 - Efeito da concentração extracelular de cálcio sobre o IKME e a VmedAME, em função do IAEx e do número de CCond.....	114
Figura 50 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx, em função do IAEx e da adição da cafeína (1mM).....	116
Figura 51 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx, em função do IAEx e da adição da cafeína (5 ou 10 mM).....	117
Figura 52 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEx e da adição de cafeína.....	119
Figura 53 - Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEx e da adição de cafeína.....	120
Figura 54 - Efeito da concentração de cafeína sobre o IKMD e a VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond.....	121
Figura 55 - Efeito da concentração de cafeína sobre o IKME e a VmedAME, em função do IAEx e do número de CCond.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solução de Tyrode segundo Dorigo et al. (1990).....	47
Tabela 2 – Evolução temporal da amplitude da força sistólica durante a fase de adaptação às condições experimentais.....	66
Tabela 3 – Evolução temporal do relaxamento diastólico durante a fase de adaptação do miocárdio às condições experimentais.....	67
Tabela 4 – Tabulação dos dados referentes à evolução da amplitude das extrassístoles produzidas com diferentes IAEx.....	69
Tabela 5 – Tabulação dos dados referentes à evolução da amplitude da 1a.CPEx produzida com diferentes IAEx.....	73
Tabela 6 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com uma CCond.....	80
Tabela 7 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com duas CCond.....	80
Tabela 8 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com três CCond.....	81
Tabela 9 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com quatro CCond...	81
Tabela 10 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com cinco CCond.....	82
Tabela 11 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com seis CCond.....	82
Tabela 12 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com sete CCond.....	83
Tabela 13 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com oito CCond.....	83
Tabela 14 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com nove CCond.....	84
Tabela 15 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das	

extrassístoles induzidas com diferentes IAEx e com dez CCond.....	84
Tabela 16 - Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles obtidas com diferentes IAEx na presença de concentrações variadas de potássio extracelular.....	90
Tabela 17 – Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEx obtidas com diferentes IAEx na presença de concentrações variadas de potássio extracelular.....	90
Tabela 18 – Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles obtidas com diferentes IAEx, na ausência e na presença do bloqueio dos receptores muscarínicos.....	96
Tabela 19 – Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEx, obtidas com diferentes IAEx, na ausência e na presença do bloqueio dos receptores muscarínicos.....	96
Tabela 20 - Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles, obtidas com diferentes IAEx, antes e após o bloqueio de correntes de potássio.....	102
Tabela 21 - Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEx, obtidas com diferentes IAEx, antes e após o bloqueio de correntes de potássio.....	102
Tabela 22 - Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles obtidos com diferentes IAEx e com concentrações diversas de cloreto de cálcio extracelular (1,37; 2,05; 5,47 e 9,59 mM).....	110
Tabela 23 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da 1a.CPEx obtidas com diferentes IAEx e com concentrações diversas de cloreto de cálcio extracelular (1,37; 2,05; 5,47 e 9,59 mM).....	110
Tabela 24 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da extrassístole obtida com diferentes IAEx na ausência e na presença da cafeína (1; 5; 10 mM).....	118
Tabela 25 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da 1a.CPEx obtida com diferentes IAEx na ausência e na presença da cafeína (1; 5; 10 mM).....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentração intra-celular de cálcio livre
Ca _L ,	Canal tipo L “large depolarization”
Ca _T ,	Canal tipo T “threshold”
AC	Acumulação de memória
ADP	Difosfato de adenosina
AEC	Acoplamento excitação contração
AE	Átrio esquerdo
ATP	Trifosfato de adenosina
ATROP	Sulfato de atropina
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio livre no citosol
CCond	Contrações condicionantes
CEPA	Comitê de ética em pesquisa com animais
CG	Protocolo de Conde Garcia
CICR	Liberação do cálcio induzida pelo cálcio
CRM	Curva de restituição mecânica
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
cTn	Troponina cardíaca
cTnC	Troponina C cardíaca
cTnI	Troponina I cardíaca
cTnT	Troponina T cardíaca
CTR	Controle
1aCPEx	Primeira contração pós-extrassistólica
DG1 e DG2	Digitimer D4030, Digitmer Limited, England
DG3	Digitimer 3072 Digitmer Limited, England
DHPD	Diidropiridinas
DPA	Duração do potencial de ação
ECG	Eletrocardiograma

Ex	Extrassístole
FA	Fascia adherens
IAEx	Intervalo de acoplamento extrassistólico
IKMD	Incremento de carga de memória depressora
IKME	Incremento de carga de memória excitadora
IKMDmax	Incremento máximo de carga de memória depressora
IKMEmax	Incremento máximo de carga de memória excitadora
KMD	Carga de memória depressora
MA	Macula adherens
MD	Memória depressora
ME	Memória excitadora
MML	Meromiosina leve
MMP	Meromiosina pesada
N	Nexus
NCX	Trocador sarcolemal para sódio e cálcio
PLB	Fosfolambano
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor da rianodina
SERCA	Sarcoendoplasmic reticulum calcium-ATPase (Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático)
S&W/SMZ	Protocolo de Seed-Walker-Shimizu
TEA	Tetraetilamônio
VmedAMD	Velocidade média de apagamento da carga de memória depressor
VmedAME	Velocidade média de apagamento da carga de memória excitadora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1 Organização estrutural do músculo cardíaco	33
2.2 Acoplamento excitação-contração	40
2.3 As funções mecânica e elétrica do coração	44
3 OBJETIVOS	46
3.1- Geral	46
3.2- Específicos	46
4 MATERIAIS E METÓDOS.....	47
4.1 Animais	47
4.2 Solução nutritiva	47
4.3 Montagem do experimento	48
4.3.1 Montagem do átrio esquerdo em cuba para órgão isolado	48
4.3.2 Arranjo lógico dos equipamentos visando à adequada estimulação do miocárdio para a execução dos protocolos de investigação	50
4.3.2.1 Lógica dos pulsos para estimular ritmicamente o átrio de cobaia.....	50
4.3.2.1.1 Exemplo esquemático	50
4.3.2.1.2 Objetivo	50
4.3.2.1.3 Procedimento.....	50
4.3.2.2 Lógica de pulsos necessários para produzir a seqüência de eventos do protocolo experimental proposto por Seed & Walker (1988) conjuminado com a adição da pausa pós-extrassistólica proposta por Shimizu (2000)	52
4.3.2.2.1 Exemplo esquemático	53
4.3.2.2.2 Objetivo:.....	53

4.3.2.2.3 Característica do protocolo experimental.....	53
4.3.2.2.4 Procedimento.....	53
4.3.2.3 Lógica usada na geração de pulsos para produzir a seqüência de eventos necessários à execução do protocolo experimental proposto por Conde Garcia.....	54
4.3.2.3.1 Exemplo esquemático.....	54
4.3.2.3.2 Objetivo:.....	55
4.3.2.3.3 Caracterização do protocolo experimental de Conde Garcia	55
4.3.2.3.4 Procedimento.....	55
4.3.2.4 Gravação dos sinais de força atrial e dos respectivos pulsos de estimulação.....	56
4.4 Avaliação da expressão das memórias contráteis.....	57
4.4.1 Memória depressora e seus descritores.....	57
4.4.2 Memória excitadora e seus descritores.....	58
4.5 Avaliação do processo de acumulação das memórias contráteis..	58
4.6 Protocolos para avaliar o mecanismo formador de MD e ME.....	59
4.7 Estratégia experimental para avaliar a ação de substâncias sobre a expressão e a acumulação de memórias no miocárdio atrial de cobaia	61
4.8 Processamento e análise dos dados experimentais.....	62
4.8.1 Softwares utilizados.....	62
4.8.2 Análise Estatística.....	63
5. RESULTADOS	64
5.1 O miocárdio atrial aprende a trabalhar, trabalhando.....	64
5.1.1 O miocárdio atrial aprende: exemplo de resultado experimental	64
5.1.2 Tabulação dos resultados do experimento típico relativo à adaptação do miocárdio atrial esquerdo às condições experimentais	66
5.2 Ferramentas para avaliar as memórias contráteis.....	67
5.2.1 Ferramenta para avaliação da Memória Depressora: Protocolo de Seed e Walker.....	67
5.2.1.1 Exemplificação de um resultado experimental típico.....	67
5.2.1.2 Tabulação dos resultados referentes ao traçado experimental típico mostrando na Fig. 17.....	69

5.2.1.3 Determinação da Curva de Restituição Mecânica média do átrio.....	69
5.2.1.4 Avaliação da variação temporal do Incremento de Carga de Memória Depressora, visando estudar a sua expressão e a velocidade do seu apagamento.....	70
5.2.2 Ferramenta para avaliar a expressão da memória excitadora: Protocolo de Seed e Walker / Shimizu.....	71
5.2.2.1 Exemplificação de um resultado experimental típico.....	71
5.2.2.2 Tabulação dos resultados referentes ao traçado experimental típico mostrado na Fig. 20.....	73
5.2.2.3 Avaliação da variação temporal do Incremento de Carga de Memória Excitadora, visando estudar a sua expressão e a velocidade do seu apagamento.....	74
5.2.3 Avaliação da contribuição de contrações condicionantes para o processo de acumulação das memórias depressora e excitadora: Protocolo experimental usado: Conde Garcia.....	74
5.2.3.1 Exemplificação de um resultado experimental típico.....	74
5.2.3.2 Tabulação dos dados referentes aos traçados experimentais mostrados como exemplo da variação de amplitude da resposta extrassistólica em função do intervalo de acoplamento extrassistólico e do número de contrações condicionantes: procedimento para avaliar a acumulação da memória depressora.....	80
5.2.3.3 Efeito das contrações condicionantes sobre o processo de acumulação das memórias depressora e excitadora.....	85
5.2.3.4 Contrações condicionantes versus acumulação de memória depressora.....	85
5.2.3.5 Contrações condicionantes versus acumulação de memória excitadora.....	86
5.3 Protocolo para avaliar o mecanismo de ação relativo às memórias.....	88
5.3.1 Avaliação do efeito do potássio extracelular na expressão e acumulação das memórias contráteis.....	88
5.3.1.1 Exemplificação de um resultado experimental típico.....	88

5.3.1.2	Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig. 29.....	90
5.3.1.3	Tabulação dos dados referentes às 1as. CPEX vistas na Fig. 29	90
5.3.1.4	Efeito da concentração extracelular de potássio sobre a expressão e o apagamento das memória depressora.....	91
5.3.1.5	Efeito da variação da concentração extracelular de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora.....	92
5.3.1.6	Efeito da concentração extracelular de potássio sobre o processo de acumulação das memórias.....	93
5.3.1.6.1	Concentração de potássio versus memória depressora.....	93
5.3.1.6.2	Concentração de potássio versus memória excitadora.....	94
5.3.2	Avaliação do efeito produzido pelo bloqueio dos receptores muscarínicos sobre a expressão e o apagamento das memórias contráteis	95
5.3.2.1	Exemplificação de um resultado experimental típico.....	95
5.3.2.2	Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig. 34	96
5.3.2.3	Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEX vistas na Fig. 34	96
5.3.2.4	Efeito do bloqueio muscarínico sobre a expressão e o apagamento da memória depressora.....	97
5.3.2.5	Efeito do bloqueio de receptores muscarínicos sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora.....	98
5.3.2.6	Avaliação do bloqueio dos receptores muscarínicos sobre o processo de acumulação das memórias.....	99
5.3.2.6.1	Bloqueio dos receptores muscarínicos versus a acumulação de memória depressora.....	99
5.3.2.6.2	Bloqueio dos receptores muscarínicos versus a acumulação de memória excitadora.....	100
5.3.3	Avaliação do efeito produzido pelo bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e a acumulação das memórias contráteis.....	101

5.3.3.1 Exemplificação de um resultado experimental típico	101
5.3.3.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig. 39	102
5.3.3.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEx (Fig. 39)	102
5.3.3.4 Efeito do bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória depressora	103
5.3.3.5 Efeito do bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora.....	104
5.3.3.6 Avaliação do bloqueio de canais de potássio sobre o processo de acumulação das memórias.....	105
5.3.3.6.1 Bloqueio de canais de potássio versus acumulação da memória depressora.....	105
5.3.3.6.2 Bloqueio de canais de potássio versus acumulação da memória excitadora.....	106
5.3.4 Avaliação do efeito produzido pelo cálcio extracelular sobre a expressão e acumulação das memórias contráteis.....	107
5.3.4.1 Exemplificação de um resultado experimental típico.....	107
5.3.4.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas nas Fig. 44 e 45.....	110
5.3.4.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEx vistas na Fig. 44 e 45	110
5.3.4.4 Efeito do cálcio extracelular sobre a expressão e o apagamento da memória depressora.....	111
5.3.4.5 Efeito do cálcio extracelular sobre a expressão e a apagamento da memória excitadora.....	112
5.3.4.6 Avaliação do efeito produzido pelo cálcio extracelular sobre o processo de acumulação das memórias.....	113
5.3.4.6.1 Concentração do cálcio extracelular versus acumulação da memória depressora.....	113
5.3.4.6.2 Concentração do cálcio extracelular versus acumulação da memória excitadora.....	114
5.3.5 Avaliação do efeito produzido pela cafeína sobre a expressão e a acumulação das memórias contráteis.....	115

5.3.5.1 Exemplificação de um resultado experimental típico	115
5.3.5.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas nas Fig. 50 e 51.....	118
5.3.5.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEX (Figs. 50, 51)...	118
5.3.5.4 Efeito da cafeína sobre a expressão e o apagamento da memória depressora.....	119
5.3.5.5 Efeito da cafeína sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora.....	120
5.3.5.6 Avaliação do efeito produzido pela cafeína sobre o processo de acumulação das memórias.....	121
5.3.5.6.1 Cafeína versus acumulação da memória depressora.....	121
5.3.5.6.2 Cafeína versus acumulação da memória excitadora.....	122
6 DISCUSSÃO	123
7 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	136
ANEXO A	146
ANEXO B	147

1 INTRODUÇÃO

Houaiss (2001) define memória como a “faculdade de conservar e lembrar estados de consciência do passado e tudo quanto se ache associado aos mesmos”. Todavia, nesta dissertação, este conceito será usado de modo mais abrangente. Aqui, o termo será entendido como a capacidade que têm os sistemas animados ou inanimados de reter informação do presente para poder usá-la em eventos do futuro. Desta forma, o processo de memorização deixa de ser um privilégio do sistema nervoso central, podendo ser largamente encontrado em outros sistemas orgânicos. Além de a memória poder ser encontrada distribuída em várias partes do tecido nervoso central, ela também pode ser encontrada, p.ex., no sistema imunológico (WANG et al., 2004; SEAMAN et al., 2004; VITETTA et al., 1991) e no trato gastro-intestinal. Em 2000, Furness et al. sugeriram que a hiperalgesia e a hiperreflexia intestinal que são observadas em pacientes com síndrome do colo irritável, estavam associadas a uma memória celular, cuja gênese envolvia uma excitação pós-sináptica lenta e sustentada.

Rosenbaum et al., em 1982, usou a expressão “memória cardíaca” para definir as alterações genéticas ou moleculares que ocorrem na repolarização ventricular, caracterizando mais apropriadamente os eventos que haviam sido descritos por Chatterjee et al. (1969 a, b).

A Fig. 1 mostra os resultados obtidos por Yu et al. (1999) que, estudando o ECG e vetorcardiograma em cães submetidos à estimulação artificial, observaram que surgia no ECG uma onda T invertida e de conformação aberrante. A alça vetorial correspondente a essa onda mudou de posição espacial, deslocando-se do quarto para o segundo quadrante quando a estimulação foi mantida por cerca de 20 dias. Mesmo interrompendo-se os estímulos externos por três dias, a alça vetorial da onda T manteve-se no quarto quadrante, expressando assim que o coração havia memorizado o fato de ter sido submetido à estimulação artificial.

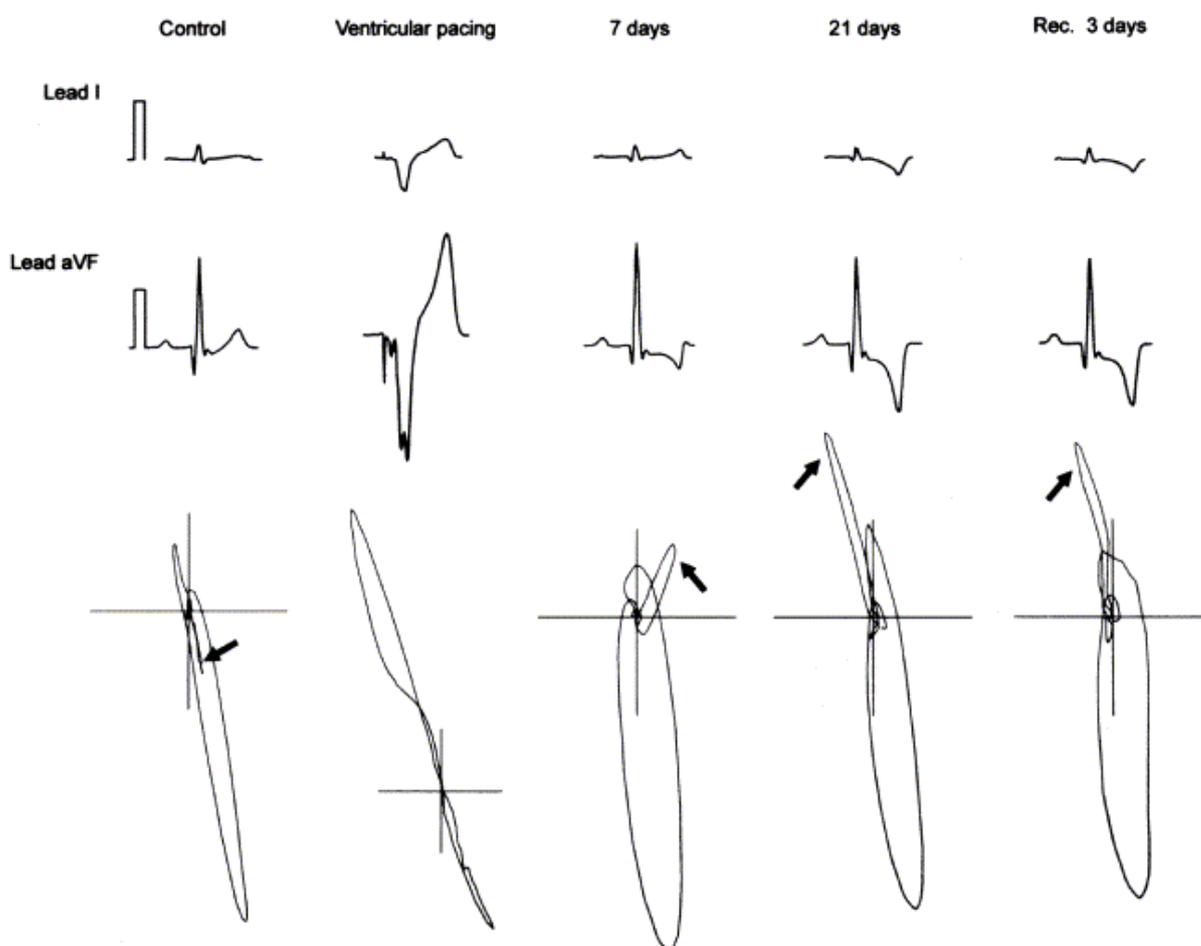


Figura 5 - Traçados eletrocardiográficos e vetocardiográficos obtidos em coração de cão. Os registros foram feitos em animais anestesiados e representam as formas de onda nas derivações D1 (Lead I) e aVF. O vetocardiograma (registros inferiores) foi obtido em situação controle (“control”), durante a estimulação artificial dos ventrículos (“ventricular pacing”), uma hora após o desligamento da estimulação ventricular aplicada por 7 dias (“7 days”), uma hora após o desligamento da estimulação ventricular aplicada por 21 dias (“21 days”) e após três dias do desligamento da estimulação artificial que estava sendo aplicada ao coração durante 21 dias consecutivos (“Rec. 3 days”) (YU et al., 1999).

Além dos ventrículos (PATBERG e ROSEN, 2004; MOLEIRO, 2001, RICHARD et al., 1999; KATZ, 1992; ROSENBAUM et al., 1982), também os átrios podem manifestar o fenômeno de memória elétrica (CHANDRA et al., 2003; HERWEG et al., 2001).

A capacidade de o miocárdio armazenar informações contráteis foi descrita inicialmente por Rios et al. (1975) e por Moreira et al. (1977) que chamaram a esta propriedade de “memória inotrópica”. Os autores,

trabalhando em miocárdio de anfíbio, propuseram um modelo matemático para simular situações, bem como os possíveis mecanismos de ação que gerariam a capacidade de o coração aprender.

O presente trabalho buscou contribuir para a caracterização da expressão e do processo de acumulação das memórias contráteis geradas no miocárdio de cobaia, bem como contribuir para o conhecimento dos mecanismos de ação que suportam suas existências.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Organização estrutural do músculo cardíaco

O músculo cardíaco apresenta estrutura diferenciada entre os tecidos excitáveis e é constituído por células individualizadas que estão intimamente acopladas, permitindo que o órgão funcione como um sincício (VAN BREEMEN, 1953 *apud* CONDE GARCIA, 1998). Os cardiomiócitos são estriados, ramificados, têm núcleo central e estão unidos por meio de membranas juncionais dotadas de regiões especializadas, tanto para a fixação mecânica, quanto para a transmissão de corrente elétrica. Os discos intercalares, como foram denominados por Engelmann (1877 *apud* CONDE GARCIA, 1998), foram chamados por Rothschild (1950 *apud* CONDE GARCIA) de “barreiras elétricas transversais”. Eles são compostos por regiões não-diferenciadas e por regiões especializadas (*fascia adherens*, *macula adherens* e *nexus*) (Fig. 2). As *fascia adherens* e a *macula adherens*, quando vistas à microscopia eletrônica, mostram-se eletrodensas e apresentam um pouco de espaço extracelular entre as membranas das células. A *macula adherens* tem formato discóide de aproximadamente 0,2 a 0,5 μm de diâmetro. Elas estão envolvidas com o acoplamento mecânico entre as células. Neste processo participam diversas proteínas, entre elas a caderina, cateninas e alfa-actina.

Os *nexi* ou junções gap são segmentos curtos, densos e por não apresentarem uma separação entre as membranas juncionais aparentam ser uma membrana única. Formadas por conexons, que são arranjos protéicos hexagonais, as junções representam ligações diretas entre os citoplasmas das células adjacentes, constituindo sítios de baixa impedância que possibilitam o acoplamento elétrico entre as células do coração. A reunião de dois conexons possibilita o surgimento de um canal intercelular que permite a livre difusão de eletrólitos e moléculas pequenas e impedem a passagem de proteínas e ácidos nucléicos (BERNE e LEVY, 2001; CONDE GARCIA, 1998).

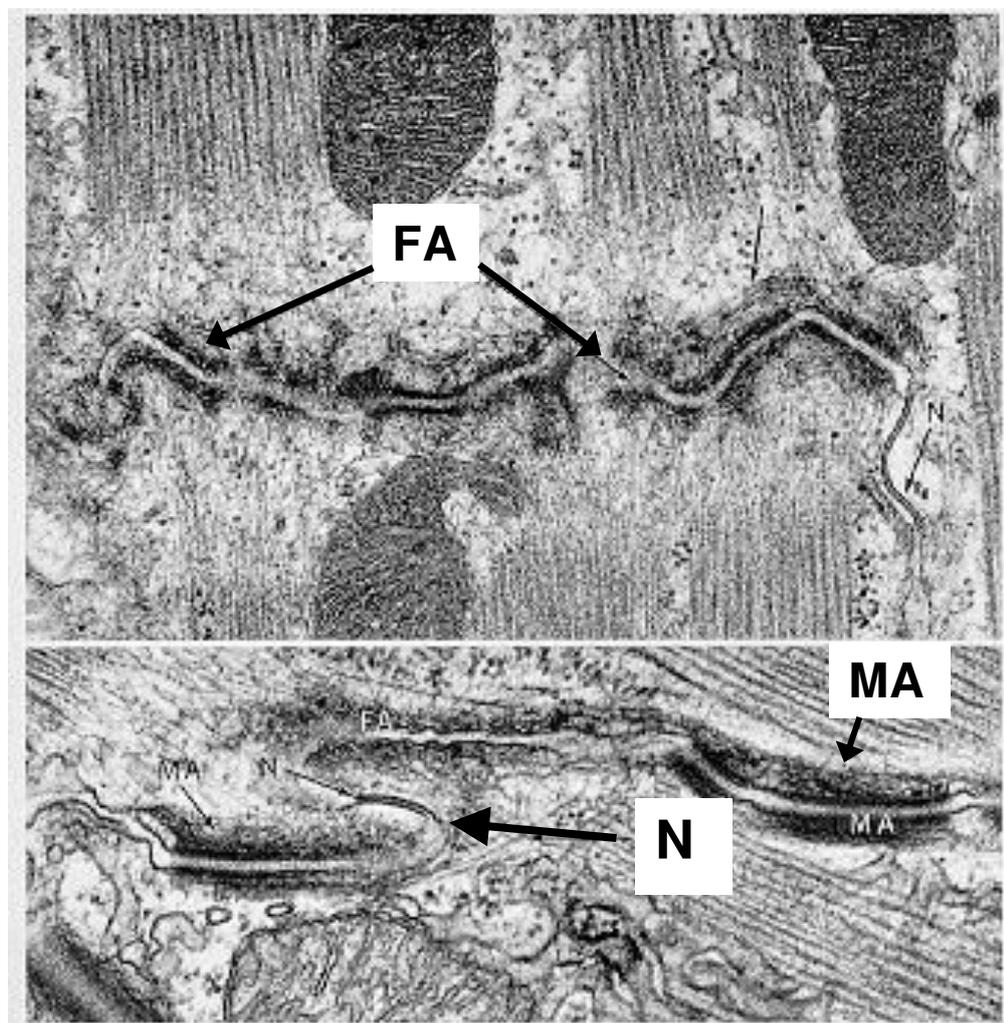


Figura 6 - Micrografia eletrônica dos discos intercalares mostrando regiões correspondentes a *fascia adherens* (FA), *macula adherens* (MA) e *nexus* (N) (reproduzido por McNUTT e FAWCETT, in Langer & Brady, 1974).

O músculo cardíaco apresenta um padrão regular de estriações transversais semelhantes as que existem nos músculos esqueléticos (MCNUTT e FAWCETT,1969). Ele é formado por células alongadas e ramificadas (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1999). A estrutura compreendida entre duas linhas Z consecutivas é denominada de sarcômero e, cada um deles apresenta microanatomia e fisiologia semelhantes, sendo considerado a unidade funcional do sistema de miofilamentos geradores de força muscular (GUATIMOSIM et al., 2002)

Na microscopia eletrônica (Fig. 3) esses filamentos aparecem como regiões claras e escuras denominadas respectivamente de banda A (anisotrópica) e I (isotrópicas). A banda A é formada por filamentos grossos (15 nm de diâmetro) em superposição lateral com os filamentos finos (7 nm de diâmetro). Essa região apresenta-se mais densa e com uma zona H, em cuja parte central encontra-se o disco M. A zona H é formada por filamentos grossos constituídos por miosina que se interconectam para formar o disco M (CONDE GARCIA, 1998; MCNUTT E FAWCETT, 1969; VOET et al., 2000). A banda I é formada por filamentos finos e pelas proteínas formadoras da linha Z. Estudos sugerem que os filamentos grossos também se ligam a linha Z, através de estruturas filamentosas de conexão constituídas por uma proteína longa denominada titina, que se estende da linha M à linha Z e funciona como mola para centralizar o filamento grosso de miosina.

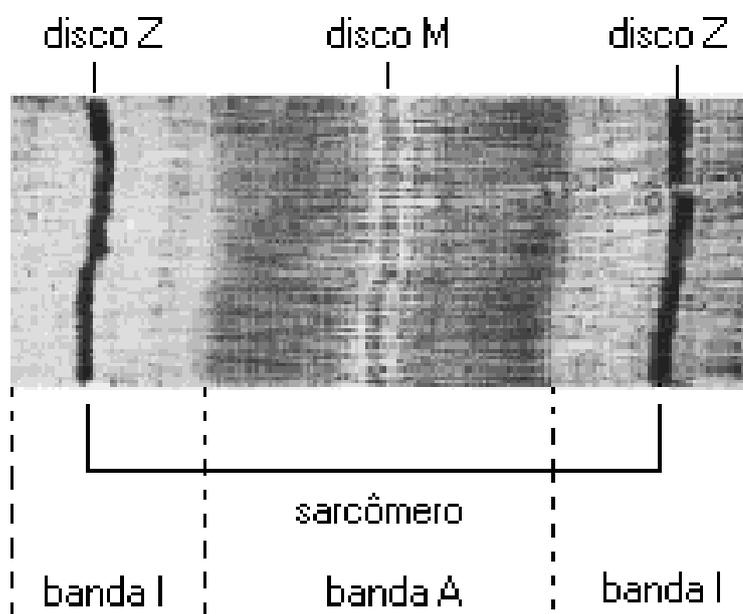


Figura 7 - Micrografia eletrônica mostrando, em corte longitudinal, um sarcômero com suas bandas A e I, bem como os discos ou linhas Z e M (Modificado de VOET et al., 2000, p.181).

Os filamentos finos são compostos por moléculas protéicas de actina, troponinas, tropomiosina e nebulina. A actina pode ser isolada sob duas formas: a actina G (globular) e a actina F (filamentosa). A actina G é uma proteína que se polimeriza para formar a actina F, que tem estrutura filamentar e se apresenta em forma de dupla hélice. Cada cadeia de monômeros globulares de actina G é ancorada à linha Z e possui uma região que interage com a miosina. A tropomiosina e o complexo das troponinas são essenciais para a regulação da ativação dos miofilamentos contráteis. A troponina cardíaca (cTn) é uma proteína heterotrimérica composta por produtos de três genes distintos: troponina C (cTnC), que é o sítio de ligação para o cálcio, troponina I (cTnI), que é a proteína inibitória do complexo cTnC/Ca²⁺ e a troponina T (cTnT), proteína que se liga fortemente a tropomiosina, que por sua vez constitui-se de uma molécula longa (40nm de comprimento) que contém duas cadeias polipeptídicas formando uma hélice (DE TOMBE, 2003; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999). A nebulina (750-850 kDa) é uma proteína cuja função parece estar associada à regulação do comprimento dos filamentos de actina (KAZMIERSKI et al., 2003).

Os filamentos grossos são formados pela associação de várias moléculas de miosina. Esta é uma proteína com peso molecular de 450 kDa composta por duas cadeias entrelaçadas que terminam numa região globular. A hidrólise enzimática da miosina promovida pela tripsina a divide em duas partes: uma leve, formada por grande porção de sua cauda (meromiosina leve – MML, 140 kDa) e outra mais pesada (meromiosina pesada – MMP, 340 kDa), que contém a região globular. A MMP, quando hidrolisada, subdivide-se em duas subunidades a S1 (120 kDa) e a S2 (60 kDa). A região S1 corresponde à região globular propriamente dita, possuindo atividade ATPásica, sendo portanto a ATPase miosínica, cuja função é hidrolisar o ATP, liberando a energia necessária à contração. Essa subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica pesada (200 kDa) e duas cadeias polipeptídicas leves. A cadeia pesada constitui o corpo da enzima (ATPase miosínica), posto que a sua remoção leva à perda da sua capacidade de

hidrolisar o ATP. Também uma das cadeias leves é fosforilável, o que pode modular a velocidade de hidrólise do ATP (VASSALO e STEFANON, 1999).

O arranjo espacial das moléculas de miosina é feito de tal forma que as cabeças dessas moléculas ficam voltadas para a linha Z (DE TOMBE, 2003; VASSALO e STEFANON, 1999; PAES DE CARVALHO, 1969). As regiões da “cabeça” dos filamentos grossos formam as pontes cruzadas e contêm o sítio de ligação para a actina e para o ATP (BERNE e LEVY, 2001). A titina, uma grande proteína (2500 kDa) associada aos filamentos de miosina, parece estar envolvida com a manutenção do padrão das estriações do músculo (LINKE e FERNANDEZ, 2002; GRANZIER e LABELIT, 2002).

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

A geração de força muscular está relacionada com o número de pontes cruzadas que podem interagir com os filamentos delgados. A princípio, a cTnC se liga ao cálcio livre do citoplasma e com isto desloca a tropomiosina do seu estado de repouso na goteira formada pela dupla hélice da actina. Com isto, expõe o sítio de alta afinidade existente nas moléculas de G-actina e permite que a cabeça da miosina com ele interaja levando à produção de força muscular. O desacoplamento do ADP da cabeça da miosina leva ao estado de baixa energia livre promovendo uma mudança conformacional no filamento grosso, modificando a sua angulação e criando a força muscular. A fosforilação da cTnI e a ligação de uma molécula de ATP à cabeça da miosina fazem com que a afinidade da miosina pela actina seja reduzida e, por isso, permite que as pontes cruzadas de actina e miosina se desconectem dos filamentos delgados (HO, 2003; BERNE e LEVY, 2001), levando ao relaxamento.

O mecanismo de Frank-Starling é uma propriedade intrínseca do miocárdio no qual um aumento do comprimento da fibra muscular até um

determinado comprimento ótimo, resulta em aumento da força (Fig. 4) durante a contração subsequente. Essa relação é um fator importante para a regulação da função cardíaca, pois durante o aumento do retorno venoso ocorre uma elevação do volume diastólico final dos ventrículos, propiciando a ocorrência de uma contração mais vigorosa. Com isto, vai haver uma maior ejeção do sangue, durante a sístole. Embora a significância fisiológica deste mecanismo seja amplamente conhecida, a sua base celular ainda não está completamente esclarecida. Uma hipótese é que, com o estiramento do sarcômero, mais pontes cruzadas interagem com a actina, devido a uma sobreposição mais efetiva entre os filamentos grossos e finos. Entretanto, este não parece ser o único fator responsável pelo mecanismo de Frank-Starling, pois também foi observado que, durante o estiramento, os filamentos finos aumentavam sua sensibilidade aos íons cálcio (MOSS e FITZSIMONS, 2002). Além disso, o estiramento da fibra muscular propicia o aparecimento de forças que levam à compressão da matriz dos miofilamentos, favorecendo assim a interação entre eles e explicando, pelo menos em parte, a alteração de sensibilidade dos miofilamentos ao íon cálcio (“lattice compression”) (BERS, 2002).

Pesquisas subsequentes demonstraram a relação entre o comprimento do sarcômero e a capacidade de gerar força. A capacidade tensiogênica máxima ocorreu quando os sarcômeros apresentavam comprimento entre 2 e 2,2 μm (Fig. 4). No músculo cardíaco, a tensão desenvolvida aumenta quase que linearmente, quando o comprimento do sarcômero varia de 1,9 a 2,4 μm e cai abruptamente, quando ele se situa entre 2,4 e 2,5 μm . Esta queda se deve ao fato de que vários sítios ativos de actina continuam cobertos pela tropomiosina, impedindo a formação de pontes com a miosina (CARVALHO et al., 1999).

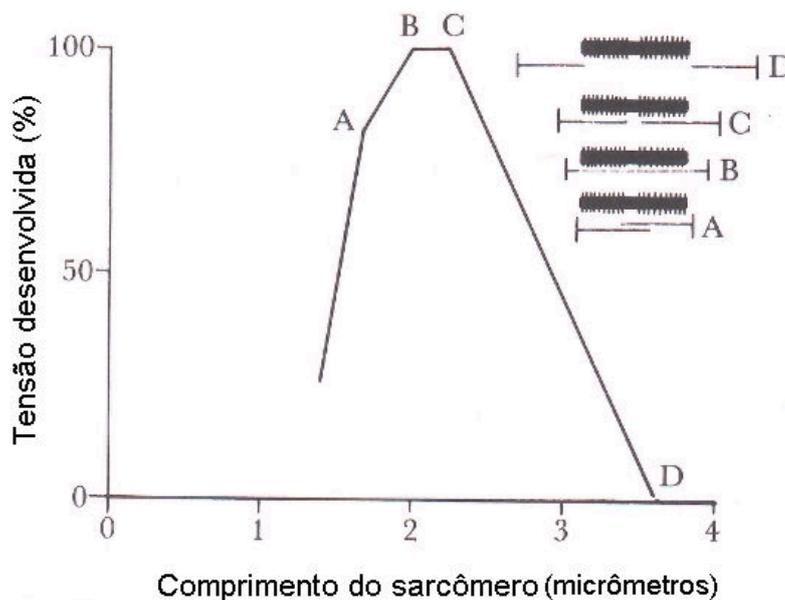


Figura 4 - Relação comprimento-tensão de um sarcômero demonstrando que a força máxima da contração ocorre quando o seu comprimento está entre 2,0 e 2,2 μm . O inserto superior representa as posições relativas dos filamentos de actina e miosina nos diferentes comprimentos do sarcômero, desde o ponto A até o ponto D (modificado de GUYTON & HALL, 1998).

Os cardiomiócitos apresentam um complexo sistema de tubulações transversais - os túbulos T – que são invaginações do sarcolema geralmente situadas à altura dos discos Z e que fazem com que o meio intersticial possa ficar mais próximo dos miofilamentos. Uma extensa rede de tubos intracelulares, denominados de retículo sarcoplasmático (RS), pode ser encontrada no interior das células miocárdicas, envolvendo completamente cada sarcômero. Sua fisiologia está intimamente relacionada aos eventos que se passam nos túbulos T. Devido à disposição morfológica deste túbulos, os canais de cálcio tipo-L do sarcolema ficam próximos aos canais liberadores de cálcio existentes na membrana das cisternas dos RS. Estes canais por serem bloqueados pela a rianodina são chamados de receptores da rianodina (RyR) (BERS,2004; OGAWA, 1994).

O conjunto formado pelos túbulos T e pelas cisternas dos RS que estão a sua volta, é chamado de tríade. Nas junções diádicas, representadas pela membrana sarcolemal do túbulo T, pela fenda diádica e pela cisterna do

RS, estão os “couplons”, considerados serem as unidades funcionais do processo excitação-contração do músculo cardíaco (SUN et al., 1995). Eles são formados por 10 a 25 receptores de diidropiridina (DHPR) alojados no sarcolema e posicionados estrategicamente à frente de 100 canais do tipo RyR, que estão na membrana do RS (GATHERCOLE et al., 2000). O maior número de canais RyR cria uma margem de segurança para garantir que a liberação de cálcio em cada “couplon”, mesmo pequena, seja bastante para induzir a liberação dos estoques desse íon contidos no RS (FRANZINI-ARMSTRONG et al., 1999).

2.2 Acoplamento excitação-contração

Os mecanismos fisiológicos que determinam a relação entre os fenômenos da despolarização dos cardiomiócitos e a contração que dela decorre são genericamente chamados de acoplamento excitação-contração. Este processo se faz manipulando o cálcio como um segundo mensageiro de forma que a despolarização celular se transforme em força de contração. Esse evento se faz de forma muito organizada, permitindo que o encurtamento dos sarcômeros possa ocorrer (SCOOTE et al., 2003). O acoplamento se inicia com a despolarização da membrana celular em virtude do surgimento de um potencial de ação. Com isto, ocorre a liberação do cálcio que está estocado no RS (HAMILTON et al., 2000). Durante o potencial de ação, há um aumento na probabilidade de abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, o que gera uma corrente de entrada desse cátion (ICa) devido a um gradiente eletroquímico favorável. Isso contribui para a formação do platô do potencial de ação do miócito cardíaco.

Os cardiomiócitos possuem duas classes de canais de cálcio sensíveis à voltagem: o canal do tipo L (Ca_L, “large depolarization”) e canal tipo T (Ca_T, “threshold”). O primeiro, com condutância de 15 a 25 pS é ativado em voltagens próximas a 0 mV e sofre regulação de proteínas G, exercendo importante função no acoplamento excitação-contração. O segundo, com condutância de 8 pS, é ativado por voltagens próximas a -50 mV, exercendo menor importância no acoplamento excitação-contração das

células cardíacas (DE PAOLI, 2002; TRAFFORD et al., 2001; CONDE GARCIA, 1998). No entanto, vale ressaltar que Kitchens et al. (2003) demonstraram que os canais do tipo T têm um papel significativo no acoplamento excitação-contração de miócitos embrionários, inclusive participando do mecanismo de liberação de cálcio que é induzida pelo aumento do cálcio citoplasmático livre, conhecido pela sigla CICR ("calcium-induced calcium release"). Com o CICR a concentração de cálcio citosólico aumenta rapidamente, fato que ocorre durante o potencial de ação (NIGGLI, 1999, FABIATO, 1983). O cálcio livre no citoplasma acaba por se ligar à cTnC, ativando a maquinaria contrátil. Para que o relaxamento ocorra, a concentração de cálcio intracelular livre deve diminuir, permitindo que haja uma dissociação do complexo cTnC/ cálcio. A redução do cálcio citoplasmático livre se faz por quatro vias conhecidas: 1) ação da Ca^{2+} -ATPase do RS, 2) ação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal, 3) ação da Ca^{2+} -ATPase sarcolemal e 4) ação do uniporte mitocondrial de Ca^{2+} . Entre estes mecanismos, os dois primeiros têm papel mais relevante (HOBAL et al, 2004; REUTER et al, 2003; BERS, 2002; WIER et al., 1999) (Fig. 5). O principal estoque de cálcio dos cardiomiócitos encontra-se no RS. A alta concentração deste íon no interior da organela ocorre graças a um potente sistema de bombeamento feito pela SERCA ("sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase") (EBASHI, 1962 *apud* POZZAN et al., 1994). Essa bomba é fundamental para o esvaziamento do cálcio livre. Existem várias isoformas da SERCA, sendo que a predominante no músculo cardíaco é a SERCA 2 (CARAFOLI, 2002; POZZAN et al., 1994). O fosfolamban é um inibidor endógeno da SERCA, mas, uma vez fosforilado, deixa de inibi-la. Com isso, a SERCA promovendo o bombeamento de cálcio para o interior do RS, levando a um rápido declínio do cálcio livre no citosol (BRITTSAN e KRANIAIS, 2000; JI et al., 1999, CHIESI, 1994).

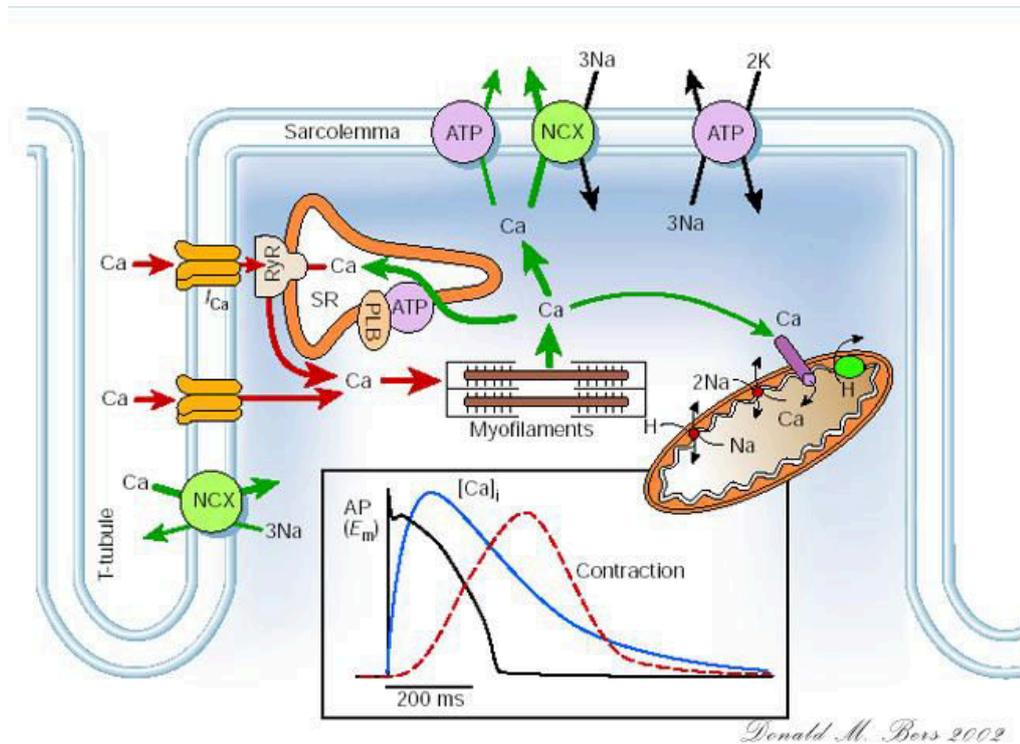


Figura 5 – Esquema dos mecanismos envolvidos no processo de excitação-contracção do cardiomiócito. No sarcolema o Ca²⁺ é trocado pela bomba de Ca²⁺ (ATP) e pelo trocador sódio:cálcio (NCX). Além disso, o cálcio pode entrar na célula por meio de canais de cálcio acoplados ou não a receptores de rianodina (RyR) existentes no RS (na figura, SR). PLB: fosfolamban. A mitocôndria participa com o seu uniporte para cálcio. No inserto se mostra o curso temporal do: potencial de ação – AP (preto), transiente intracelular de cálcio - [Ca²⁺]_i (azul) e força de contracção (vermelho) (reproduzido de BERS, 2002).

O processo de acoplamento excitação-contracção nas células atriais apresenta-se de forma diferente do que ocorre nas ventriculares. Enquanto que nos átrios o processo denominado de CICR envolve o sarcolema, nas células ventriculares ele ocorre entre a membrana dos túbulos T e as cisternas do sistema RS. Nestas unidades funcionais denominadas couplons, a disposição das estruturas ativas garante uma conexão entre os canais do tipo-L e os canais RyR (BLATTER et al., 2003). Isto, todavia, não ocorre nas células atriais porque estas não expressam túbulos T e as cisternas dos RS interagem diretamente com o sarcolema. Assim, quando o miócito atrial é despolarizado por um potencial de ação, o aumento da

concentração intracelular de cálcio se faz de forma centrípeta, isto é, começa pelas regiões próximas ao sarcolema e progride para o interior da célula (Fig. 6), enquanto que nos ventrículos essa liberação se faz em todos os níveis de profundidade no interior das células.

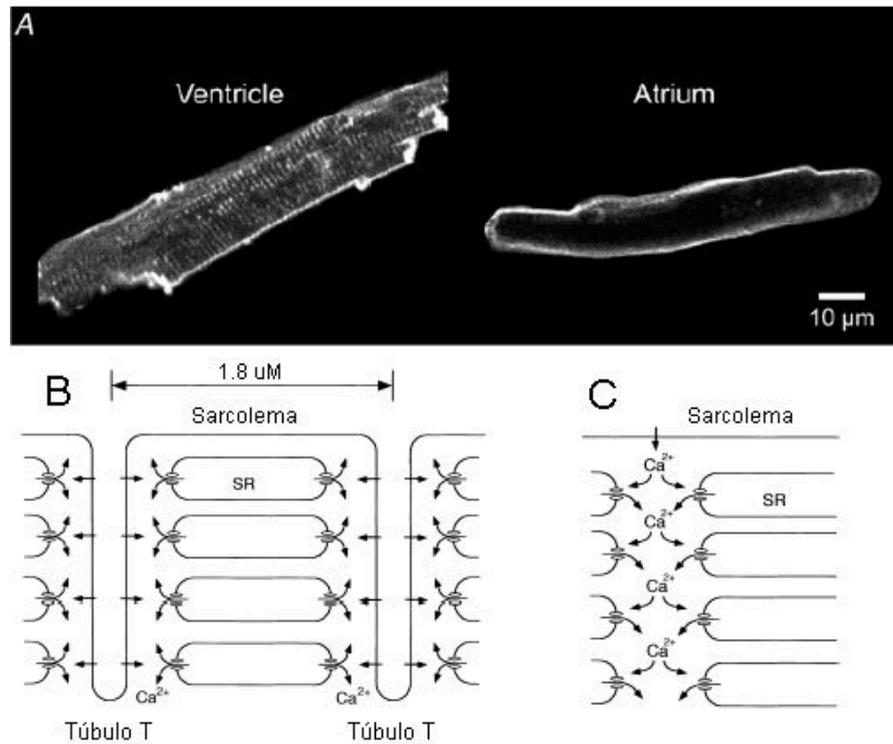


Figura 6 – Comparação entre os mecanismos de acoplamento excitação-contracção em células ventriculares e atriais. Em A: fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de cardiomiócitos de gato estando o atrial à esquerda e o ventricular à direita. As células foram marcadas com substância fluorescente. As estruturas regularmente espaçadas, apresentando um padrão do tipo sarcômero e vistas na célula ventricular, representam os túbulos T. Em contraste, a célula atrial é desprovida deste sistema tubular. Em B: esquema do acoplamento excitação-contracção no miócito ventricular. O influxo do cálcio pelos túbulos T ativa a liberação de cálcio do RS, resultando num aumento mais uniforme do cálcio no sarcoplasma. Em C, esquema do acoplamento excitação-contracção em miócito atrial, mostrando que o influxo do Ca^{2+} através do sarcolema, ativa a liberação de Ca^{2+} na região subsarcolemal do RS, gerando uma onda de CICR que se propaga centrípetamente (reproduzido de TANAKA et al., 2003).

Estudos ultra-estruturais (MCNUTT e FAWCETT, 1969 *apud* BLATTER et al., 2003; TANAKA et al., 2003) têm mostrado dois tipos de membranas no RS, a saber, a membrana juncional (jRS), situada mais periféricamente, isto é voltada para o sarcolema e em íntima associação com ele e a membrana não juncional (njRS), esta localizada mais para o centro da célula. Os RyRs estão ancorados nos dois tipos de membrana do retículo sarcoplasmático, sendo porém predominantes na região das cisternas.

2.3 As funções mecânica e elétrica do coração

Galvani e Volta, há dois séculos atrás, demonstraram que fenômenos elétricos estavam envolvidos nas contrações do coração (BERNE e LEVY, 2001). As células marcapasso existentes em todas as partes deste órgão, porém preferencialmente nos seus nódulos sinusal e atrioventricular, são encarregadas de promover a auto-estimulação do coração, pois geram espontaneamente e de forma repetitiva potenciais de ação que se propagam por todo o órgão. Essas ondas elétricas propagadas comandam a atividade cardíaca. Normalmente, as ondas de despolarização se originam no nódulo sinusal, localizado no átrio direito, junto à desembocadura da veia cava superior, com dimensões em torno de 8 mm de comprimento e 2 mm de largura (WEST, 1972). A partir do nódulo sinusal, a onda elétrica se propaga rapidamente com uma velocidade entre 60 e 80 cm/s, em direção aos átrios direito e esquerdo, bem como ao septo interatrial (JOHNSON e SWARTZ, 1986).

O coração funciona como um sincício elétrico (WEIDMANN, 1966 *apud* CONDE GARCIA, 1998), pois nele o impulso elétrico encontra uma resistência muito pequena para ser conduzido de célula a célula. O anel valvular - região onde se encontram ancoradas as válvulas do coração - é constituído por tecido elétrico não excitável. Deste modo, a única via normal para que o impulso elétrico despolarizante alcance os ventrículos está localizado ao nível do nódulo atrioventricular. No interior desta estrutura, a onda elétrica se propaga a uma velocidade relativamente baixa (1 a 10

cm/s). Isto se deve ao fato de que as células nodais apresentam menor acoplamento, dificultando o fluxo de corrente elétrica entre elas. Por outro lado, as células nodais geram potenciais de ação de menor amplitude, o que favorece à baixa velocidade da onda de despolarização nessa estrutura. A deficiência de acoplamento intercelular decorre de uma reduzida área de junções gap, enquanto que a menor amplitude dos potenciais de ação nodais se deve ao fato de que as células desta estrutura geram potenciais de ação do tipo lento. Os potenciais de ação dos nódulos sinusal e atrioventricular se despolarizam com velocidade menor do que a que ocorre nas células de trabalho e de condução (MENDEZ e MOE, 1972). O estímulo elétrico despolarizante, após atravessar o nódulo atrioventricular, segue pelo feixe de His e por seus ramos, alcançando as fibras de Purkinje. Estas estruturas se especializaram em conduzir potenciais de ação com grande velocidade (2 a 4 m/s), pois suas células apresentam poucas miofibrilas e têm elevado grau de acoplamento entre si.

3 OBJETIVOS

3.1- Geral

Descrever e caracterizar em tecido muscular atrial, os processos de produção e de armazenamento de informação que contribuem para a geração de memórias inotrópicas neste tecido.

3.2- Específicos

- ✓ Distinguir os tipos de memória contrátil (depressora e excitadora) que se formam durante o trabalho do miocárdio atrial de cobaia;
- ✓ Caracterizar a dinâmica temporal com que se expressa e se apaga a memória depressora em miocárdio atrial de cobaia;
- ✓ Caracterizar a dinâmica temporal com que se expressa e se apaga a memória excitadora em miocárdio atrial de cobaia;
- ✓ Avaliar o comportamento da expressão, da acumulação e do apagamento das memórias depressora e excitadora, em função da concentração extracelular de potássio;
- ✓ Avaliar o comportamento da expressão, da acumulação e do apagamento das memórias depressora e excitadora, em função do bloqueio de receptores muscarínicos;
- ✓ Avaliar o comportamento da expressão, da acumulação e do apagamento das memórias depressora e excitadora, em função do bloqueio de canais de potássio;
- ✓ Avaliar o comportamento da expressão, da acumulação e do apagamento das memórias depressora e excitadora, em função da concentração extracelular de cálcio;
- ✓ Avaliar o comportamento da expressão, da acumulação e do apagamento das memórias depressora e excitadora, em função da liberação de cálcio intracelular induzida pela cafeína.

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 Animais

Foram utilizadas cobaias machos adultas (*Cavia porcellus*), com peso entre 300 e 500 g, reproduzidas e criadas no Biotério da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram alimentados com ração comercial (NUTRICOBAIA, AGRIBRANDS DO BRASIL LTDA, Brasil) e estiveram submetidos ao ciclo claro-escuro natural (12 h/12 h). A manipulação dos animais, durante os experimentos, obedeceu às regras estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo o Projeto sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe e registrado sob o No. 05/2010.

4.2 Solução nutritiva

Tabela 1 – Solução de Tyrode

<i>Substâncias</i>	<i>Concentrações (mM)</i>
NaCl	120,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,90
NaHCO ₃	11,90
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,40
KCl	2,70
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,37
Glicose	5,50

Segundo Dorigo et al. (1990)

4.3 Montagem do experimento

4.3.1 Montagem do átrio esquerdo em cuba para órgão isolado

Os experimentos foram realizados em átrio esquerdo de cobaia (*Cavia porcellus*) e foram executados entre as 8 h e 22 h. Para reduzir os estoques adrenérgicos do miocárdio, os animais receberam uma dose de reserpina (5 mg/kg) administrada por via intra-peritoneal, 24 h antes do experimento. Os animais foram sacrificados por golpe aplicado na região cervico-cranial (VASCONCELOS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; NOTSU et al., 1992; DORIGO et al., 1990; ZAVECZ e LEVI, 1978). O tórax foi aberto e o coração removido. O átrio esquerdo foi separado e montado em solução de Tyrode no interior de uma cuba para órgão isolado (5 mL; $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), tal como está esquematizado na Fig. 7. Sua extremidade inferior foi fixada ao fundo da cuba e a superior conectada, por meio de um fio de aço inoxidável (0,3 x 95 mm), a um transdutor isométrico de força (FTA10 HP/SUNBORN, Illinois, Chicago, EUA). O transdutor foi montado em um micromanipulador o que permitiu ajustar suavemente o estiramento do músculo para uma tensão de repouso de 1 gf. Os sinais do transdutor foram amplificados (HP 8805B) e então enviados para serem gravados (Fig. 7, Saída 5). Uma vez na cuba, o átrio permaneceu imerso em solução de Tyrode que foi oxigenada e teve o seu pH equilibrado, borbulhando-se nela uma mistura carbogênica (95 % de oxigênio e 5 % de CO_2 , White Martins Gases Industriais do Nordeste, AirProducts Brasil, Incerteza: $\pm 0,05$ micromol/mol). A temperatura no interior da cuba foi medida continuamente com a ajuda de um termistor colocado no banho e o seu controle foi feito fazendo-se circular água aquecida (bomba termoestável HAAKE FJ, refrigerador IBBL, modelo FN2000) através de uma jaqueta situada em volta da cuba. Os átrios foram submetidos a uma estimulação de campo de 1 Hz, usando-se, para isso, pulsos elétricos com intensidade de 400 V e duração de 0,5 ms aplicados com a ajuda de dois eletrodos de prata (Fig. 7, conexões 3 e 4). A baixa frequência de estimulação foi usada para proteger a integridade das células, minimizando as chances de elas desenvolverem metabolismo anaeróbico com consequente formação de

espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio (radicais livres). Esses pulsos foram gerados por um estimulador DIGITIMER 3072 (DG3) (Digitimer Limited, England), que trabalhou escravo dos Programadores de Pulsos DG1 e DG2 (DIGITIMER D4030, Digitimer Limited, England), conforme, a seguir, se descreve.

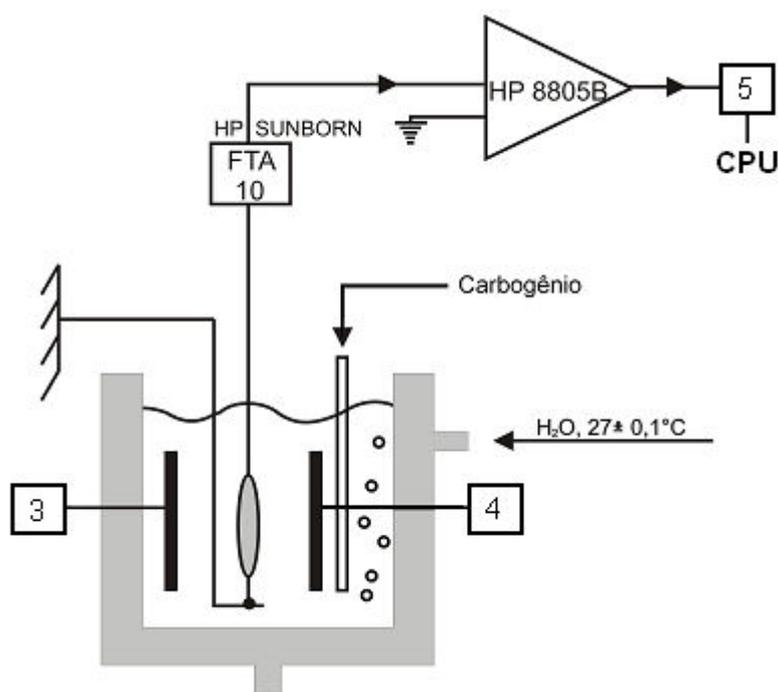


Figura 7 – Esquema geral da montagem do átrio esquerdo de cobaia usada nos experimentos. Na cuba, mergulhado em solução de Tyrode, o átrio, estirado a 10 mN, foi mantido sob estimulação elétrica através de eletrodos de prata (conexão 3 e 4) pelo estimulador DIGITIMER 3072. Uma mistura carbogênica garantiu a oxigenação e o equilíbrio do pH. Por uma jaqueta disposta em volta da cuba fez-se circular água aquecida a $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, a fim de manter sob controle a temperatura do banho. O átrio estava ligado a um transdutor isométrico de força (FTA10 HP SUNBORN), cujos sinais foram amplificados (HP 8805B), digitalizados (conexão 5 - DATAQ DI 400) e armazenados em computador (CPU).

4.3.2 Arranjo lógico dos equipamentos visando à adequada estimulação do miocárdio para a execução dos protocolos de investigação

4.3.2.1 Lógica dos pulsos para estimular ritmicamente o átrio de cobaia

4.3.2.1.1 Exemplo esquemático

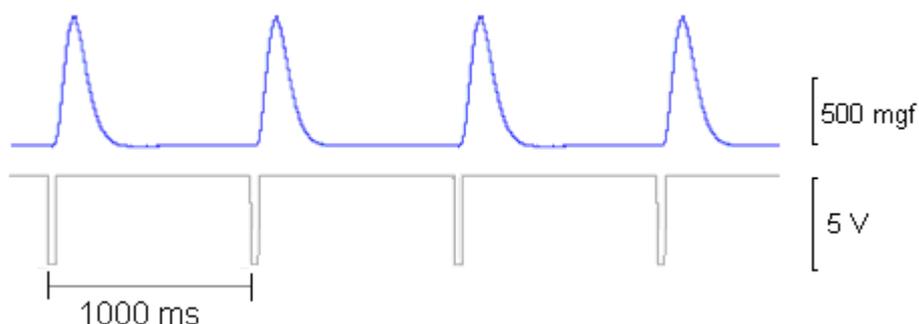


Figura 8 – Registros gravados em computador e obtidos durante a estimulação-controle do átrio esquerdo de cobaia. O canal superior mostra curvas de força de contração, enquanto que o inferior refere-se ao ‘gate’ usado como máscara para determinar o momento da estimulação (Frequência de estimulação: 1 Hz; $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$).

4.3.2.1.2 Objetivo: Manter a preparação biológica contraindo-se com frequência regular de 1 Hz

4.3.2.1.3 Procedimento. A Fig. 9 mostra esquematicamente dois programadores de pulsos (Digitimer 3040, DG1 e DG2) e um estimulador (Digitimer Stimulator 3072, DG3). O DG3 (Saídas 3 e 4) foi responsável pela geração dos pulsos de estimulação (0,5 ms, 400 V). Este estimulador trabalhou em modo escravo, sendo comandado pelo DG1 - este responsável pelo ritmo-controle de 1 Hz - e pelo DG2, responsável por gerar os pulsos extrassistólicos com intervalos de acoplamento previamente determinados.

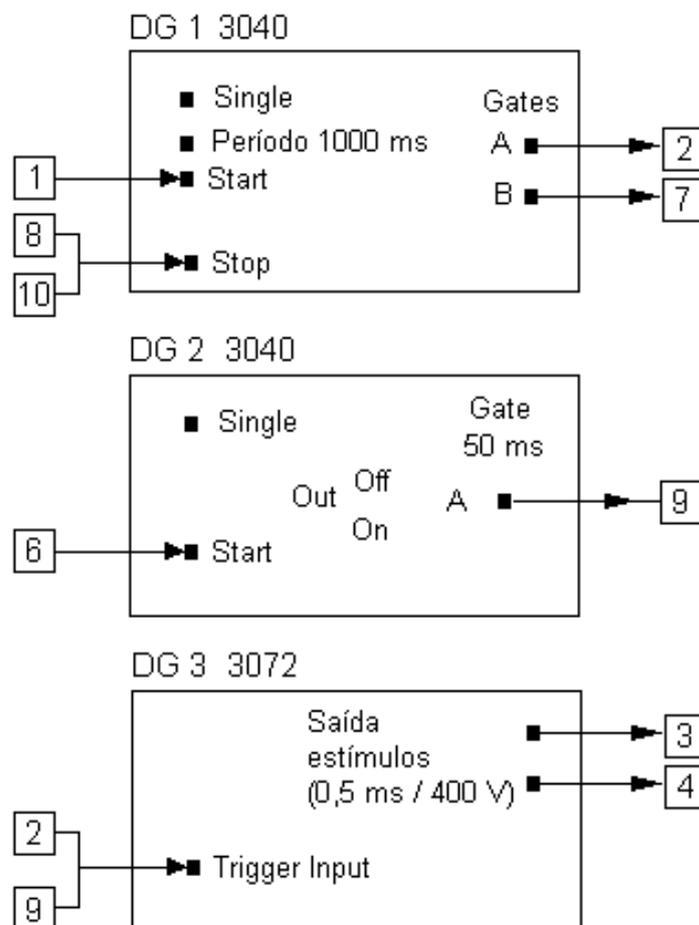


Figura 9 - Equipamentos geradores de pulsos usados na montagem experimental do átrio de cobaia. DG1 e DG2 são programadores de pulso (DIGITIMER 3040), enquanto que o DG3 é o estimulador (DIGITIMER 3072). O DG1 operou em modo escravo e 'single' e foi responsável pela geração do padrão rítmico da estimulação do átrio esquerdo de cobaia (Saída 7), bem como pela geração da máscara referente ao instante em que foi gerado o pulso de estimulação (Saída 2). O DG1 teve sua atividade interrompida pelos sinais que chegaram à sua entrada STOP (Entradas 8 e 10), provenientes dos WPI 2 e 4 (Saída 10 e 8, respectivamente). O sinal na Saída 2 do DG1 foi enviado como 'trigger' ao estimulador DG3 (Entrada 2, DIGITIMER 3072), enquanto que o sinal da Saída 7 foi enviado para sincronizar o WPI 1 (Entrada 7 do contador de eventos). O DG3 foi encarregado de estimular a preparação biológica (Saídas 3 e 4) com pulsos de estimulação de 0,5 ms e 400 V. O DG2, por sua vez, também operou em modo escravo e 'single', recebendo 'trigger' (Entrada 6) proveniente do WPI 1 (Saída 6). O DG2 (Saída 9) foi responsável pelo disparo do DG3, a fim de produzir um pulso extrassistólico (Entrada 9), cujo 'delay' em relação à estimulação normal precedente pôde ser adequadamente controlado. Ambos os pulsos 2 e 9 gerados por DG1 e DG2, respectivamente, foram também enviados para gravação em computador (Entradas 2 e 9 do DI 205).

O DG1 (Fig. 9) trabalhou em modo “Single” e escravo do WPI 0 (Fig. 10, WPI 1830, “Interval Generator”). Este equipamento operou em modo “Internal Synchronization”, gerando um trem de pulsos com frequência de 100 kHz (período de 10 μ s) (Fig. 10). Estes pulsos foram enviados para sincronizar o DG1 (Saída 1). A cada ciclo do DG1, um “gate” de polaridade negativa era gerado na Saída 2. Este sinal foi usado para disparar o estimulador DG3 (Fig. 9, Entrada 2), responsável final por todos os pulsos de estimulação aplicados à preparação biológica.

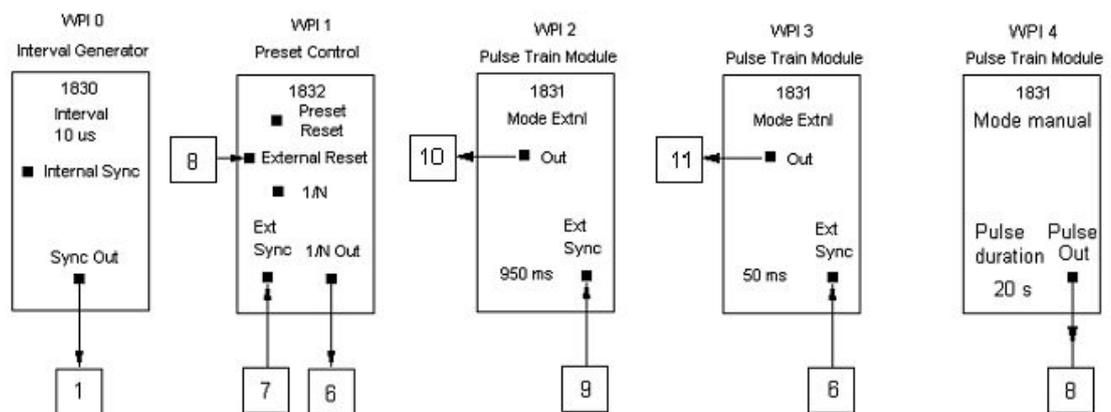


Figura 10 – Esquema dos equipamentos eletrônicos usados para criar a lógica de pulsos necessária à execução dos protocolos de Seed & Walker – Shimizu e de Conde Garcia. WPI 0: ‘clock’; WPI 1: contador de eventos condicionantes no protocolo de Conde-Garcia; WPI 2: freio do DG1; WPI 3: gerador de ‘trigger’ para produzir um alarme sonoro indicativo do momento em que o pulso extrassistólico foi gerado; WPI 4: gerador de pulso de bloqueio usado para o ‘reset’ do WPI 1 (Entrada 8) e para inibir o DG1 (Entrada 8) paralyzando a geração do ritmo-base da estimulação.

4.3.2.2 Lógica de pulsos necessários para produzir a seqüência de eventos do protocolo experimental proposto por Seed & Walker (1988) conjuminado com a adição da pausa pós-extrassistólica proposta por Shimizu (2000)

sinal na Saída 6 que era então enviado para disparar o DG2 (Entrada 6). Isto permitia que na Saída 9 deste equipamento fosse produzido um sinal extraordinário, cujo retardo podia ser adequadamente ajustado. Este sinal foi então enviado à Entrada 9 do DG3, produzindo, assim, o pulso extrassistólico (Ex) a ser aplicado à preparação biológica.

O pulso gerado na Saída 9 do DG2 teve uma duração de 50 ms. Ele foi enviado para a Entrada 9 do WPI 2 que estava ajustado para operar em “External Synchronization” (Fig. 10). Este equipamento, uma vez disparado, gerava um pulso de 950 ms que, somados aos 50 ms do pulso de ‘trigger’, perfazia um total de 1000 ms (Saída 10). Este sinal serviu para parar a atividade do DG1 por 1000 ms (Entrada 10) após a extrassístole ter sido aplicada à preparação. Esta pausa foi proposta por Shimizu et al. (2000) e é referida neste trabalho como sendo a pausa de Shimizu (Fig. 11).

4.3.2.3 Lógica usada na geração de pulsos para produzir a seqüência de eventos necessários à execução do protocolo experimental proposto por CONDE GARCIA (ainda não publicado)

4.3.2.3.1 Exemplo esquemático

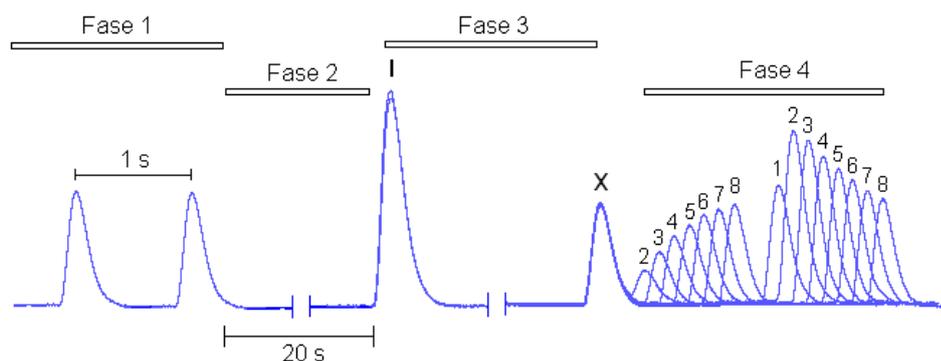


Figura 12 – Sequência de contrações usada para o estudo das memórias. Fase 1: contrações controle onde se encontram em equilíbrio as memórias depressora e excitadora; Fase 2: pausa da estimulação, visando ao apagamento das memórias acumuladas; Fase 3: contrações condicionantes variando de 1 a 10, visando reconstruir as memórias contráteis; Fase 4: testes para avaliar a acumulação das memórias produzidas pelas contrações condicionantes do miocárdio. A extrassístole número 1 não aparece por estar embutida na contração anterior ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 1 Hz; 400V; 0,5ms).

4.3.2.3.2 Objetivo: Estudar a contribuição do funcionamento contrátil do miocárdio para o processo de acumulação da memória depressora (expressada pela amplitude das extrassístoles) e da memória excitadora (expressada pela amplitude das 1a. CPEx a diferentes IAEx).

4.3.2.3.3 Caracterização do protocolo experimental de Conde Garcia. O protocolo experimental de Conde Garcia caracterizou-se pelo o fato de que os pulsos extrassistólicos, usados no protocolo conjuminado de Seed-Walker-Shimizu para obter as CRMs, somente eram aplicados à preparação biológica, após um período de quiescência de 20 s e após um número previamente determinado de contrações condicionantes (CCond).

4.3.2.3.4 Procedimento. Para executar o protocolo de Conde Garcia, um 'gate' com duração de 20 s foi disparado manualmente no WPI 4 (Fig. 10, Saída 8). Este sinal foi enviado para a Entrada 8 do WPI 1 ("External Reset"), zerando o contador deste equipamento. Acabado o pulso inibidor proveniente do WPI 4, o 'plug in' WPI 1 reiniciava a contagem dos pulsos chagados à sua Entrada 7. Quando a quantidade de pulsos se igualava ao valor pré-determinado neste equipamento, um sinal era gerado na sua Saída 6 e este era enviado à Entrada 6 do DG2 (Fig. 9), disparando, assim, um 'trigger' extrassistólico (Saída 9) que então era enviado à Entrada 9 do DG3. Este, por sua vez, estimulava a preparação biológica, produzindo as extrassístoles necessárias para determinar a CRM em função de diferentes quantidades de CConds (contrações condicionantes). O 'trigger' extrassistólico foi também enviado à Entrada 6 do WPI 3 que, trabalhando em 'External Mode', produziu um sinal na sua Saída 11. Este sinal foi então enviado à Entrada 11 do HP 3310B (gerador de ondas), produzindo assim um trem de ondas na frequência de áudio que alimentou um auto-falante gerando um sinal sonoro (Fig. 13, Auto).

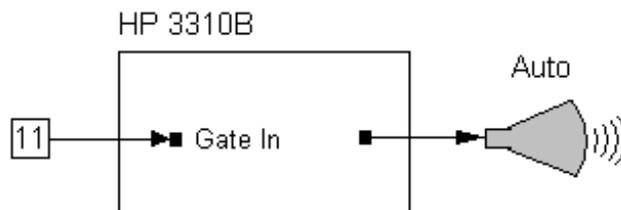


Figura 83 – Esquema do gerador de alarme sonoro. HP 3310B: gerador de sinais de áudio freqüência operado escravo do WPI 3.

4.3.2.4 Gravação dos sinais de força atrial e dos respectivos pulsos de estimulação

Os sinais elétricos, obtidos na Saída 5 do amplificador HP 8805B da Fig. 7, foram enviados a um conversor analógico/digital (DATAQ DI 400 DI 205, Windaq Pro Acquisition, Ohio, EUA) que colheu dados a uma freqüência de 512 amostras por segundo, permitindo que fossem gravados em computador tal como esquematizado na Fig. 14. Ela mostra que, além dos sinais entregues à Entrada 5, foram também digitalizados e gravados dois outros, a máscara do estímulo (Entrada 2) e a máscara da extrassístole (Entrada 9).

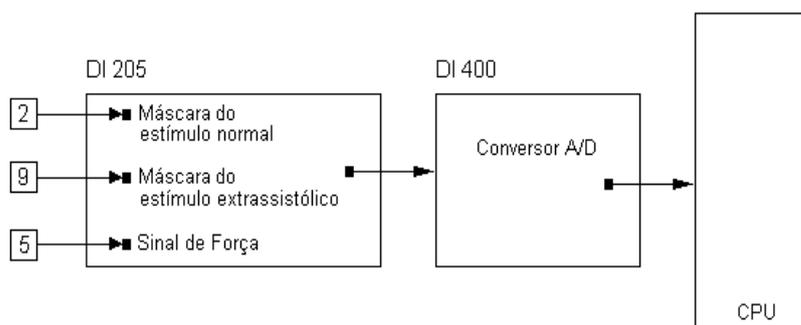


Figura 14 – Sistema de conversão analógico-digital constituído por uma unidade de 'input' de sinais (DI 205, DATAQ) e uma placa conversora A/D (DI 400, DATAQ) e um computador representado pela CPU. A Entrada 2 recebeu um 'gate' gerado no momento do estímulo normal, enquanto que na Entrada 9 chegou um 'gate' gerado no momento no momento da estimulação extrassistólica aplicada à preparação biológica. O conversor A/D operou, normalmente, a 512 Hz.

4.4 Avaliação da expressão das memórias contráteis

4.4.1 Memória depressora e seus descritores

Instrumento de avaliação da MD. A memória depressora (MD) foi estudada a partir da Curva de Restituição Mecânica do miocárdio (CRM), obtida conforme descrito por Seed & Walker (1988). Resumidamente: em átrio esquerdo estimulado, foram induzidas extrassístoles isoladas, cada uma com diferentes IAEx (300-900ms), tendo sido suas amplitudes medidas e plotadas contra os valores de IAEx. Esta curva está relacionada com o estado de prontidão inotrópica do tecido miocárdico, isto é, ela reflete o grau de sensibilidade do mecanismo contrátil celular para responder a um dado estímulo elétrico. Desta forma, quanto maior for esta sensibilidade, menor será o tempo para que a curva alcance o seu valor máximo. No que concerne a este trabalho, a CRM foi empregada para estudar a expressão e o apagamento de MD. Durante o controle, a carga de MD (KMD), associada a cada contração, foi considerada ser de 100 unidades arbitrárias. Na contração extrassistólica, o Incremento de Carga de Memória Depressora (IKMD, Fig. 11), a ela associada, foi determinada pela diferença percentual entre a amplitude da força no controle e a amplitude da extrassístole. Como estas são menores do que a força-controle, então é razoável supor que, nela, a quantidade de MD seja maior do que a que existe no controle. Deste modo, a KMD presente na contração extrassistólica será maior que 100.

Descritor estático para a MD. O descritor estático foi denominado IKMDmax, que representa o Incremento Máximo de Carga de Memória Depressora e cujo valor foi sempre obtido no IAEx mais curto. Este descritor serviu para avaliar a quantidade máxima de MD transferida para a contração extrassistólica.

Descritor dinâmico para a MD. A Velocidade Média de Apagamento da carga de Memória Depressora, observada ao longo do tempo – VmedAMD – foi usada como descritor dinâmico da MD. Para obtê-lo, a amplitude de cada

extrassístole produzida com diferentes IAEx, foi ajustada por regressão linear e assim calculado o coeficiente angular médio.

4.4.2 Memória excitadora e seus descritores

Instrumento para avaliar a ME. O Incremento de Carga de Memória Excitadora (IKME, Fig. 11) foi avaliado com o protocolo de Seed & Walker (1988) associado à pausa proposta por Shimizu et al. (2000). Com este método, foi possível avaliar a contribuição de extrassístoles, obtidas com diferentes IAEx, para promover a variação da Carga de Memória Excitadora (KME) que ocorre na 1aCPEx, relativa a cada IAEx.

Descritor estático para avaliar a ME. O Incremento Máximo de Carga de Memória Excitadora - IKME_{max} - foi usado como descritor estático de ME. Ele foi determinado na 1aCPEx de maior amplitude, esta geralmente observada com IAEx de 300 ou 400 ms. Para isto, a amplitude da maior 1aCPEx foi normalizada percentualmente em relação à amplitude da contração controle.

Descritor dinâmico para avaliar a ME. O IKME_{max} decresce com o tempo. A velocidade média deste apagamento - V_{medAME} - foi determinada pela inclinação da reta de regressão usada para o ajustamento das amplitudes da 1aCPEx correspondente aos diferentes IAEx.

4.5 Avaliação do processo de acumulação das memórias contráteis

O miocárdio, ao trabalhar, gera MD e ME. A amplitude de cada contração depende do balanço entre elas. Para estudar o processo de construção destas memórias foi empregado o protocolo experimental de Seed & Walker (1988), porém aplicado a miocárdio pré-condicionado com um número determinado de contrações. Assim, o miocárdio foi mantido sob estimulação elétrica regular com período de 1000 ms e então a estimulação foi suspensa por 20 s com o intuito de estabelecer um tempo fixo para o

apagamento das memórias nos diversos protocolos experimentais. Este tempo é muito longo. Em seguida, a preparação biológica foi resubmetida à estimulação elétrica. Estas contrações serviram para recondicionar o miocárdio e foram, por isto, denominadas de Contrações Condicionantes (CCond). Assim, o protocolo de Seed-Walker-Shimizu foi aplicado após pré-condicionar o miocárdio com um número variável de CCond (1 a 10). Com isto, se pôde determinar a variação da carga de MD, medindo-se a amplitude das extrassístoles, bem como a carga de ME, esta determinada pela amplitude da 1aCPEx obtida após estimulações feitas com diferentes IAEx.

Instrumentos para avaliar a acumulação de MD e ME. A acumulação de MD e ME foi avaliada pelos descritores estáticos e dinâmicos relativos a cada uma delas, porém determinados após submeter as preparações a diferentes pré-condicionamentos, variando-se o número de contrações condicionantes.

4.6 Protocolos para avaliar o mecanismo formador de MD e ME

Avaliação dos mecanismos que levam a expressão e a acumulação de MD e ME. Para estudar os mecanismos de ação que suportam a expressão e a acumulação de MD e ME, o átrio foi estudado mediante diferentes tratamentos como se relata a seguir:

- 1) Objetivo:** Demonstrar que as memórias contráteis diferem da memória elétrica; **Procedimento:** As memórias inotrópicas foram estudadas antes e após o miocárdio ser despolarizado pelo aumento da concentração extracelular de potássio de 2,7 para 7,0 mM; **Hipótese:** A elevação de potássio no meio extracelular despolariza a célula miocárdica, modificando a manifestação de qualquer fenômeno do tecido cardíaco que dependa dos potenciais elétricos celulares;
- 2) Objetivo:** Averiguar se na formação das memórias havia participação de vias colinérgica; **Procedimento:** As respostas contráteis foram avaliadas antes e após o bloqueio de receptores

muscarínicos, este feito com o sulfato de atropina (1,5 μ M); **Hipótese:** É sabido que a acetilcolina abre canais de potássio no músculo cardíaco e que isto promove redução na duração dos potenciais de ação, levando a diminuição da entrada de cálcio nas células, com conseqüente alteração contrátil;

- 3) **Objetivo:** Avaliar se as correntes de potássio contribuem para a formação das memórias; **Procedimento:** Foram feitos testes conduzidos antes e após o bloqueio de canais para potássio usando-se para tal o bloqueador inespecífico, tetraetilamônio (TEA: 20 mM); **Hipótese:** As variações das correntes de fuga transportadas pelo potássio podem despolarizar ou hiperpolarizar o potencial da membrana celular. Desta forma, todos os fenômenos que dependem desse potencial são alterados pelas manobras que interferem com as correntes de potássio;
- 4) **Objetivo:** Avaliar a contribuição das correntes sarcolemais de cálcio nos mecanismos relacionados com as memórias contráteis; **Procedimento:** Foram realizados experimentos nos quais se variou a concentração extracelular de cálcio desde 1,37 até 9,59 mM; **Hipótese:** O cálcio é o elemento fundamental para o processo de acoplamento excitação-contração, bem como para promover a geração de força nas células do miocárdio;
- 5) **Objetivo:** Avaliar a contribuição da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático nos fenômenos relativos às memórias contráteis; **Procedimento:** Foram realizados experimentos nos quais se comparou as manifestações das memórias contráteis antes e após incubar o tecido miocárdico com cafeína (5 ou 10 mM); **Hipótese:** É sabido que a cafeína é um alcalóide capaz de promover a liberação do cálcio que se encontra estocado no retículo sarcoplasmático. Este cálcio é usado para promover todos os fenômenos relativos à contração celular podendo, assim, interferir com o fenômeno das memórias contráteis.

4.7 Estratégia experimental para avaliar a ação de substâncias sobre a expressão e a acumulação das memórias

Para avaliar a ação de substâncias sobre os processos de expressão e de acumulação de MD e ME, a preparação foi submetida a um procedimento experimental constituído por quatro fases, a saber:

1) Estabilização: o átrio, inicialmente estirado para uma tensão de repouso de 10 mN, permaneceu na cuba para órgão isolado, oxigenado e estimulado ritmicamente a uma frequência de 1 Hz. Neste período, que durou aproximadamente 1 hora, a preparação teve oportunidade para se adaptar às condições de temperatura do banho ($27 \pm 0,1$ °C) e à composição da solução nutritiva;

2) Controle: nesta fase foram executados os protocolos de Seed-Walker-Shimizu, bem como o de Conde Garcia visando estudar os processos de expressão e de acumulação das memórias depressora e excitadora do miocárdio atrial de cobaia;

3) Intervenção: nessa fase a preparação foi submetida à ação do agente estudado (drogas e substâncias) e sua duração variou de 10 a 20 minutos;

4) Teste: na presença do agente estudado, foram repetidos os protocolos Seed-Walker-Shimizu (S&W/SMZ), bem como o de Conde Garcia (CG), a fim de estudar os processos de expressão e de acumulação das memórias (Fig. 15).

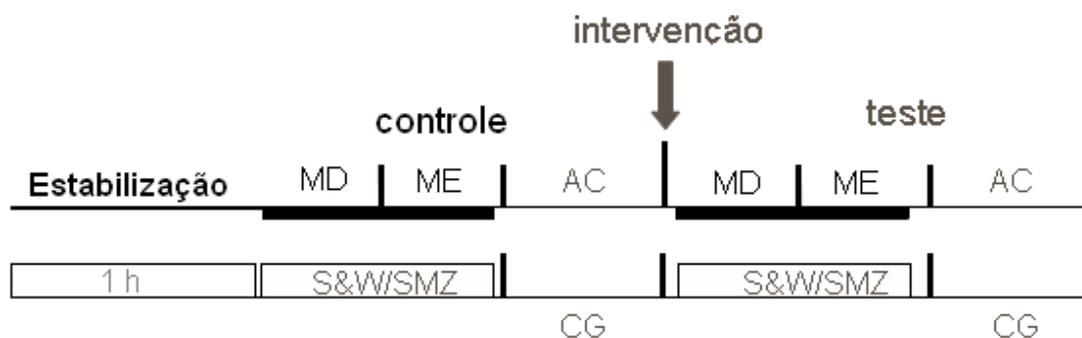


Figura 25 - Estratégia experimental usada para estudar a expressão e a acumulação das memórias do miocárdio atrial de cobaia. Após o período de estabilização o átrio foi submetido ao protocolo de Seed-Walker-Shimizu (S&W/SMZ) para determinar a expressão da MD e ME. Em seguida, o miocárdio foi submetido ao protocolo de Conde Garcia (CG) para determinar a acumulação (AC) das memórias. Esses protocolos foram realizados tanto na fase controle, como após a intervenção sob estudo ($27 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms, 400 V, 1 Hz)

4.8 Processamento e análise dos dados experimentais

4.8.1 Softwares utilizados

O pacote do Microsoft Office Professional 2003 foi usado para textos (WORD), tabulação de dados e confecção de gráficos (EXCEL) e para criar a apresentação (POWER POINT).

O software para gerenciar o conversor analógico-digital foi o WINDAQ PRO ACQUISITION (DATAQ, Akron, Ohio, EUA) e para reproduzir e auxiliar na análise os dados experimentais gravados em computador foi o WINDAQ EX (DATAQ, Akron, Ohio, EUA).

Para o processamento das forças atriais, de forma a determinar suas amplitudes, foram selecionados trechos de interesse do experimento. Os arquivos foram salvos como arquivo com formato texto. Em seguida, esses arquivos foram submetidos ao software PREPARATOR, a fim de estruturá-lo de acordo com o padrão de entrada requerido pelo software CONEXON. O CONEXON, ao operar sobre os arquivos gerados pelo PREPARATOR, produziu uma tabela contendo, além das amplitudes das forças, outros

parâmetros contráteis. Com ela foi possível construir os gráficos referentes aos protocolos de Seed-Walker-Shimizu e de Conde Garcia.

Os softwares PREPARATOR e CONEXON estão registrados no Cartório do 10o. Ofício, Títulos e Documentos e Pessoas Jurídicas, Aracaju, Sergipe e está depositado, sob o número 00051104, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Governo Federal, Brasília, Brasil. Ambos são de autoria do Prof. Dr. Eduardo Antonio Conde Garcia.

4.8.2 Análise Estatística

A decisão sobre a diferença entre valores médios foi feita com o teste ANOVA 'one-way' ("General Linear Model", MINITAB), seguido do teste de Tukey. O nível de significância para rejeitar a hipótese de igualdade entre as médias, foi $p < 0,05$. Os dados apresentados estão na forma de média \pm desvio padrão. Onde coube, foi usado o Teste t de Student para dados pareados, a fim de decidir sobre diferença entre valores médios.

5 RESULTADOS

5.1 O miocárdio atrial aprende a trabalhar, trabalhando

5.1.1 – O miocárdio atrial aprende: exemplo de resultado experimental

A Fig. 16 ilustra o comportamento do miocárdio atrial de cobaia, isolado do animal e mantido por 30 minutos em repouso e a temperatura de $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. A preparação permaneceu imersa em solução de Tyrode que foi oxigenada e teve o seu pH equilibrado por uma mistura carbogênica. Este tempo foi dado ao átrio para que ele se adaptasse às novas condições de temperatura, osmolaridade e suprimento energético presentes no banho, antes de iniciar o trabalho de contração sob estimulação elétrica artificial. Com o início da estimulação a uma frequência de 1 Hz, a força atrial aumentou o seu pico sistólico de 0 para 1122 mgf, em cerca de 60 s. Em seguida, ela lentamente reduziu-se, até alcançar um equilíbrio com amplitude de 831 mgf, cerca de 20 minutos depois (Tabela 2). Durante o período de adaptação, a tensão diastólica da preparação, isto é, a contratatura miocárdica presente no estado de repouso, diminuiu progressivamente, até alcançar um equilíbrio, cerca de 20 minutos após iniciada a estimulação. Quando isso foi alcançado, o átrio havia relaxado 72,6 mgf, em relação à tensão de repouso inicial (Tabela 3).

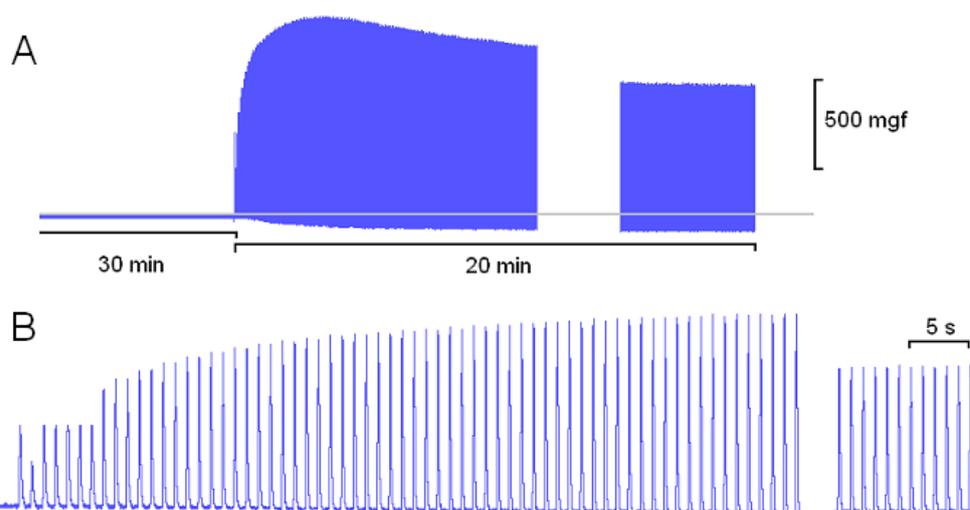


Figura 16 – Experimento representativo sobre a adaptação do átrio esquerdo às condições experimentais a ele impostas. Em A: a preparação permaneceu quiescente por 30 minutos, quando então a estimulação elétrica do tecido foi iniciada. Observou-se que a força sistólica cresceu rapidamente, para decair até alcançar um equilíbrio cerca de 20 min depois. A tensão diastólica mínima ou relaxamento máximo, por sua vez, diminuiu progressivamente, indicando um maior relaxamento diastólico que se estabilizou 72,6 mgf abaixo da tensão de repouso original. Em B: está mostrada a variação da amplitude da força durante os primeiros segundos depois de ligada a estimulação (Tyrode; $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.1.2 Tabulação dos resultados referentes ao experimento da Fig. 16

Tabela 2 – Evolução temporal da amplitude da força sistólica durante a fase de adaptação às condições experimentais

Tempo (s)	Força sistólica (mgf)
0	0
5	587
10	765
15	851
20	930
25	970
30	1003
35	1023
40	1049
45	1075
50	1089
55	1108
60	1122
65	1122
.....
1200	831

Tabela 3 – Evolução temporal do relaxamento diastólico durante a fase de adaptação do miocárdio às condições experimentais

Tempo (s)	Relaxamento diastólico (mgf)
0	0
50	26,4
100	46,2
150	52,8
200	59,4
250	59,4
300	59,4
.....
1100	85,5
1150	85,5
1200	85,5

5.2 Ferramentas para avaliar as memórias contráteis

5.2.1 Ferramenta para avaliação da Memória Depressora: Protocolo de SEED & WALKER

5.2.1.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

A Fig. 17 mostra, no traçado superior, sete curvas de força de contração atrial. Elas estão superpostas e contêm, cada uma, contrações rítmicas denominadas de contrações-controle, seguidas por extrassístoles, cujos intervalos de acoplamento com a contração precedente foram aumentados de 300 (traçado 1) para 900 ms (traçado 7). O experimento mostra que a amplitude da força da contração extrassistólica aumentou até alcançar um valor máximo. Este aumento ocorreu à medida que o IAEx se tornou maior. Os traçados inferiores, numerados à esquerda de 1 a 7, mostram o protocolo de estimulação usado para cada um dos registros.

Neles, inicialmente, podem ser vistas apenas quatro estimulações-controle, mostradas como pequenos traços orientados para baixo e distanciados temporalmente por um período constante de 1000 ms. Nesta figura, após o quarto artefato de estímulo, veem-se o artefato correspondente à estimulação extrassistólica. Eles se iniciam com um período de acoplamento de 300 ms (curva 1) o qual, a cada teste, foi aumentado até alcançar 900 ms (curva 7). O que está mostrado nesta figura representa um conjunto típico de registros necessários para que a Curva de Restituição Mecânica (CRM) atrial seja determinada. A CRM refere-se à curva de variação da amplitude da contração extrassistólica produzida por diferentes IAEx.

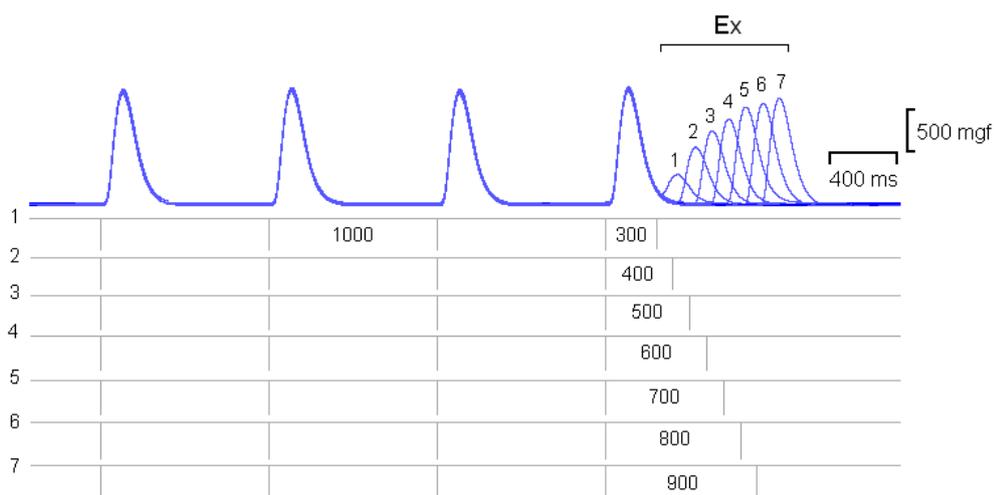


Figura 17 - Esquema do experimental usado para determinar a Curva de Restituição Mecânica do miocárdio de cobaia. O traçado superior mostra sete curvas de forças de contração superpostas. Elas foram obtidas em átrio de cobaia estimulado ritmicamente e submetidos a pulsos extrassistólicos com IAEx variável de 300 a 900 ms. Os traçados inferiores, referenciados pelos número de 1 a 7, mostram o esquema de pulsos de estimulação usado ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.2.1.2 Tabulação dos resultados referentes ao traçado experimental típico mostrando na Fig. 17.

Tabela 4 – Tabulação dos dados referentes à evolução da amplitude das extrassístoles produzidas com diferentes IAEx

IAEx (ms)	Amplitude da extrassístole (mgf)	Amplitude da extrassístole (% do controle)
Controle	1404	100
300	390	28
400	717	51
500	904	64
600	1045	74
700	1185	84
800	1232	88
900	1294	92

5.2.1.3 Determinação da Curva de Restituição Mecânica média do átrio

Para que fosse determinada a CRM média do átrio esquerdo de cobaia, foram realizados experimentos em diferentes preparações, usando-se o protocolo experimental de Seed & Walker (1988). A Fig. 18 mostra o resultado desses experimentos. Nela se pode ver que a amplitude da força extrassistólica aumentou à medida que o IAEx cresceu de 275 ms para 925 ms. Este aumento reflete a redução progressiva do IKMD. Assim, no IAEx mais curto a quantidade de MD presente na contração era muito elevada e, por isto, a amplitude da extrassístole foi pequena. Porém, com o passar do tempo, isto é, à medida que o IAEx aumentou, o IKMD foi diminuindo progressivamente.

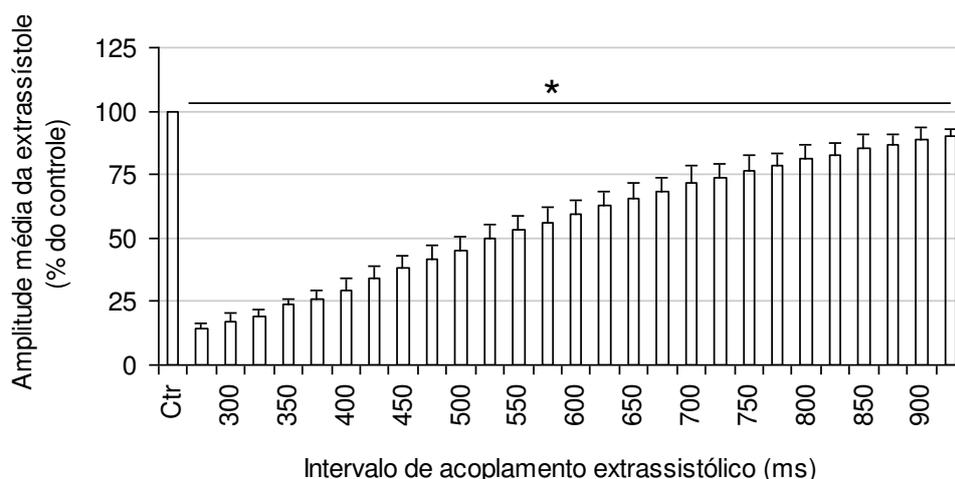


Figura 18 – Curva de Restituição Mecânica média do átrio esquerdo de cobaia para extrasístoles com intervalos de acoplamento entre 275 a 925 ms. A amplitude da força no controle foi normalizada percentualmente ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz; $n = 4$; $*p < 0,0001$).

5.2.1.4 Avaliação da variação temporal do Incremento de Carga de Memória Depressora, visando estudar a sua expressão e a velocidade do seu apagamento

A Fig. 19 mostra o comportamento de como varia a carga de memória depressora em função do tempo dado pelos diferentes IAEx. O experimento foi realizado em átrio mantido em situação-controle. Os valores determinados para IKMDmax e VmedAMD foram, respectivamente: $83,00 \pm 3,25\%$ e $-1,65 \pm 0,35$ gf/s, considerando que, no intervalo de 600 ms, a KMD diminuiu de $1,111 \pm 0,244$ gf (IAEx = 300 ms) para $0,122 \pm 0,079$ gf (IAEx = 900 ms).

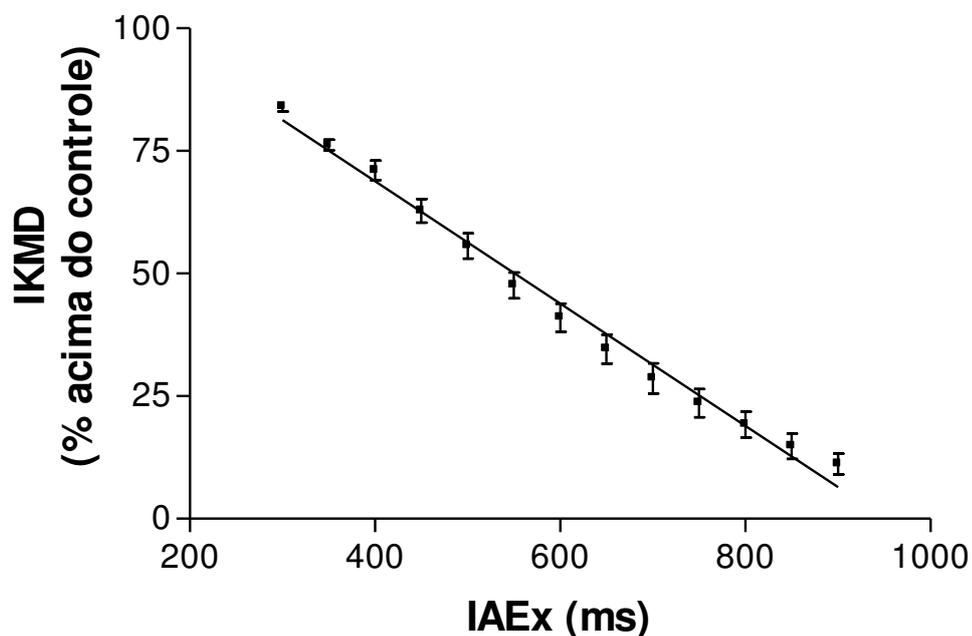


Figura 19 – Variação do IKMD em função do tempo ($n = 4$; $p < 0,0001$ para todas as comparações com o valor de IKMD no IAEx de 300 ms; $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.2.2 Ferramenta para avaliar a expressão da memória excitadora: Protocolo de SEED & WALKER / SHIMIZU

5.2.2.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

A Fig. 20 mostra, no traçado superior, oito curvas de força de contração que foram montadas de forma superposta. No início de cada registro, os átrios de cobaia estavam se contraindo de forma rítmica, porque foram comandados com estimulação supraliminar com período de 1000 ms. As extrassístoles foram produzidas com estímulos extraordinários com IAEx variando de 200 a 900 ms (registros de 1 a 8). Este experimento, além do clássico fenômeno do aumento da amplitude da extrassístole (Ex de 1 a 8) observado com o aumento do IAEx, mostrou também que a amplitude da

1a.CPEx sofreu variação. A Tabela 5 resume os valores numéricos referentes a cada um dos traçados deste experimento. Nela se pode ver que, nas condições experimentais em que se encontrava o átrio, houve um intervalo de acoplamento ótimo, aqui definido como sendo o intervalo de acoplamento capaz de gerar a contração pós-extrassistólica de maior amplitude. No caso mostrado na Fig. 20, este intervalo foi de 300 ms.

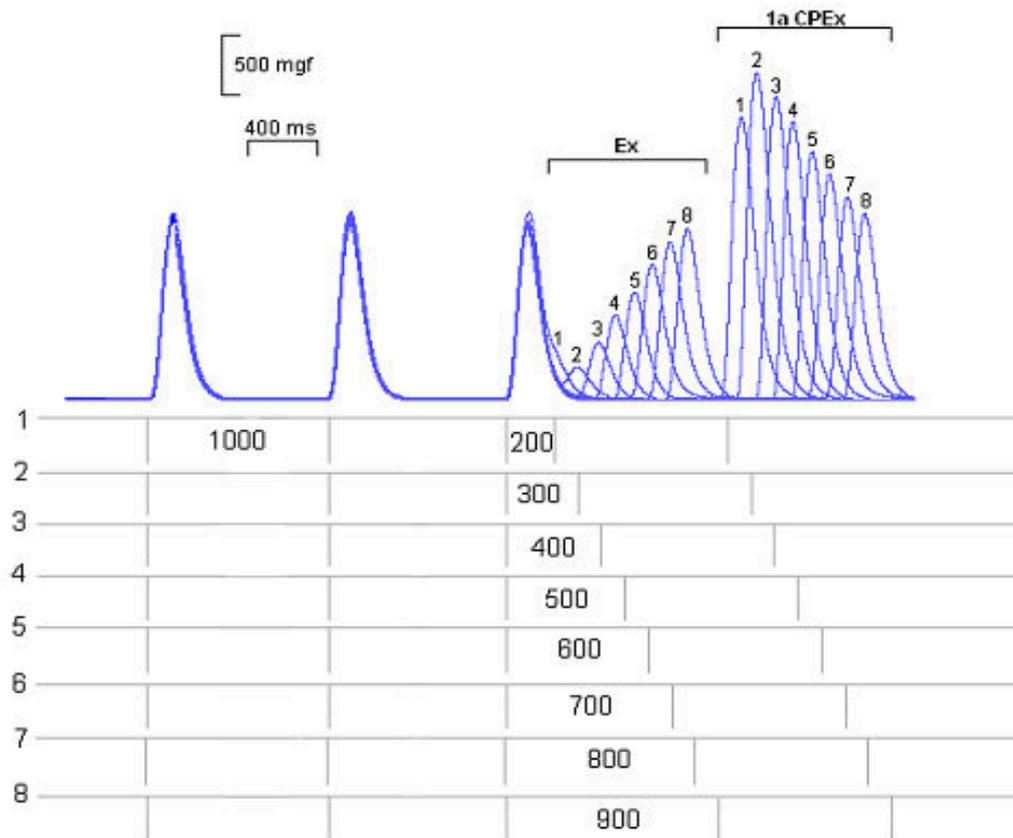


Figura 20 - Esquema do protocolo experimental usado para avaliar as variações de amplitude da 1aCPEx decorrentes dos aumentos dos intervalos de acoplamento extrassistólicos. O traçado superior mostra curvas de forças de contração obtidas em átrio esquerdo de cobaia, que foi estimulado ritmicamente (1000 ms) até o momento em que foram aplicados estímulos extrassistólicos com IAEx progressivamente crescentes (200 – 900 ms, traçados de 1 a 8). Os traçados inferiores foram montados para explicar o protocolo de estimulação usado. Note-se que o aumento do intervalo de acoplamento produziu extrassístoles com amplitudes crescentes (1 a 8) e gerou contrações pós-extrassistólicas cuja amplitude máxima foi alcançada no IAEx de 300 ms (protocolo 2) ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.2.2.2 Tabulação dos resultados referentes ao traçado experimental típico mostrado na Fig. 20

Tabela 5 – Tabulação dos dados referentes à evolução da amplitude da 1ª.CPEx produzida com diferentes IAEx (Fig. 20)

IAEx (ms)	Amplitude da 1ª contração pós-extrassistólica (mgf)	Amplitude da 1ª contração pós-extrassistólica (% acima do controle)
200	2289	64
300	2657	90
400	2457	76
500	2263	62
600	2013	44
700	1855	31
800	1644	17
900	1420	08

Amplitude da força controle: 1394 mgf

5.2.2.3 Avaliação da variação temporal do Incremento de Carga de Memória Excitadora, visando estudar a sua expressão e a velocidade do seu apagamento

A Fig. 21 mostra o comportamento do incremento de carga de memória excitadora em função do tempo. O experimento foi realizado em átrio mantido em situação-controle. Os valores determinados para IKME_{max} e VmedAME foram, respectivamente: $87,00 \pm 4,91\%$ e $-1,81 \pm 0,40$ gf/s, considerando que, no intervalo de 500 ms, a KME diminuiu de $1,078 \pm 0,299$ (IAEx = 400 ms) para $0,172 \pm 0,117$ gf (IAEx = 900 ms).

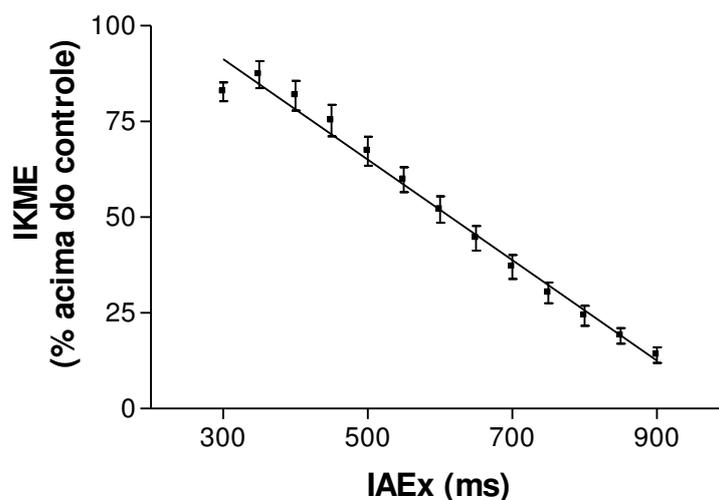


Figura 21 – Variação do IKME em função de diferentes IAEEx. A extrasístole correspondente ao IAEEx de 350 ms elicitou uma contração pós-extrasístole com amplitude máxima ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz; $n = 4$; $p < 0,0001$ para todas as comparações com o valor de IKME no IAEEx de 300 ms).

5.2.3 Avaliação da contribuição de contrações condicionantes para o processo de acumulação das memórias depressora e excitadora: Protocolo experimental usado: CONDE-GARCIA

5.2.3.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

As Figs. 22 a 26 mostram traçados de força de contração obtidos em átrios de cobaia submetidos ao protocolo experimental proposto por Conde-Garcia. Este protocolo foi idealizado para avaliar a contribuição do número de contrações que precedem a extrasístole para a formação da memória depressora e da memória excitadora no miocárdio atrial de cobaia. Essas contrações precedentes serão doravante denominadas de Contrações Condicionantes (CCond). A avaliação de MD e ME foi feita analisando-se as respostas extrasistólicas (Ex) e a 1a.CPEEx, respectivamente, nos diferentes IAEEx (200 a 900 ms). As Tabelas 6 a15 mostram medidas de IAEEx e forças referentes aos experimentos das Figs. 22 a 26.

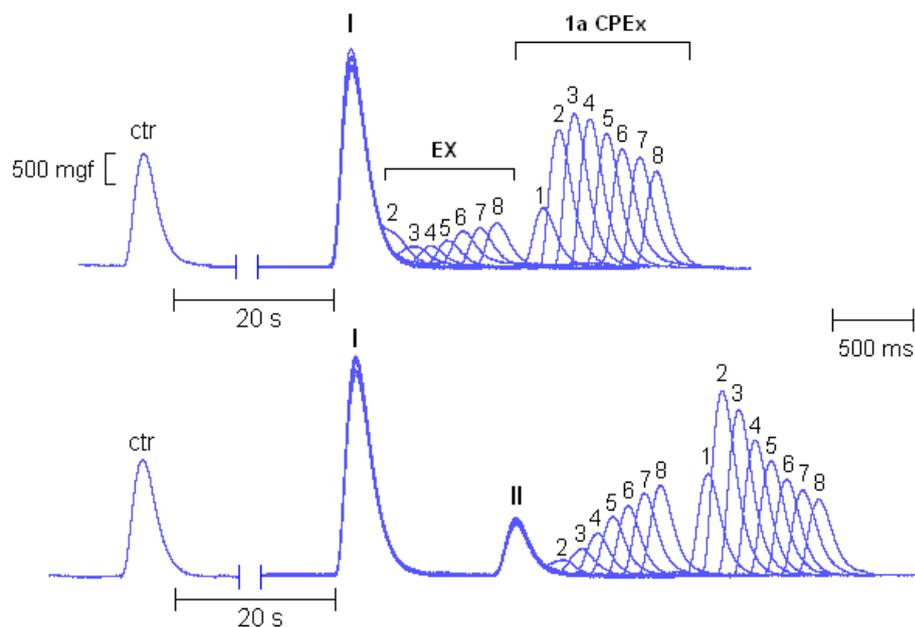


Figura 22 – Influência do número de CCond (I-II) sobre a acumulação da MD e ME. Cada painel foi construído superpondo-se os traçados experimentais correspondentes aos diferentes IAEx. Painel superior: evolução da amplitude da extrasístole e da 1aCPEx em função de cada IAEx condicionada por uma contração condicionante (I). Painel inferior: evolução da amplitude da extrasístole e da 1aCPEx, em função de cada IAEx, condicionada por duas contrações condicionantes (I e II) ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

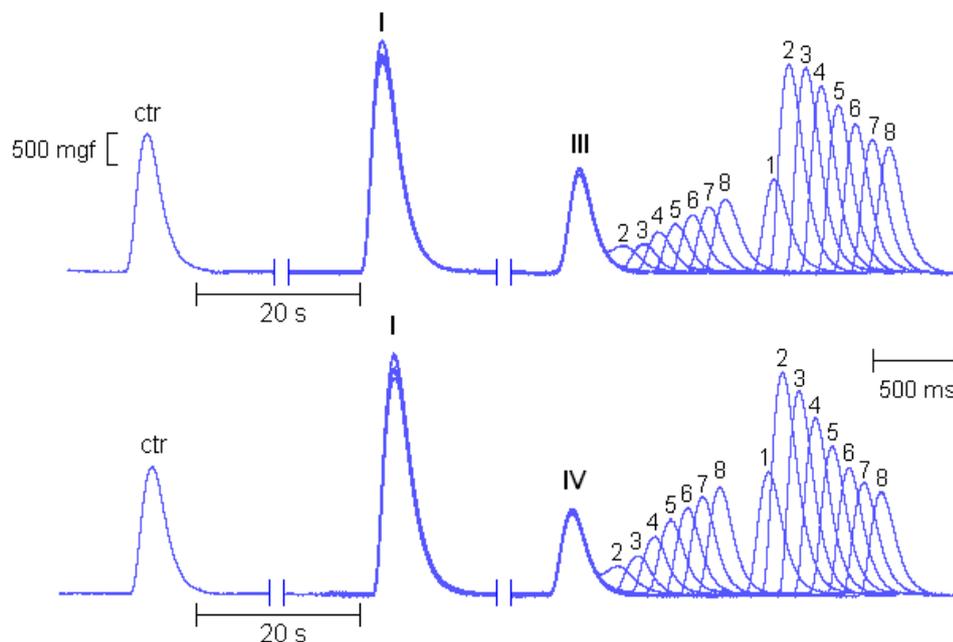


Figura 23 - Influência do número de CCond (III-IV) sobre a acumulação da MD e ME. Cada painel foi construído superpondo-se os traçados experimentais correspondentes aos diferentes IAEx. Painel superior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEx, em função de cada IAEx, condicionada por três contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e III. Painel inferior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEx em função de cada IAEx condicionada por quatro contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e IV ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

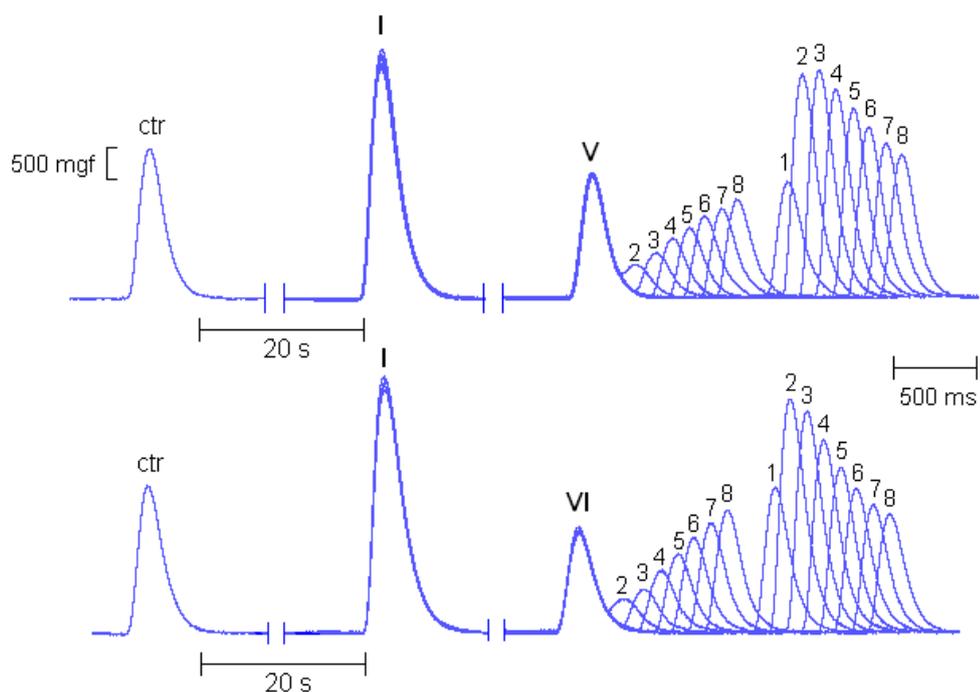


Figura 24 - Influência do número de CCond (V-VI) sobre a acumulação da MD e ME. Cada painel foi construído superpondo-se os traçados experimentais correspondentes aos diferentes IAEx. Painel superior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEX, em função de cada IAEx, condicionada por cinco contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e V. Painel inferior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEX em função de cada IAEx condicionada por seis contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e VI ($27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

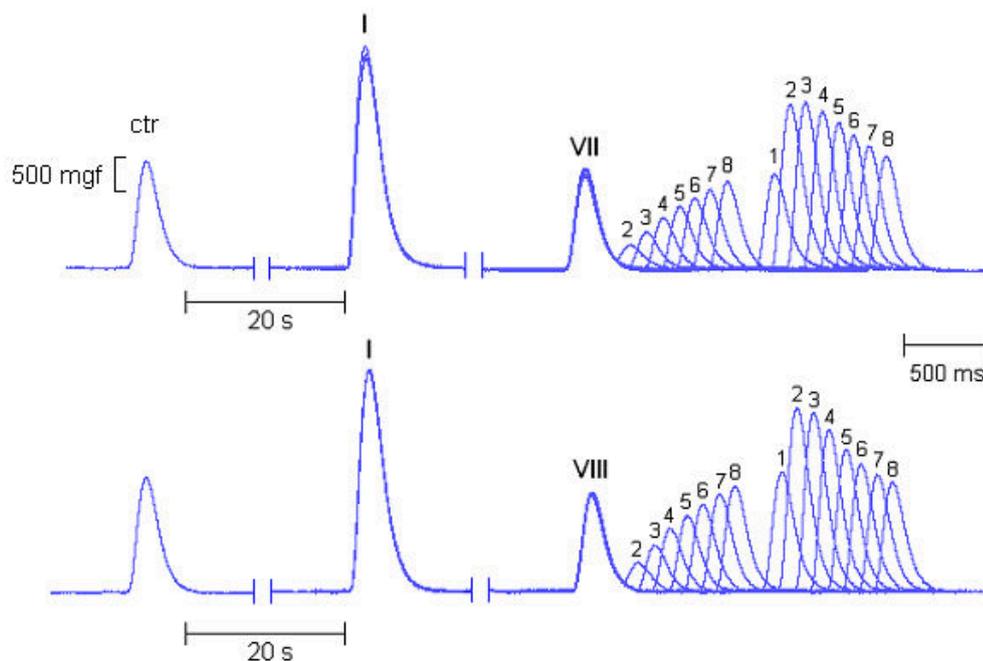


Figura 25 - Influência do número de CCond (VII-VIII) sobre a acumulação da MD e ME. Cada painel foi construído superpondo-se os traçados experimentais correspondentes aos diferentes IAEx. Painel superior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEx, em função de cada IAEx, condicionada por sete contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e VII. Painel inferior: evolução da amplitude da extrassístole e da 1aCPEx em função de cada IAEx condicionada por oito contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e VIII ($27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

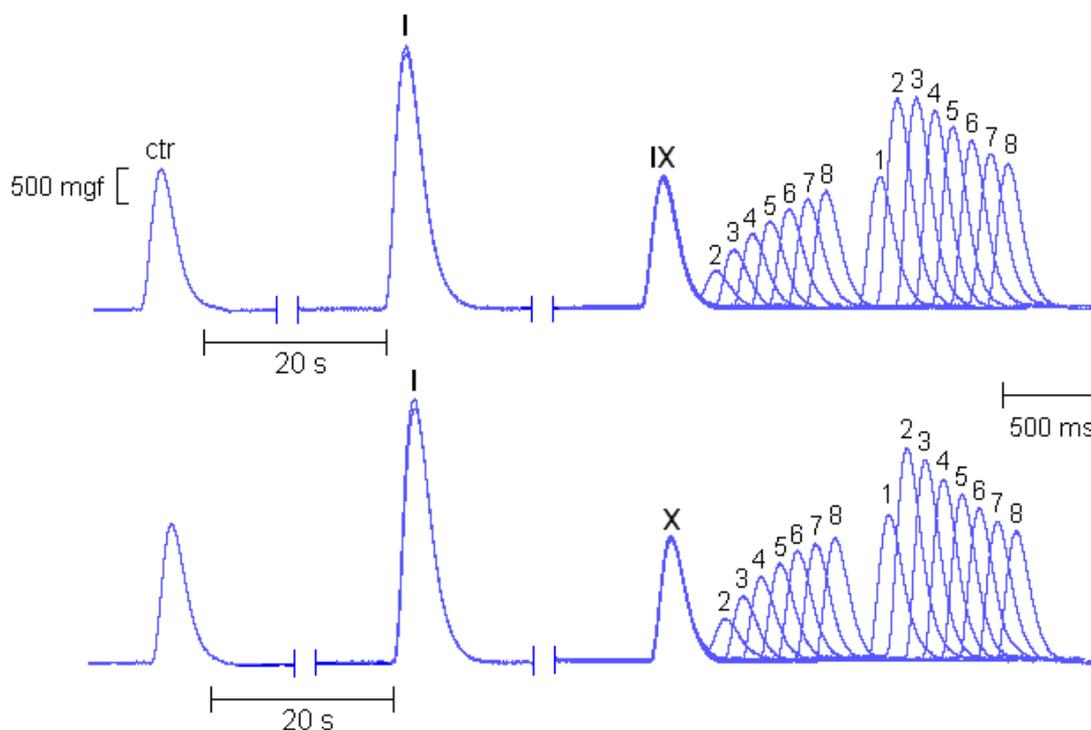


Figura 26 - Influência do número de CCond (IX-X) sobre a acumulação da MD e ME. Cada painel foi construído superpondo-se os traçados experimentais correspondentes aos diferentes IAEx. Painel superior: evolução da amplitude da extrasístole e da 1aCPEx, em função de cada IAEx, condicionada por nove contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e IX. Painel inferior: evolução da amplitude da extrasístole e da 1aCPEx em função de cada IAEx condicionada por dez contrações condicionantes. Estão mostradas as CCond I e X ($27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.2.3.2 Tabulação dos dados referentes aos traçados experimentais mostrados como exemplo da variação de amplitude da resposta extrassistólica em função do intervalo de acoplamento extrassistólico e do número de contrações condicionantes: procedimento para avaliar a acumulação da memória depressora

Tabela 6 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassistóles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com uma CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassistóle (mgf)	Extrassistóle (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
1	Contr	1825	100	1825	100
1	200			950	52
1	300	180	10	2200	120
1	400	325	18	2500	137
1	500	325	18	2375	130
1	600	425	23	2150	118
1	700	575	31	1900	104
1	800	625	34	1750	96
1	900	700	38	1550	85

Contr: controle

Tabela 7 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassistóles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com duas CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassistóle (mgf)	Extrassistóle (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
2	Contr	1875	100	1875	100
2	200			1675	89
2	300	250	13	3025	161
2	400	450	24	2700	144
2	500	700	37	2225	118
2	600	975	52	1875	100
2	700	1150	61	1575	84
2	800	1350	72	1400	75
2	900	1475	79	1250	66

Tabela 8 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com três CCond

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
3	Contr	2200	100	2200	100
3	200			1475	67
3	300	425	19	3275	149
3	400	450	20	3250	157
3	500	650	29	2950	134
3	600	750	34	2650	120
3	700	900	41	2350	107
3	800	1025	46	2100	95
3	900	1150	52	1975	89

Contr: controle

Tabela 9 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com quatro CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
4	Contr	2025	100	2025	100
4	200			1950	96
4	300	450	22	3525	174
4	400	600	29	3225	159
4	500	900	44	2800	138
4	600	1100	54	2375	117
4	700	1375	68	2025	100
4	800	1550	76	1775	87
4	900	1450	84	1625	80

Contr: controle

Tabela 10 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com cinco CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
5	Contr	2350	100	2350	100
5	200			1825	77
5	300	525	22	3525	150
5	400	725	31	3600	153
5	500	950	40	3300	140
5	600	1100	47	2975	126
5	700	1275	54	2700	115
5	800	1425	60	2450	104
5	900	1550	66	2250	96

Contr: controle

Tabela 11 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com seis CCond

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
6	Contr	2350	100	2350	100
6	200			2325	99
6	300	550	23	3700	157
6	400	700	30	3525	150
6	500	1000	42	3075	131
6	600	1250	53	3625	154
6	700	1525	65	2300	98
6	800	1750	74	2050	87
6	900	1950	83	1900	81

Contr: controle

Tabela 12 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com sete CCond

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
7	Contr	1575	100	1575	100
7	200			1400	89
7	300	350	22	2400	152
7	400	550	35	2450	156
7	500	750	48	2325	148
7	600	925	59	2150	136
7	700	1050	67	1975	125
7	800	1175	75	1800	114
7	900	1275	81	1650	105

Contr: controle

Tabela 13 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com oito CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
8	Contr	1700	100	1700	100
8	200			1775	104
8	300	475	28	2725	160
8	400	725	43	2675	157
8	500	975	57	2400	141
8	600	1150	68	2125	125
8	700	1300	76	1925	113
8	800	1475	87	1750	103
8	900	1575	93	1650	97

Contr: controle

Tabela 14 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com nove CCond

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
9	Contr	1950	100	1950	100
9	200			1850	95
9	300	525	27	2950	151
9	400	800	41	2975	152
9	500	1050	54	2800	143
9	600	1200	61	2575	132
9	700	1400	72	2375	122
9	800	1550	79	2175	111
9	900	1650	84	2025	104

Contr: controle

Tabela 15 – Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles e das 1as.CPEx, induzidas com diferentes IAEx e com dez CCond.

CCond	IAEx (ms)	Extrassístole (mgf)	Extrassístole (% do controle)	1a.CPEx (mgf)	1a.CPEx (% do controle)
10	Contr	2000			
10	200			2125	106
10	300	650	32	3075	154
10	400	975	49	2900	145
10	500	1250	62	2625	131
10	600	1425	71	2425	121
10	700	1600	80	2225	111
10	800	1700	85	2025	101
10	900	1800	90	1900	95

Contr: controle

5.2.3.3 Efeito das contrações condicionantes sobre o processo de acumulação das memórias depressora e excitadora

5.2.3.4 Contrações condicionantes versus acumulação de memória depressora

Na Fig. 27 estão representados os resultados obtidos com 1, 9 e 10 CCond. O gráfico mostra que o IKMD presente na extrassístole gerada com um IAEx de 400 ms sofreu uma diminuição com o aumento do número de CCond de 1 para 9. Assim, o IKMDmax foi reduzido de $82,22 \pm 0,68$ para $63,07 \pm 2,39$ % ($n = 4$; $p < 0,05$). A VmedAMD não se modificou com a elevação de 1 para 9 no número de CCond empregadas, posto que, com 1 CCond ela foi $-1,07 \pm 0,24$ gf/s e com 9 CCond foi $-1,58 \pm 0,30$ gf/s ($n = 4$, $p > 0,05$). Nas condições experimentais do presente teste, não se pôde observar modificação significativa nem no IKMD nem na VmedAMD, quando o número de CCond foi maior do que 9. Para maior clareza, foram representados apenas os resultados extremos obtidos com 01 CCond e 9 CCond. Os dados com 10 CCond foram também mostrados na Fig. 27 para ilustrar que, a partir de 9 CCond, não houve mais variação.

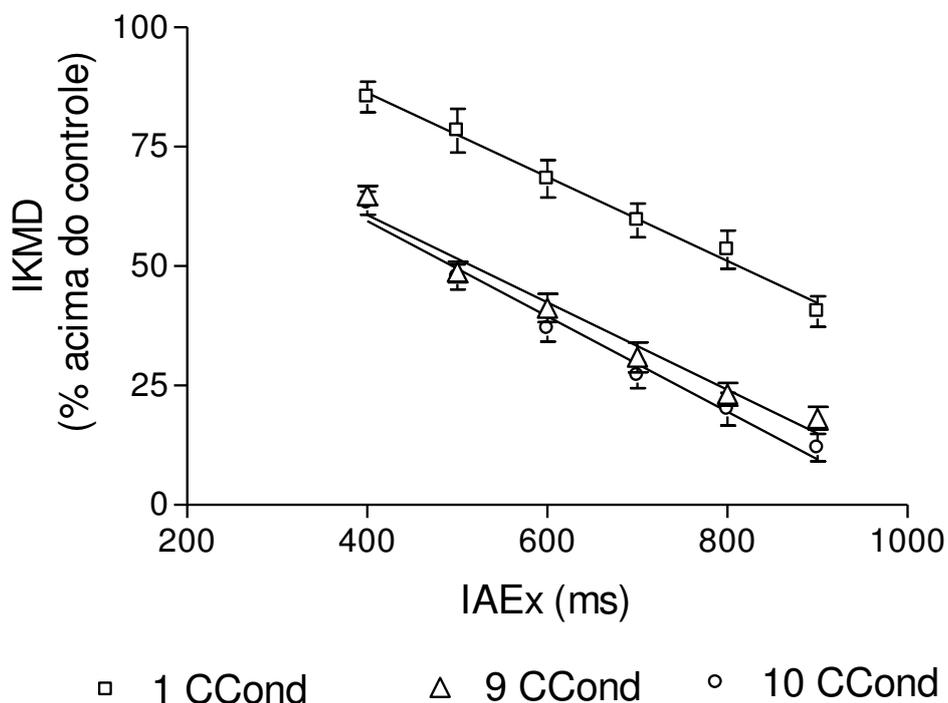


Figura 27 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEEx e do número de CCond. A elevação do número de CCond de 1 para 9 reduziu o IKMD ($n = 4$; $p < 0,05$), porém manteve constante a VmedAMD ($n = 4$; $p > 0,05$). Um número de CCond acima de 9 não modificou adicionalmente os descritores de MD ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.2.3.5 Contrações condicionantes versus acumulação de memória excitadora

Para avaliar a importância do número de contrações no desenvolvimento de ME, a preparação biológica foi pré-condicionada com 1 ou com 9 CCond, sendo então obtidos os valores dos descritores da ME. A Fig. 28 mostra que o IKME_{max} aumentou significativamente com a elevação do número de CCond de 1 para 9, passando de $37,90 \pm 7,71$ para $58,63 \pm 10,28\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$). O IKME não se modificou com o pré-condicionamento feito com um número de CCond maior do que 9, sugerindo que este incremento de carga é um fenômeno que admite saturação.

A VmedAME, contudo, não se alterou com a elevação do número de CCond. Isto pôde ser demonstrado pela inclinação das retas de ajustamento das amplitudes das 1a.CPEx correspondentes aos diferentes IAEx empregados (400 – 900 ms), indicando que o apagamento da ME é um fenômeno que independe do pré-condicionamento contrátil da preparação. A Fig. 28 mostra que estas retas aplicadas a diferentes pré-condicionamentos, tiveram a mesma inclinação, pois os coeficientes angulares médios foram $-0,96 \pm 0,15$ e $-1,06 \pm 0,21$ gf/s, respectivamente, para 1 e 9 CCond ($n = 6$; $p > 0,05$). Nas condições experimentais do presente teste, não se pôde observar modificação na VmedAME, quando o número de CCond foi maior do que 9. Para maior clareza, foram representados apenas os resultados extremos obtidos com 01 CCond e 9 CCond. Os dados com 10 CCond foram também mostrados na Fig. 28 para ilustrar que, a partir de 9 CCond, não houve mais variação.

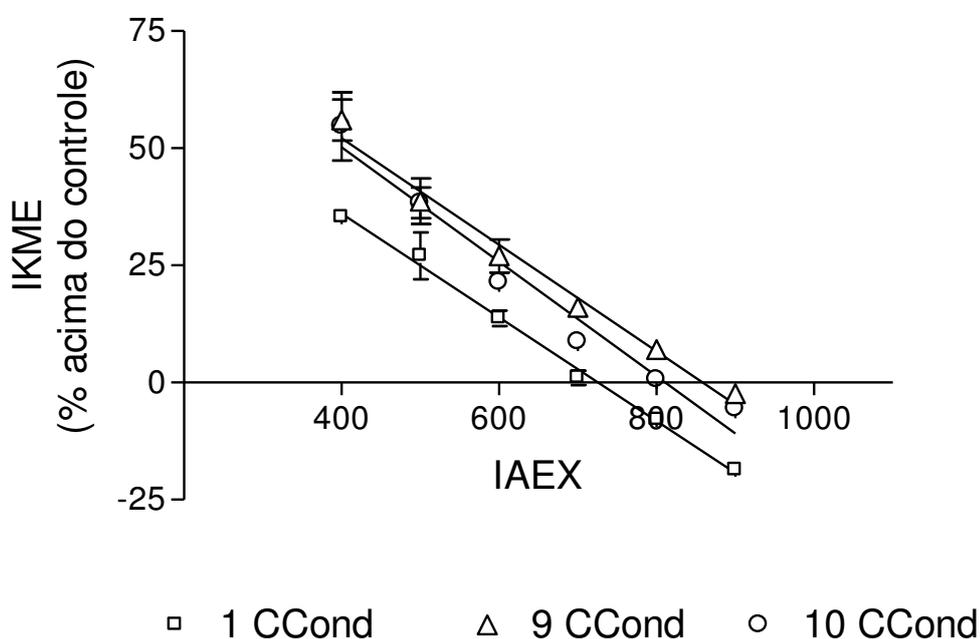


Figura 28 - Incremento de carga de ME em função do IAEx e do número de CCond. O IKME_{max} foi determinado no IAEx de 400 ms e seu valor aumentou de $37,90 \pm 7,71$ para $58,63 \pm 10,28\%$ com a elevação de 1 para 9 CCond ($n = 6$, $p < 0,05$). As retas de ajustamento apresentaram inclinações que foram estatisticamente iguais (1 CCond: $-0,96 \pm 0,15$; 9 Ccond: $-1,06 \pm 0,21$ gf/s; $n = 6$; $p > 0,05$). Experimentos com CCond acima de 9 não modificaram adicionalmente os descritores ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 1 Hz; 0,5 ms; 400 V).

5.3 Protocolo para avaliar o mecanismo de ação relativo às memórias

5.3.1 Avaliação do efeito do potássio extracelular na expressão e acumulação das memórias contráteis

5.3.1.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

A Fig. 29 demonstra o resultado de um experimento realizado em átrio esquerdo de cobaia submetido a duas diferentes concentrações de cloreto de potássio. Nas concentrações de 2,7 mM e 7,0 mM a resposta extrassistólicas pôde ser vista a partir do IAEEx de 300 ms (resposta 2), aumentando sua amplitude, progressivamente, de acordo com o aumento do IAEEx [400 (curvas 3), 500 (curvas 4), 600 (curvas 5), 700 (curvas 6), 800 (curvas 7), 900 (curvas 8)]. Porém, o estímulo aplicado no IAEEx de 200ms produziu manifestações na amplitude da primeira contração pós extrassistólica, indicando sua eficácia, além de indiretamente mostrar que a preparação respondeu ao estímulo precoce, porém a resposta não pôde ser visualizada em virtude de estar embutida na contração controle. Sob tais condições experimentais, a contração pós-extrassistólica de maior amplitude, nas duas concentrações de cloreto de potássio estudadas, foi registrada no IAEEx de 300 ms (curvas 2).

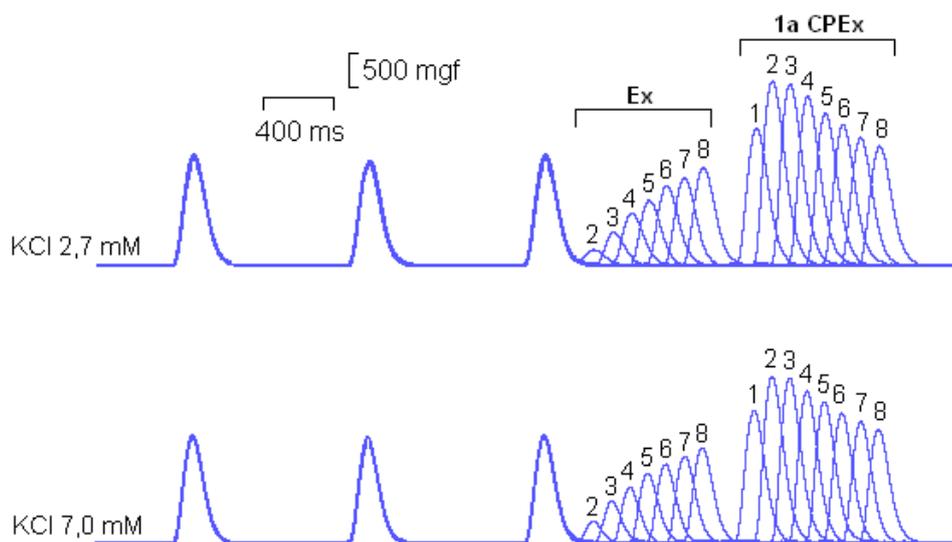


Figura 29 – Traçados referentes à resposta inotrópica do átrio em diferentes concentrações de potássio extracelular. Em cada concentração de potássio, foram avaliadas as amplitudes das extrasístoles e da primeira contração pós-extrasístole produzidas com diferentes intervalos de acoplamento (em ms: 200 (resposta não visualizada); 300 (curvas 2); 400 (curvas 3); 500 (curvas 4); 600 (curvas 5); 700 (curvas 6); 800 (curvas 7); 900 (curvas 8). A resposta extrasistólica, correspondente ao IAEx de 200 ms, não apareceu como onda isolada. A 1aCPEX de amplitude máxima ocorreu em 300 ms para as duas concentrações de potássio ($27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.1.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig. 29

Tabela 16 - Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles obtidas com diferentes IAEx na presença de concentrações variadas de potássio extracelular

IAEx (ms)	2,7 mM		7,0 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200				
300	200	12	325	20
400	475	29	600	38
500	750	46	825	52
600	925	57	1000	63
700	1150	71	1150	72
800	1275	79	1250	78
900	1425	88	1400	88
Controle	1625	100	1600	100

5.3.1.3 Tabulação dos dados referentes às 1as. CPEX vistas na Fig. 29

Tabela 17 – Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEX obtidas com diferentes IAEx na presença de concentrações variadas de potássio extracelular

IAEx (ms)	2,7 mM		7,0 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200	2000	123	1925	120
300	2650	163	2450	153
400	2625	161	2425	151
500	2475	152	2225	139
600	2200	135	2075	129
700	2050	126	1925	120
800	1850	114	1775	110
900	1725	106	1650	103
Controle	1625	100	1600	100

5.3.1.4 Efeito da concentração extracelular de potássio sobre a expressão e o apagamento das memória depressora

A Fig. 30 mostra o resultado final obtido em quatro átrios submetidos a duas concentrações distintas de cloreto de potássio (2,7 mM e 7,0 mM). Para avaliar o processo de expressão da MD, os átrios foram submetidos a protocolos visando determinar o IKMDmax e a VmedAMD nas diferentes concentrações. Todas as preparações biológicas estudadas apresentaram respostas inotrópicas semelhantes nas concentrações de 2,7 e 7,0 mM de cloreto de potássio, além disso, a extrassístole somente foi visualizada como uma contração isolada, quando o IAEx foi maior do que 300 ms ($n = 3$, $p > 0,05$). A elevação do potássio no banho de 2,7 para 7,0 mM não modificou nem a expressão, nem o apagamento de MD. Com relação à expressão da MD, o IKMDmax variou de $82,09 \pm 1,58$ para $81,56 \pm 2,01\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$), enquanto que os valores de VmedAMD diminuíram de forma não significativa de $-1,36 \pm 0,67$ para $-1,13 \pm 0,42$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$). Esses dados mostram que as alterações do potencial de repouso das células miocárdica, induzidas por diferentes concentrações de potássio extracelular, não modificaram a expressão das memórias contráteis.

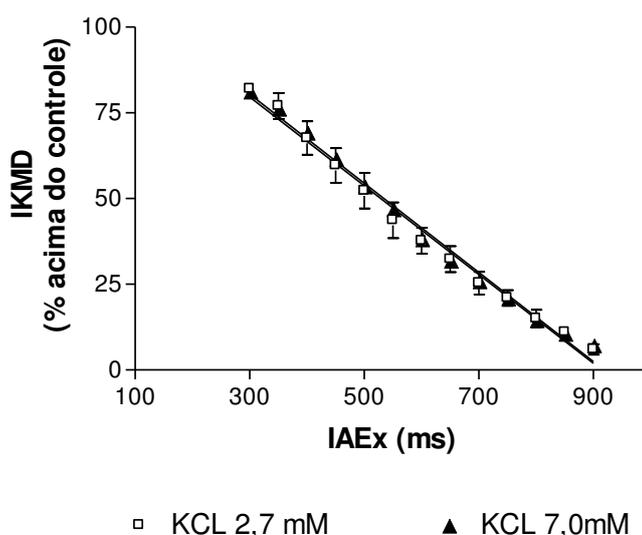


Figura 30 – Variação do IKMD e VmedAMD em função do IAEx e da concentração extracelular de potássio. Nas concentrações de 2,7 e 7,0 os descritores de MD não foram modificados (Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz; $n = 4$ átrios, $p > 0,05$).

5.3.1.5 Efeito da variação da concentração extracelular de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora

A Fig. 31 mostra o efeito da variação da concentração extracelular de potássio (2,7 e 7,0 mM) sobre os descritores de ME correspondente aos IAEx de 300 a 900 ms. A análise estatística mostrou que dentro de um mesmo IAEx, não houve diferença entre os valores médios obtidos com 2,7 e 7,0 mM. No que diz respeito à expressão e ao apagamento de ME, os resultados com potássio 2,7 e 7,0 mM foram o seguinte: o IKME_{max} variou de $83,36 \pm 0,56$ para $90,12 \pm 17,92\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$), enquanto que a VmedAME diminuiu, mas não significativamente, de $-2,09 \pm 1,65$ para $-1,56 \pm 1,41$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$).

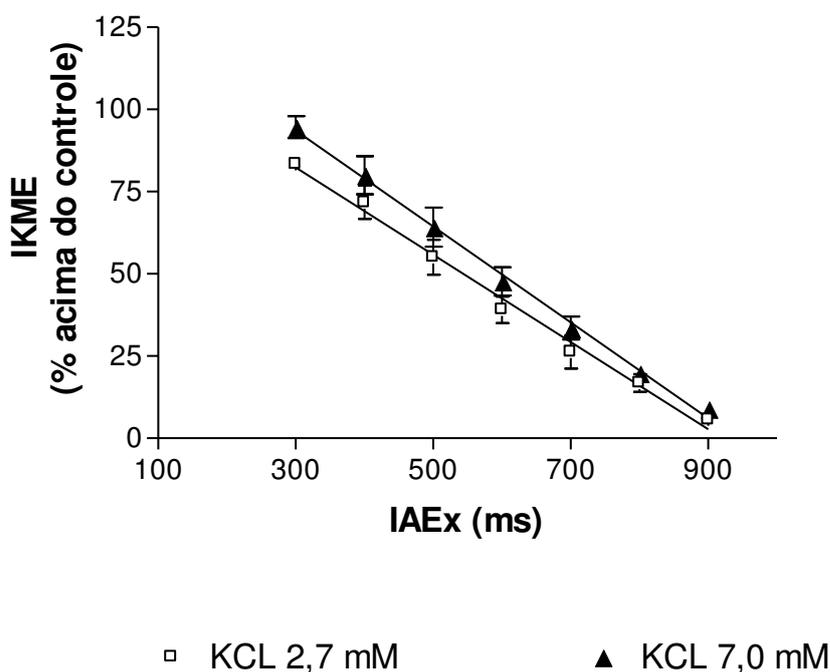


Figura 31 - Variação do IKME e VmedAME em função do IAEx e da concentração extracelular de potássio nas concentrações de 2,7 e 7,0 mM. Os descritores da ME não foram modificados ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.1.6 Efeito da concentração extracelular de potássio sobre o processo de acumulação das memórias

5.3.1.6.1 Concentração de potássio versus memória depressora

A Fig. 32 mostra o IKMD e a VmedAMD em função de três elementos variáveis: 1) o IAEx (300 a 900 ms), 2) o número de contrações condicionantes (1 ou 9) e 3) a concentração extracelular de potássio (2,7 ou 7,0 mM). O efeito da variação da corrente de saída de potássio sobre os descritores da MD, também foi estudado. Foram feitos experimentos nos quais se comparou os valores de IKMDmax e VmedAMD obtidos no controle ($[K^+] = 2,7$ mM) com aqueles medidos em elevada concentração de potássio externo ($K^+ = 7,0$ mM). Com 1 CCond (Painel A) a elevação do potássio de 2,7 para 7,0 mM na solução do banho, não alterou significativamente estas variáveis. O IKMDmax que era de $82,49 \pm 2,71$ diminuiu para $77,97 \pm 2,17\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$) e a VmedAMD variou de $-0,51 \pm 0,16$ para $-0,53 \pm 0,24$ gf/s ($n = 3$, $p > 0,05$). Com 9 CCond (Painel B), a elevação do potássio também não modificou significativamente essas variáveis, pois o IKMDmax que era de $61,21 \pm 3,76$ passou para $65,42 \pm 3,02\%$ ($n = 3$, $p > 0,05$) e o VmedAMD variou de $-0,58 \pm 0,24$ para $-0,53 \pm 0,15$ gf/s ($n = 3$, $p > 0,05$).

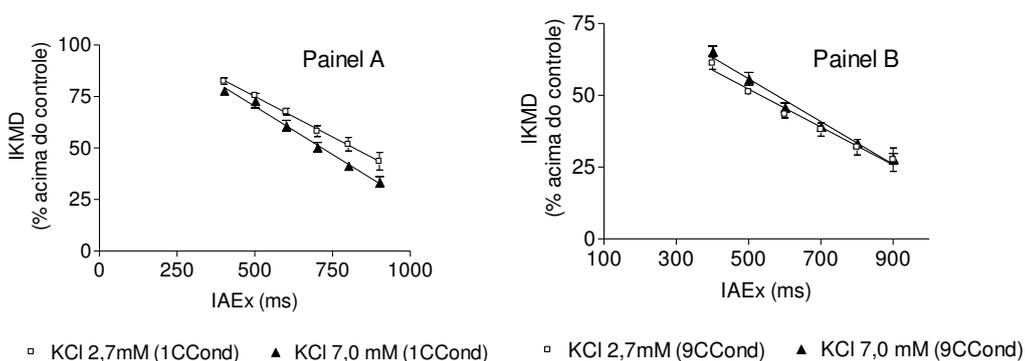


Figura 32 – Efeito da expressão e da VmedAMD em função do IAEx, do número de CCond e da concentração extracelular de potássio (2,7 e 7,0 mM). A análise estatística mostrou que o KCl não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.3.1.6.2 Concentração de potássio versus memória excitadora

A Fig. 33 mostra a variação da amplitude média da 1a.CPEx em função de três elementos variáveis: 1) o IAEx (400 a 900 ms), 2) o número de contrações condicionantes (1 ou 9) e 3) a concentração extracelular de potássio (2,7 ou 7,0 mM). O efeito da variação da corrente de saída de potássio produzido por alteração na concentração extracelular deste íon mostrou que, quando o potássio foi elevado de 2,7 para 7,0 mM, sob condicionamento com 1 CCond, o IKME_{max} variou de forma não significativa de $37,67 \pm 5,00$ para $33,00 \pm 12,12\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$) e a VmedAME mostrou variação de forma não significativa de $-0,84 \pm 0,32$ e $-0,74 \pm 0,37$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$) (Painel A). Experimentos com 9 CCond (Painel B) mostraram que o IKME_{max} diminuiu, mas não significativamente, de $36,00 \pm 5,56$ para $31,00 \pm 5,29\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$). Os estudos realizados para avaliar se o potássio poderia interferir com a VmedAME mostraram que as inclinações das retas de regressão também variaram de forma não significativa de $-0,94 \pm 0,25$ para $-0,69 \pm 0,11$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$).

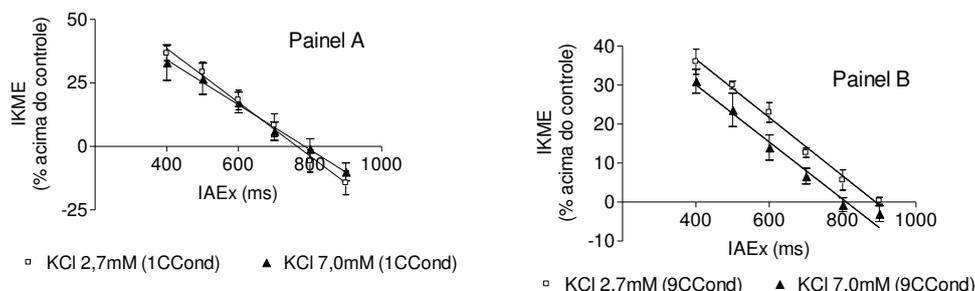


Figura 33 - Efeito da expressão e da VmedAME em função do IAEx, do número de CCond e da concentração extracelular de potássio (2,7 e 7,0 mM). A análise estatística mostrou que a variação de potássio não modificou os descritores de ME ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.2 Avaliação do efeito produzido pelo bloqueio dos receptores muscarínicos sobre a expressão e o apagamento das memórias contráteis

5.3.2.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

A Fig. 34 exemplifica traçados experimentais obtidos em átrio esquerdo de cobaia antes e após a incubação com $1,5 \mu\text{M}$ de sulfato de atropina. Tanto na situação controle, como na presença do bloqueador muscarínico, a resposta extrassistólica apresentou-se como uma onda distinta a partir do IAEEx de 300 ms (curva 2), aumentando sua amplitude, progressivamente, à medida em que o IAEEx cresceu de 400 (curva 3) para 900 ms (curva 8). A resposta inotrópica pós-extrassistole, avaliada em ambas as condições experimentais, apresentou amplitude de força máxima no IAEEx de 400 ms (curva 3, 1a. CPEEx).

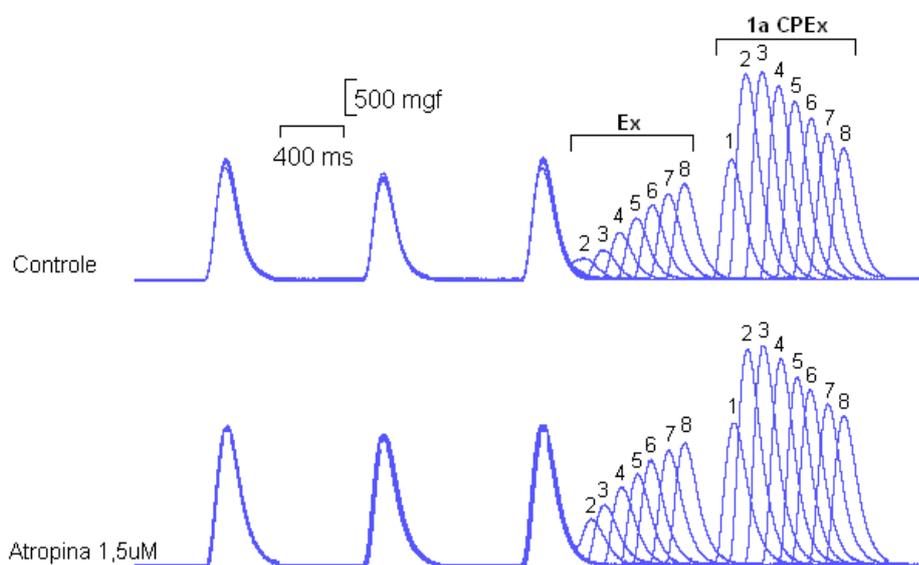


Figura 34 – Avaliação do bloqueio muscarínico sobre a amplitude das extrassistóles e da 1a.CPEEx. A amplitude das respostas inotrópicas foram avaliadas nos intervalos de acoplamento de 200 ms (1), 300 ms (2), 400 ms (3), 500 ms (4), 600 ms (5), 700 ms (6), 800 ms (7) e 900 ms (8) ($27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.2.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig.

34

Tabela 18 – Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles obtidas com diferentes IAEx, na ausência e na presença do bloqueio dos receptores muscarínicos

IAEx (ms)	Controle		Sulfato de atropina (1,5 μ M)	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200				
300	325	20	329	32
400	434	26	846	43
500	651	40	1085	55
600	868	53	1302	67
700	1063	65	1497	77
800	1215	74	1627	83
900	1345	82	1736	89
Controle	1627	100	1953	100

5.3.2.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEx vistas na Fig. 34

Tabela 19 – Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEx, obtidas com diferentes IAEx, na ausência e na presença do bloqueio dos receptores muscarínicos

IAEx (ms)	Controle		Sulfato de atropina (1,5 μ M)	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200	1671	102	1975	101
300	2886	177	3016	154
400	2929	180	3081	158
500	2756	169	2908	149
600	2517	155	2647	135
700	2278	140	2474	127
800	2061	126	2257	115
900	1756	108	2105	108
Controle	1627	100	1953	100

5.3.2.4 Efeito do bloqueio muscarínico sobre a expressão e o apagamento da memória depressora

A Fig. 35 mostra duas curvas relativas ao IKMD e a VmedAMD antes e após o bloqueio de receptores muscarínicos. Os terminais nervosos parassimpáticos do miocárdio isolado contêm acetilcolina estocada que pode ser liberada durante a estimulação elétrica do tecido. Para anular a possibilidade de a acetilcolina interferir no resultado, o sulfato de atropina a $1,5 \mu\text{M}$ foi adicionado ao banho, a fim de bloquear os receptores colinérgicos muscarínicos. Desta forma, se pôde observar que o bloqueio colinérgico não modificou a expressão, nem a velocidade de apagamento de MD. Com relação à expressão de MD, o IKMD_{máx} variou de $79,51 \pm 4,42$ para $77,33 \pm 12,32\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$), enquanto que os valores VmedAMD diminuíram de forma não significativa de $-1,56 \pm 0,30$ para $-1,41 \pm 0,44 \text{ gf/s}$ ($n = 3$; $p > 0,05$).

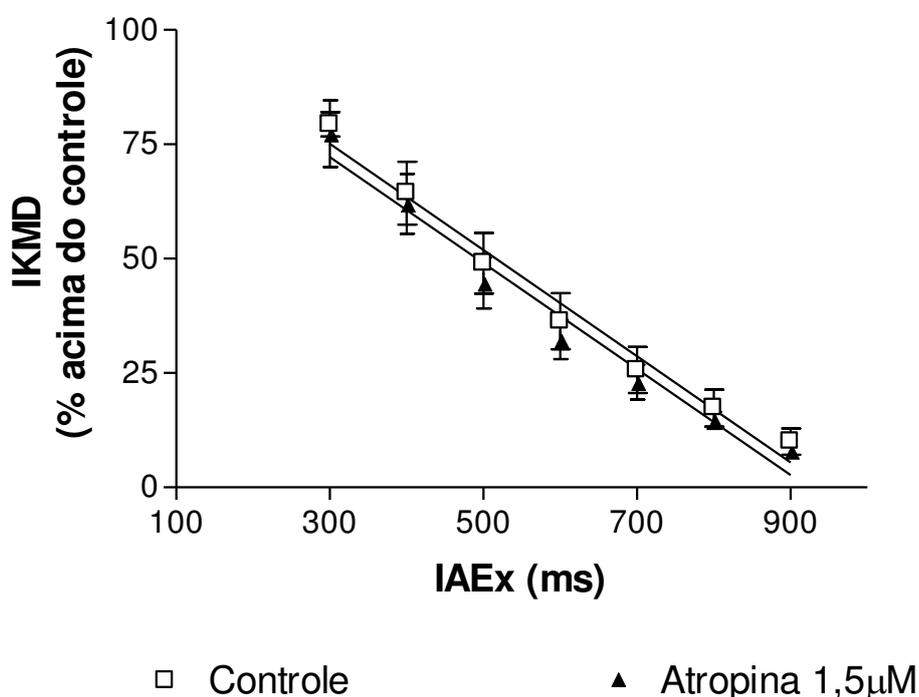


Figura 35 – Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAEEx e do bloqueio muscarínico. O bloqueio (atropina, $1,5 \mu\text{M}$) não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; Estimulação: $0,5 \text{ ms}$; 400 V ; 1 Hz).

5.3.2.5 Efeito do bloqueio de receptores muscarínicos sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora

A Fig. 36 mostra que o bloqueio de receptores muscarínicos feito pelo sulfato de atropina ($1,5 \mu\text{M}$) não produziu efeito significativo nem na expressão, nem na velocidade de apagamento da ME. O antagonista colinérgico foi adicionado ao banho 20 minutos antes do início das medidas. Os resultados demonstraram que o IKME_{max} variou de forma não significativa de $73,18 \pm 23,76$ para $67,61 \pm 22,03\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$) e a V_{medAME} , de $-1,57 \pm 0,64$ para $-1,43 \pm 0,69 \text{ gf/s}$ ($n = 3$; $p > 0,05$).

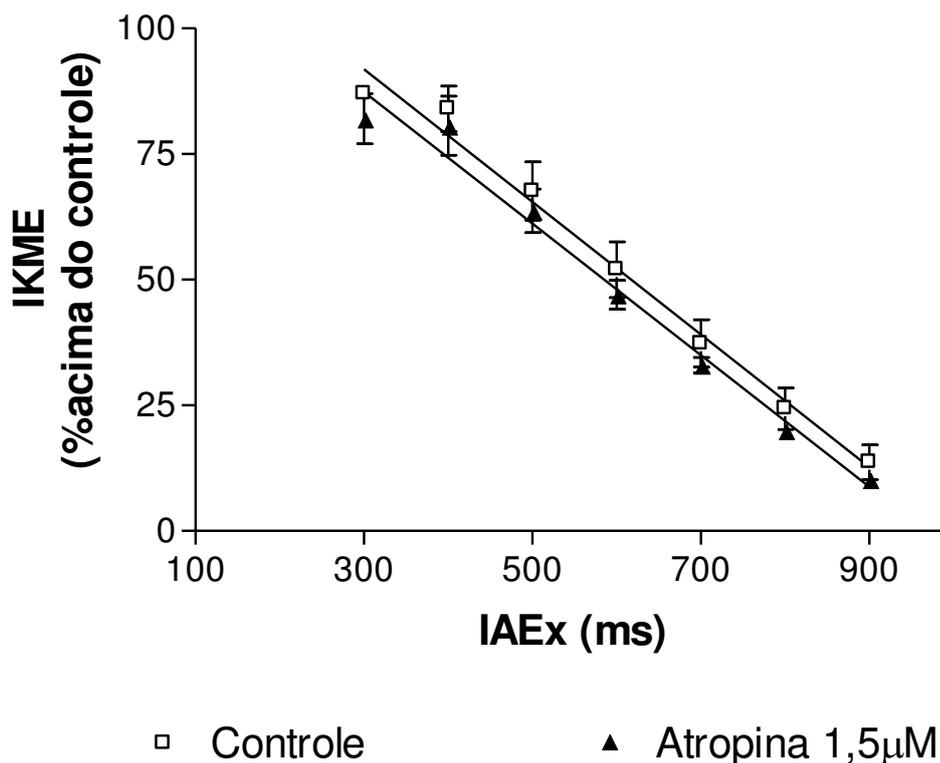


Figura 36 - Variação do IKME e da V_{medAME} em função do IAEEx e do bloqueio muscarínico. O bloqueio (atropina $1,5 \mu\text{M}$) não modificou os descritores de ME ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; Estimulação: $0,5 \text{ ms}$; 400 V ; 1 Hz).

5.3.2.6 Avaliação do bloqueio dos receptores muscarínicos sobre o processo de acumulação das memórias

5.3.2.6.1 Bloqueio dos receptores muscarínicos versus a acumulação de memória depressora

A Fig. 37 mostra a variação da expressão e da velocidade de apagamento da MD, em função de três elementos variáveis: 1) IAEx (300 a 900 ms), 2) número de contrações condicionantes (1 ou 9) e 3) bloqueio dos receptores muscarínicos (1,5 μ M de atropina). Nos experimentos feitos com 1 CCond, a atropina não alterou significativamente as variáveis IKMDmax e VmedAMD. O IKMDmax que no controle era de $76,97 \pm 3,14$ passou para $72,01 \pm 3,92$ % ($n = 3$; $p > 0,05$) e o VmedAMD variou de $-0,98 \pm 0,25$ para $-1,02 \pm 0,26$ gf/s ($n = 3$, $p > 0,05$). Com 9 CCond a atropina também não modificou significativamente essas variáveis, pois o IKMDmax que era de $66,39 \pm 8,23$ passou para $62,35 \pm 1,65$ % ($n = 3$, $p > 0,05$) e o VmedAMD variou de $-1,28 \pm 0,34$ para $-1,07 \pm 0,45$ gf/s ($n = 3$, $p > 0,05$).

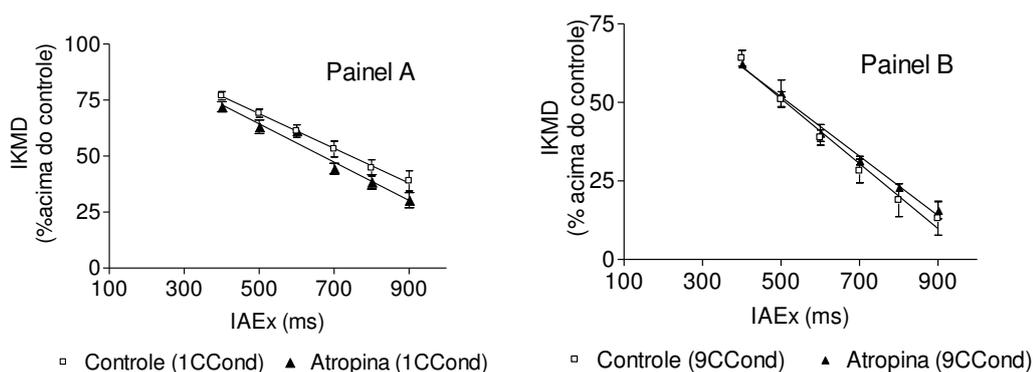


Figura 37 – Efeito do IAEx, do número de CCond e do bloqueio muscarínico sobre o IKMD e a VmedAMD. O bloqueio (atropina 1,5 μ M) não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.2.6.2 Bloqueio dos receptores muscarínicos versus a acumulação de memória excitadora

A Fig. 38 resume os experimentos realizados para avaliar o efeito do bloqueio de receptores muscarínicos sobre o processo de acumulação da ME. Os experimentos foram realizados em situação controle e após incubação da preparação biológica por 20 minutos, sob a ação do bloqueador colinérgico. Os resultados mostraram que a adição de $1,5 \mu\text{M}$ de sulfato atropina ao banho não modificou significativamente o processo de acumulação de ME. Nos experimentos feitos com 1 CCond, não houve alteração significativa do IKME_{max}, que variou de $37,36 \pm 1,26$ para $34,07 \pm 1,33\%$, com a adição da atropina ($n = 3$; $p > 0,05$). Quando o miocárdio foi pré-condicionado com 9 CCond, o IKME_{max} também não variou significativamente, pois passou de $48,00 \pm 7,94$ para $43,47 \pm 4,37\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$). A VmedAME também não se modificou, posto que os resultados mostraram que no miocárdio pré-condicionado com 1 CCond, a adição de atropina ao banho fez variar a inclinação da reta de regressão de $-1,33 \pm 0,38$ para $-1,10 \pm 0,31 \text{ gf/s}$ ($n = 3$; $p > 0,05$) e com 9 CCond a variação foi de $-1,56 \pm 0,74$ para $-1,27 \pm 0,45 \text{ gf/s}$ ($n = 3$; $p > 0,05$).

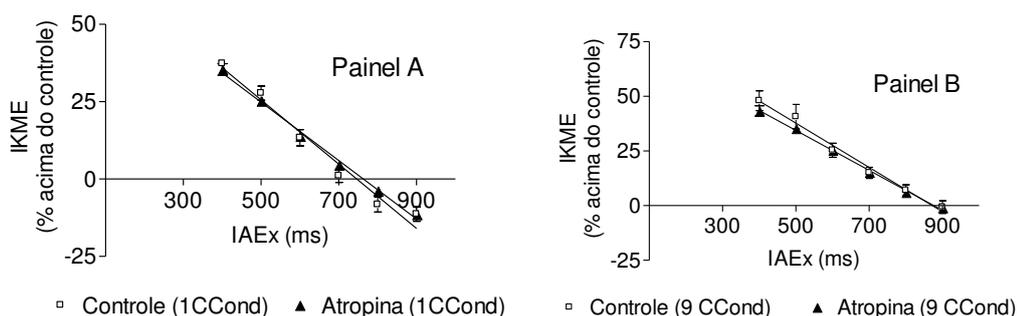


Figura 38 – Efeito do bloqueio muscarínico sobre o IKME e a VmedAME em função do IAEEx, do número de CCond. O bloqueio (atropina, $1,5 \mu\text{M}$) não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.3 Avaliação do efeito produzido pelo bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e a acumulação das memórias contráteis

5.3.3.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

A Fig. 39 registra um traçado experimental realizado em átrio esquerdo de cobaia ensaiado antes e após a adição de 20 mM de tetraetilamônio (TEA) ao banho. Tanto na situação controle, como na presença do bloqueador, a resposta extrassistólica pôde ser vista com um IAEx maior ou igual a 300 ms. A amplitude desta resposta aumentou gradativamente à medida em que o IAEx cresceu de 400 (curva 3) para 900 ms (curva 8). A 1a CPEx em ambas as condições experimentais teve amplitude máxima no IAEx de 300 ms (curva 2).

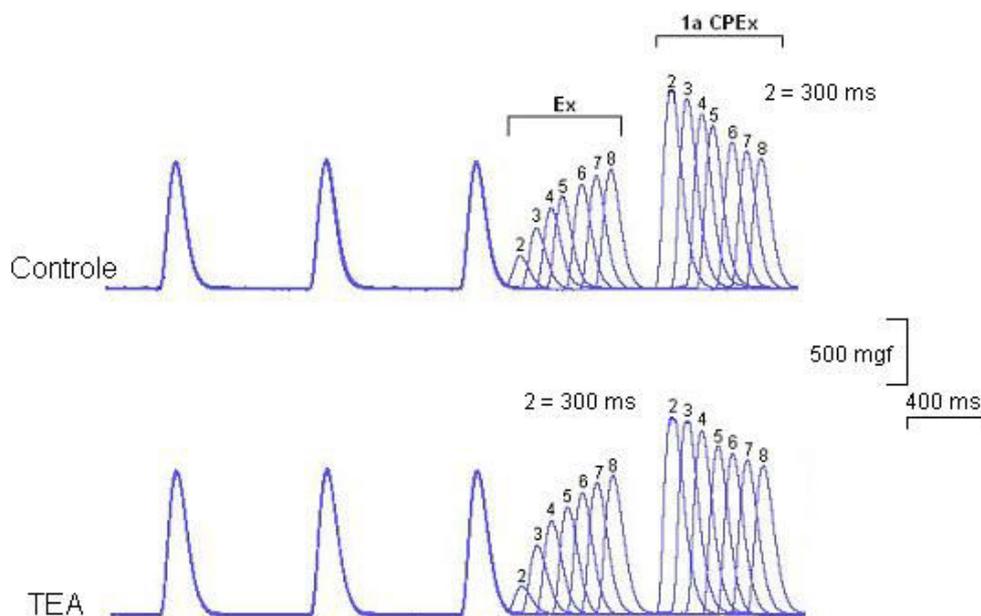


Figura 39 – Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassistole e da 1a.CPEx antes e após o bloqueio de correntes de potássio com a adição de TEA (20mM) ao banho ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.3.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas na Fig.

39

Tabela 20 - Tabulação dos dados de amplitude das extrassístoles, obtidas com diferentes IAEx, antes e após o bloqueio de correntes de potássio

IAEx (ms)	Ctr		TEA	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200				
300	249	27	222	20
400	458	47	528	49
500	611	63	708	65
600	708	74	819	75
700	792	82	930	86
800	847	88	1000	92
900	902	94	1055	97
Controle	958	100	1083	100

5.3.3.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEx vistas na Fig. 39

Tabela 21 - Tabulação dos dados de amplitude das 1as.CPEx, obtidas com diferentes IAEx, antes e após o bloqueio de correntes de potássio

IAEx (ms)	Controle		TEA	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200				
300	1500	156	1500	138
400	1444	150	1472	136
500	1333	139	1403	129
600	1236	129	1292	119
700	1111	116	122	113
800	1055	110	1180	109
900	1000	104	1125	104
Controle	958	100	1083	100

5.3.3.4 Efeito do bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória depressora

A Fig. 40 mostra o efeito do bloqueio de canais de potássio promovido por TEA na preparação experimental sobre a expressão e a velocidade de apagamento da MD, em átrio esquerdo de cobaia. A adição de 20 mM de TEA ao banho não modificou, nem a expressão, nem o apagamento de MD, pois o IKMDmax variou de $78,13 \pm 0,56$ para $80,03 \pm 1,78\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$), enquanto que a V_{medAMD} variou de $-1,87 \pm 0,26$ para $-1,91 \pm 0,58$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$).

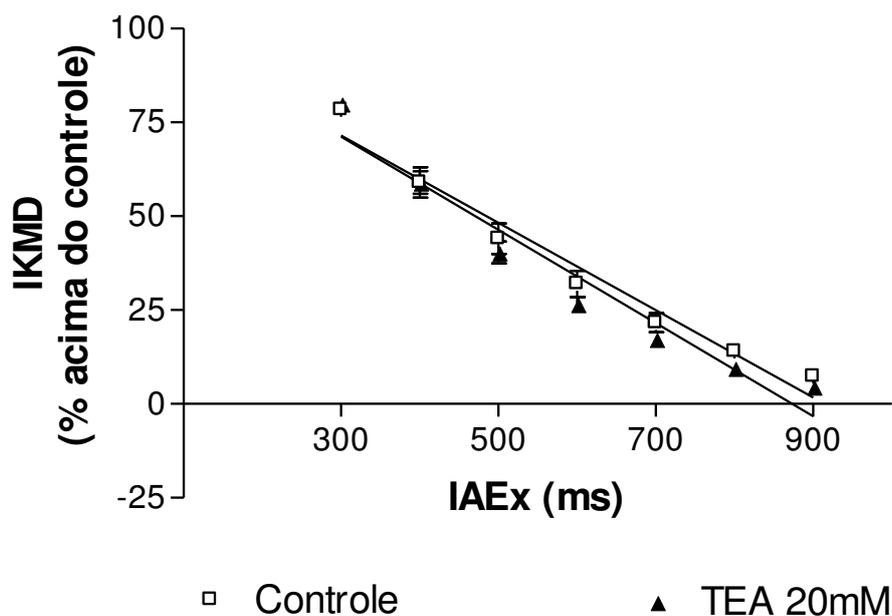


Figura 40 - Variação do IKMD e da V_{medAMD} em função do IAEX e do bloqueio de correntes de potássio. A adição de TEA (20 mM) ao banho não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.3.3.5 Efeito do bloqueio de canais de potássio sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora

A Fig. 41 mostra que o bloqueio inespecífico dos canais de potássio produzido pelo tetraetilamonio (TEA, 20 mM) alterou de forma significativa ($n = 3$, $p < 0,05$) a expressão e o apagamento da ME. Isto se verifica porque o IKME_{max} variou de $57,16 \pm 9,08$ para $28,50 \pm 14,06\%$ ($n = 3$; $p < 0,05$) e a VmedAME reduziu de $-1,97 \pm 0,37$ para $-1,46 \pm 0,26$ gf/s ($n = 3$; $p < 0,05$).

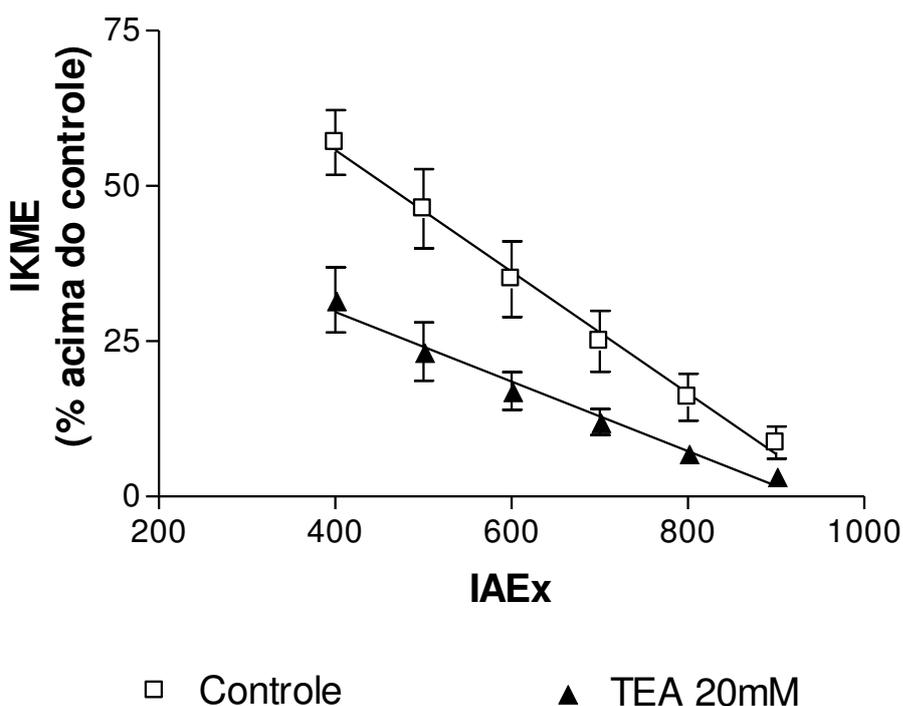


Figura 41 – Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEx e do bloqueio de correntes de potássio. A adição de TEA (20 mM) ao banho modificou os descritores ($n = 3$; $p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.3.6 Avaliação do bloqueio de canais de potássio sobre o processo de acumulação das memórias

5.3.3.6.1 Bloqueio de canais de potássio versus acumulação da memória depressora

A Fig. 42 mostra a variação da expressão e do apagamento da MD em função de três variáveis: 1) IAEx (400 a 900 ms), 2) número de contrações condicionantes (1 ou 9) e 3) bloqueio de canais de potássio (TEA, 20mM). Nos experimentos feitos com 1 CCond e na presença de TEA não houve alteração significativa das variáveis IKMDmax e VmedAMD. O IKMDmax que, no controle, era de $85,86 \pm 3,61$ passou para $88,33 \pm 4,51$ % ($n = 3$; $p > 0,05$) e o VmedAMD variou de $-0,98 \pm 0,19$ para $-1,96 \pm 0,56$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$). Com 9 CCond e na presença de TEA, também não houve alteração significativa dessas variáveis, pois o IKMDmax que era de $68,61 \pm 7,97$ passou para $66,58 \pm 1,42\%$ ($n = 3$, $p > 0,05$) e o VmedAMD variou de $-1,75 \pm 0,34$ para $-1,99 \pm 0,44$ gf/s ($n = 3$, $p > 0,05$).

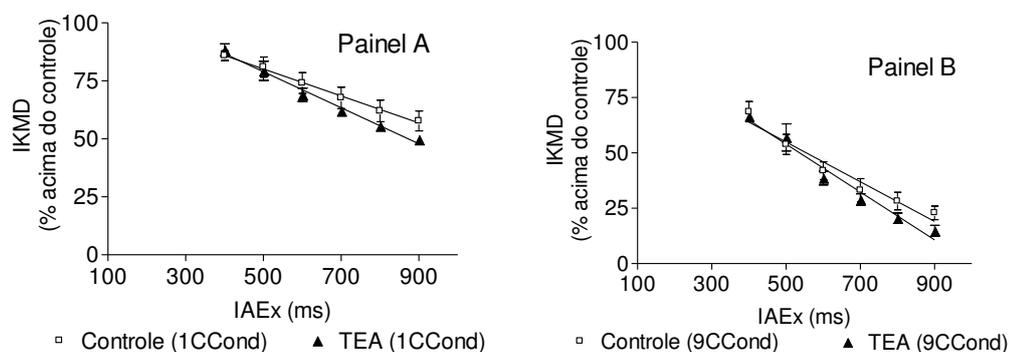


Figura 42 - Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre o IKMD e da VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond. O bloqueio dos canais de potássio (TEA, 20 mM) não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.3.6.2 Bloqueio de canais de potássio versus acumulação da memória excitadora

A Fig. 43 mostra o resultado produzidoo pela adição de TEA (20 mM) ao banho, sobre a expressão e o apagamento da ME. Os resultados mostraram que a redução das correntes de potássio não modificou significativamente o processo de acumulação de ME. Isto pôde ser deduzido pelo fato de que, nos experimentos feitos com 1 CCond com ou sem a presença de TEA, o IKME_{max} variou, mas não significativamente, de $20,00 \pm 5,00$ para $17,33 \pm 2,08\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$). Tampouco houve variação de IKME_{max}, quando o miocárdio foi pré-condicionado com 9 CCond. Neste caso, o valor de IKME_{max} variou de $31,93 \pm 2,41$ para $33,13 \pm 4,85\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$). O bloqueio das correntes de potássio também não alterou a VmedAME, uma vez que os resultados mostraram que, no miocárdio pré-condicionado com 1 CCond, a adição de TEA ao banho fez variar a inclinação da reta de regressão de $-1,72 \pm 0,24$ para $-1,25 \pm 0,71$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$) e com 9 CCond a variação foi de $-2,11 \pm 0,31$ para $-1,30 \pm 0,13$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$).

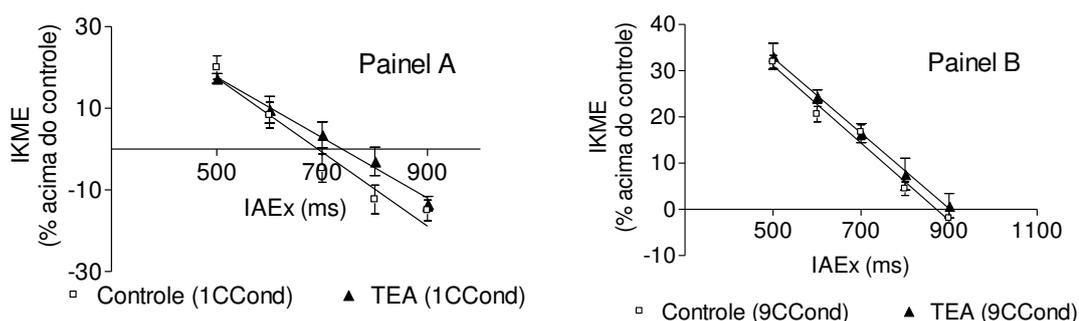


Figura 43 - Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre o IKME e da VmedAME, em função do IAEEx e do número de CCond. A adição de TEA (20mM) ao banho não modificou os descritores ($n = 3$; $p > 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.4 Avaliação do efeito produzido pelo cálcio extracelular sobre a expressão e acumulação das memórias contráteis

5.3.4.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

As Figs. 44 e 45 mostram o resultado de um experimento realizado em átrio esquerdo de cobaia submetido a quatro concentrações extracelulares de cloreto de cálcio (1,37; 2,05; 5,47 e 9,59 mM). A Fig. 44 representa os traçados obtidos com 1,37 e 2,05 mM de cálcio. Nestas concentrações, as extrassístoles correspondentes aos IAEx de 200 ms e 300 ms não apareceram como curva isoladas. No entanto, pôde-se comprovar, através da alteração de amplitude da 1a.CPEx, que tais extrassístoles encontravam-se embutidas na contração controle. A partir de um IAEx de 400 ms, a resposta extrassistólica passou a se apresentar como uma onda distinta, cuja amplitude aumentou progressivamente acompanhando o crescimento do IAEx. Sob estas condições experimentais, a resposta inotrópica pós-extrassistólica que mostrou maior amplitude foi registrada com um IAEx de 400 ms (curva 3). A Fig. 45 representa os traçados nas concentrações de 5,47 e 9,59 mM de cálcio extracelular. Nelas, a extrassístole correspondente ao IAEx de 200 ms não se manifestou como resposta isolada. A partir de um IAEx de 300 ms, a resposta extrassistólica passou a se apresentar como uma onda distinta, cuja amplitude aumentou progressivamente, acompanhando o crescimento do IAEx. Sob as condições experimentais do teste, a resposta contrátil pós-extrassistólica mostrou maior amplitude no IAEx de 300 ms (curva 2).

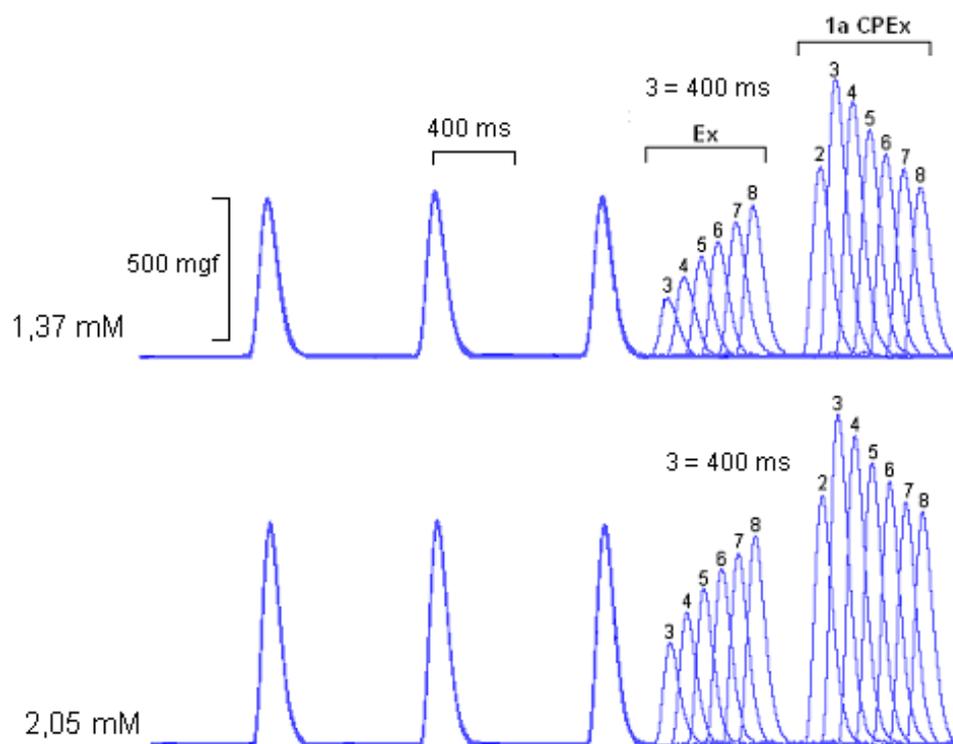


Figura 44 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEx, em função do IAEx e da concentração extracelular de cálcio (1,37 e 2,05 mM). O estudo foi feito com IAEx 200 a 900 ms. Os traçados mostram curvas de forças de contração obtidas em átrio esquerdo de cobaia estimulado ritmicamente (1000 ms) até o momento em que foram aplicados estímulos extrassistólicos com diferentes IAEx. Note-se que o IAEx correspondente ao surgimento da primeira extrassístole visível (3) também produziu uma 1a.CPEx de amplitude máxima (3) ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

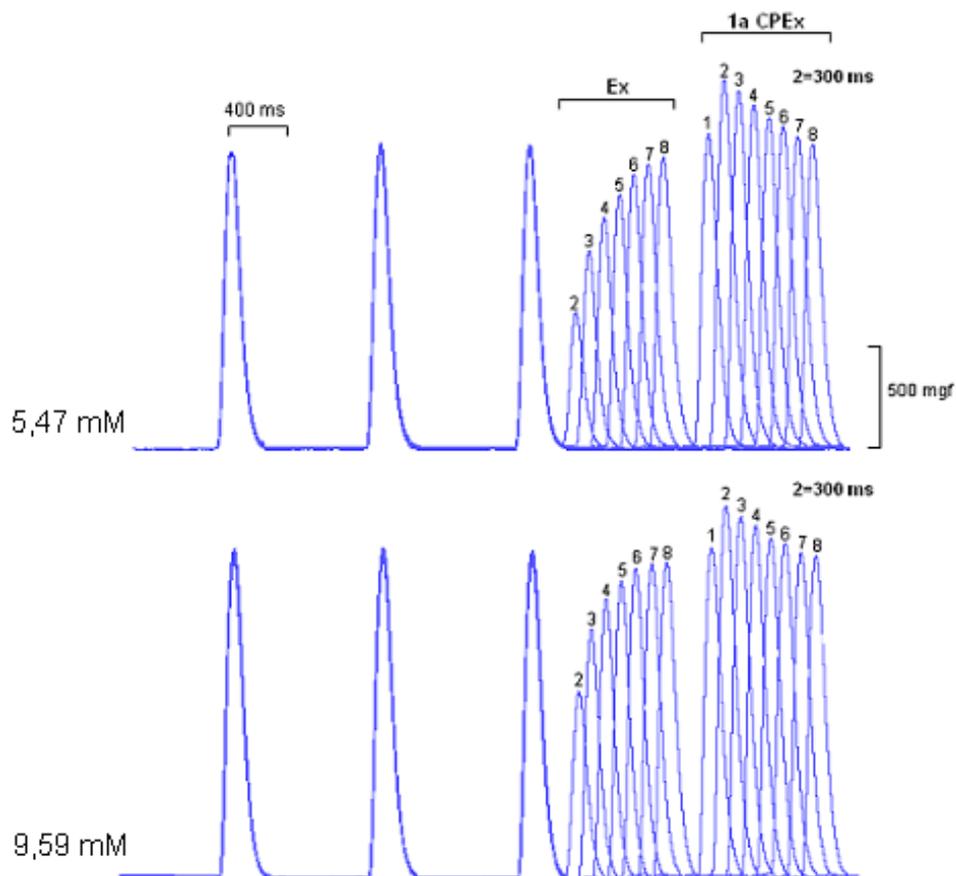


Figura 45 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrasístole e da 1a.CPEX, em função do IAEEx e da concentração extracelular de cálcio (5,47 e 9,59 mM). O estudo foi feito com IAEEx 200 a 900 ms. Os traçados mostram curvas de forças de contração obtidas em átrio esquerdo de cobaia que foi estimulado ritmicamente (1000 ms) até o momento em que foram aplicados estímulos extrasistólicos com intervalos de acoplamentos progressivamente crescentes. Note-se que o IAEEx correspondente à primeira extrasístole individualizada produziu uma 1aCPEX de amplitude máxima ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.4.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas nas Fig. 44 e 45

Tabela 22 - Tabulação dos dados referentes à amplitude das extrassístoles obtidos com diferentes IAEx e com concentrações diversas de cloreto de cálcio extracelular (1,37; 2,05; 5,47 e 9,59 mM)

IAEx (ms)	1,37 mM		2,055 mM		5,47 mM		9,59 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200								
300					464	44	649	57
400	193	33	350	46	678	64	871	76
500	271	47	457	60	799	75	978	85
600	343	59	535	70	885	84	1035	90
700	393	68	607	80	949	90	1085	95
800	464	80	657	87	992	94	1099	96
900	521	90	728	96	1006	95	1106	97
Contr	577	100	757	100	1056	100	1142	100

Contr: controle

5.3.4.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEX vistas na Fig. 44 e 45

Tabela 23 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da 1a.CPEX obtidas com diferentes IAEx e com concentrações diversas de cloreto de cálcio extracelular (1,37; 2,05; 5,47 e 9,59 mM)

IAEx (ms)	1,37 mM		2,05 mM		5,47 mM		9,59 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200					1099	104	1156	101
300	657	114	871	115	1285	121	1306	114
400	971	168	1142	151	1249	118	1263	110
500	893	154	1071	141	1199	113	1235	108
600	793	137	985	130	1156	109	1192	104
700	707	122	921	121	1128	107	1171	102
800	650	112	849	112	1092	103	1142	100
900	586	101	814	107	1063	100	1128	98
Contr	577	100	757	100	1056	100	1142	100

Contr: controle

5.3.4.4 Efeito do cálcio extracelular sobre a expressão e o apagamento da memória depressora

A Fig. 46 mostra o incremento da carga de MD transferida para a contração extrassistólica e a velocidade de apagamento de MD avaliada em função da concentração extracelular de cálcio e do IAE_x. Os experimentos foram conduzidos inicialmente com cálcio de 1,37 e depois 5,47 mM. A elevação do cálcio diminuiu o IKMD_{max} de $87,56 \pm 2,33$ para $63,83 \pm 3,78\%$ ($n = 3$, $p < 0,05$) e também reduziu de modo significativo a VmedAMD que diminuiu de $-2,58 \pm 0,71$ para $-1,20 \pm 0,37$ gf/s ($n = 3$, $p < 0,05$). Isto mostra que o cálcio interfere com a expressão e com a velocidade de apagamento de MD.

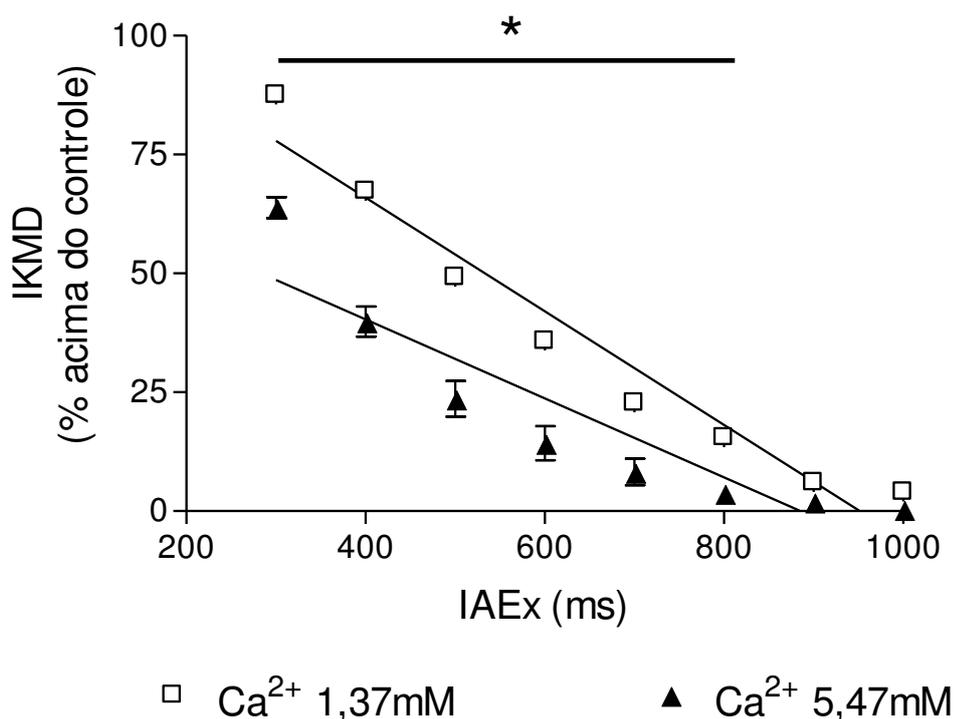


Figura 46 - Variação do IKMD e da VmedAMD em função do IAE_x e da concentração extracelular de cálcio. A elevação da concentração de cálcio reduziu o IKMD ($n = 3$; $*p < 0,05$) e a VmedAMD ($n = 3$, $p < 0,05$) ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 1 Hz, 400V, 0,5ms).

5.3.4.5 Efeito do cálcio extracelular sobre a expressão e a apagamento da memória excitadora

A Fig. 47 mostra o efeito da concentração de cálcio no banho sobre o IKME_{max} e a VmedAME do átrio esquerdo de cobra. Pode-se perceber que a elevação do cálcio de 1,37 para 5,47 mM reduziu significativamente o IKME_{max} de $84,36 \pm 0,54$ para $13,91 \pm 0,11\%$ ($n = 3$, $p < 0,05$) e também a VmedAME de $-0,90 \pm 0,13$ para $-0,34 \pm 0,05$ gf/s ($n = 3$, $p < 0,05$). Isso mostra que, em alta concentração, o cálcio extracelular reduziu o IKME e a VmedAME.

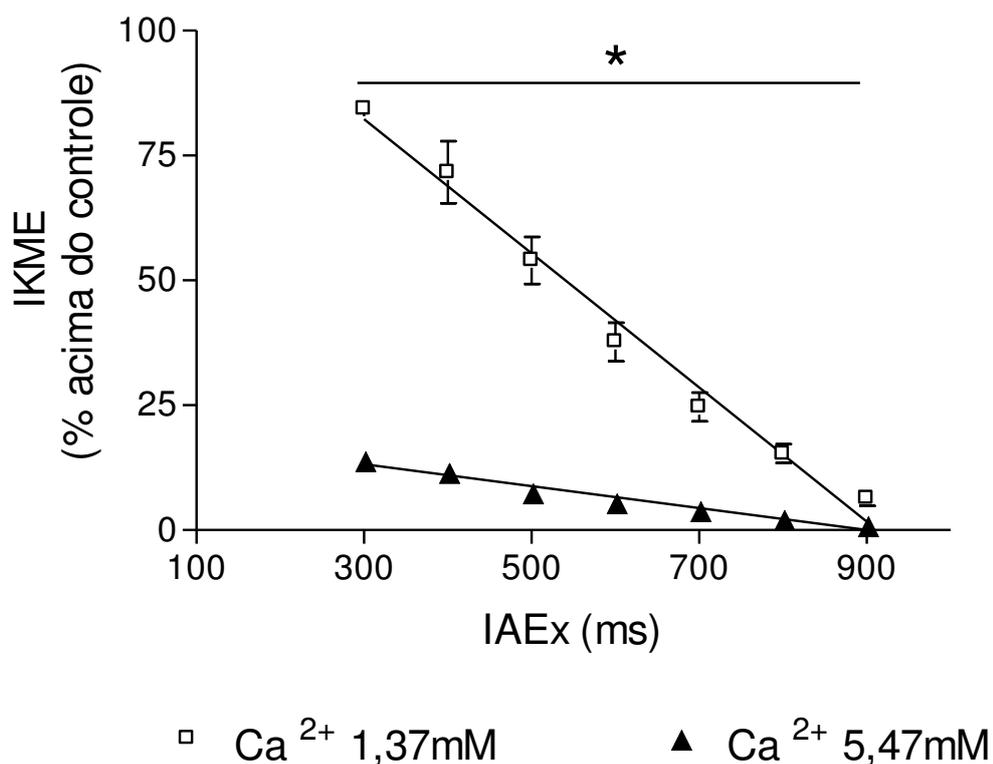


Figura 47 - Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEEx e da concentração extracelular de cálcio ($n = 3$; $*p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.4.6 Avaliação do efeito produzido pelo cálcio extracelular sobre o processo de acumulação das memórias

5.3.4.6.1 Concentração do cálcio extracelular versus acumulação da memória depressora

A Fig. 48 mostra a variação do IKME e da VmedAMD obtida em função de três variáveis: 1) IAEx (400 a 900 ms), 2) número de contrações condicionantes (1 ou 9) e 3) concentração externa de cálcio (1,37 ou 5,47 mM). A KMD presente na extrassístole relacionada com o IAEx mais curto (400 ms) variou tanto com a concentração de cálcio extracelular, quanto com o número de CCond. Assim, quando se empregou apenas 1 CCond e o cálcio do banho foi elevado de 1,37 para 5,47mM, o IKMDmax diminuiu de $88,00 \pm 2,00$ para $55,33 \pm 9,02$ % ($n = 3$; $p < 0,05$). A VmedAMD variou com a elevação do cálcio extracelular (1,37 para 5,47mM) em preparação pré-condicionada com 01 CCond. Nesta situação, a VmedAMD aumentou de $-0,43 \pm 0,15$ para $-1,32 \pm 0,16$ gf/s ($n = 3$; $p < 0,05$). No entanto, quando o experimento foi realizado com 9 CCond, o IKMDmax não variou significativamente, pois passou de $47,46 \pm 1,07$ para $58,99 \pm 4,46$ % ($n = 3$, $p > 0,05$). A VmedAMD também não foi afetada pelo cálcio, pois apresentou um valor médio de $-0,96 \pm 0,36$, em baixo cálcio, e de $-0,96 \pm 0,32$ gf/s, em alto cálcio ($n = 3$, $p > 0,05$).

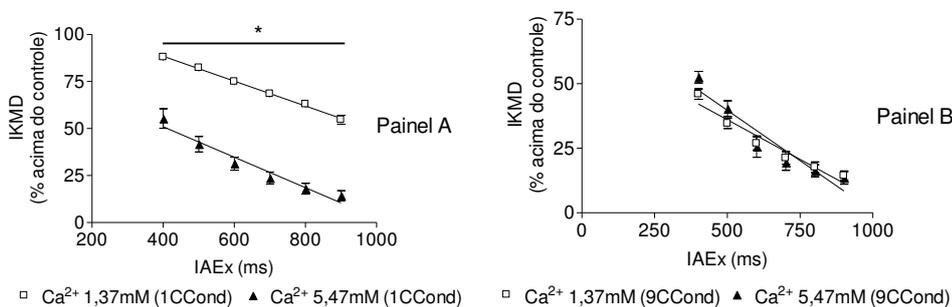


Figura 48 – Efeito da concentração extracelular de cálcio sobre o IKMD e a VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond. Painel A: 1 CCond; Painel B: 9 CCond. Os testes foram feitos com diferentes concentrações de cálcio ($n = 3$; $*p < 0,5$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.3.4.6.2 Concentração do cálcio extracelular versus acumulação da memória excitadora

A Fig. 49 mostra o resultado do efeito produzido pela elevação da concentração de cálcio externo de 1,37 mM para 5,47 mM, sobre a amplitude média da 1a.CPEx, em função de duas variáveis, a saber: 1) o IAEx (400 a 900 ms) e 2) número de contrações condicionantes (1 CCond ou 9 CCond). A quantidade de ME presente na 1a.CPEx (400 ms) variou tanto com a concentração de cálcio, quanto com o número de CCond. Assim, quando se empregou apenas 01 CCond e o cálcio do banho foi elevado de 1,37 para 5,47 mM, o IKME_{max} diminuiu de $25,50 \pm 6,50$ para $17,00 \pm 1,00\%$ porém de forma não significativa ($n = 3$; $p > 0,05$). Também, não houve alteração na VmedAME, pois a inclinação das retas de ajustamento variou de $-1,12 \pm 0,30$ para $-0,67 \pm 0,06$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$).

No entanto, quando o experimento foi pré-condicionado com 9 CCond, o IKME_{max} diminuiu de forma significativa de $60,88 \pm 0,39$ para $11,67 \pm 6,24 \%$ ($n = 3$, $p < 0,05$) e a VmedAME também diminuiu significativamente de $-1,11 \pm 0,21$ para $-0,45 \pm 0,16$ gf/s ($n = 3$, $p < 0,05$).

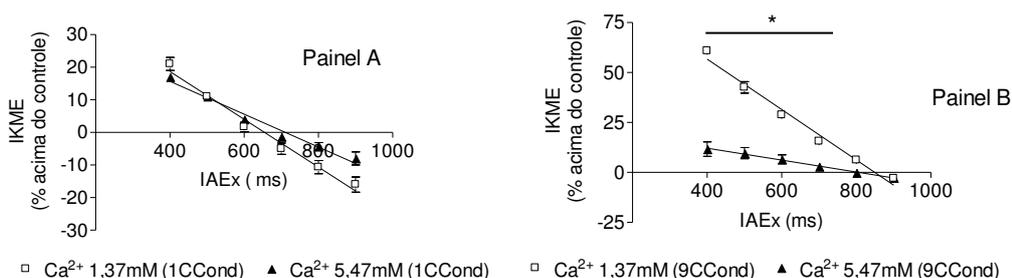


Figura 49 - Efeito da concentração extracelular de cálcio sobre o IKME e a VmedAME, em função do IAEx e do número de CCond. Painéis A e B: 01 e 09 CCond, respectivamente, empregando-se baixo e alto cálcio externo ($n = 3$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz)

5.3.5 Avaliação do efeito produzido pela cafeína sobre a expressão e a acumulação das memórias contráteis

5.3.5.1 Exemplificação de um resultado experimental típico

As Figs. 50 e 51 mostram curvas de força atrial, bem como extrassístoles e as 1a.CPEX, obtidas em átrio esquerdo de cobaia. O experimento foi realizado com diferentes IAEx (200 a 900 ms) antes e depois da adição de cafeína ao banho (1, 5 e 10 mM). A Fig. 50 mostra os traçados obtidos em situação controle e também com 1 mM de cafeína. No controle, as extrassístoles começaram a aparecer com um IAEx de 300 ms. Quando a cafeína foi adicionada ao banho, a resposta contrátil apareceu já no IAEx de 200 ms. A 1a.CPEX atingiu sua amplitude máxima tanto no controle quanto com cafeína 1 mM, no IAEx de 300 ms.

Na Fig. 51 estão os traçados obtidos com cafeína de 5 e 10 mM. Com 5 mM a extrassístole apareceu individualizada aos 200 ms, porém, com 10 mM, essa resposta surgiu somente no IAEx de 300 ms. Nos experimentos realizados ($n = 3$), a amplitude da força de contração atrial apresentou redução com a elevação da concentração de cafeína no banho (1 para 10 mM).

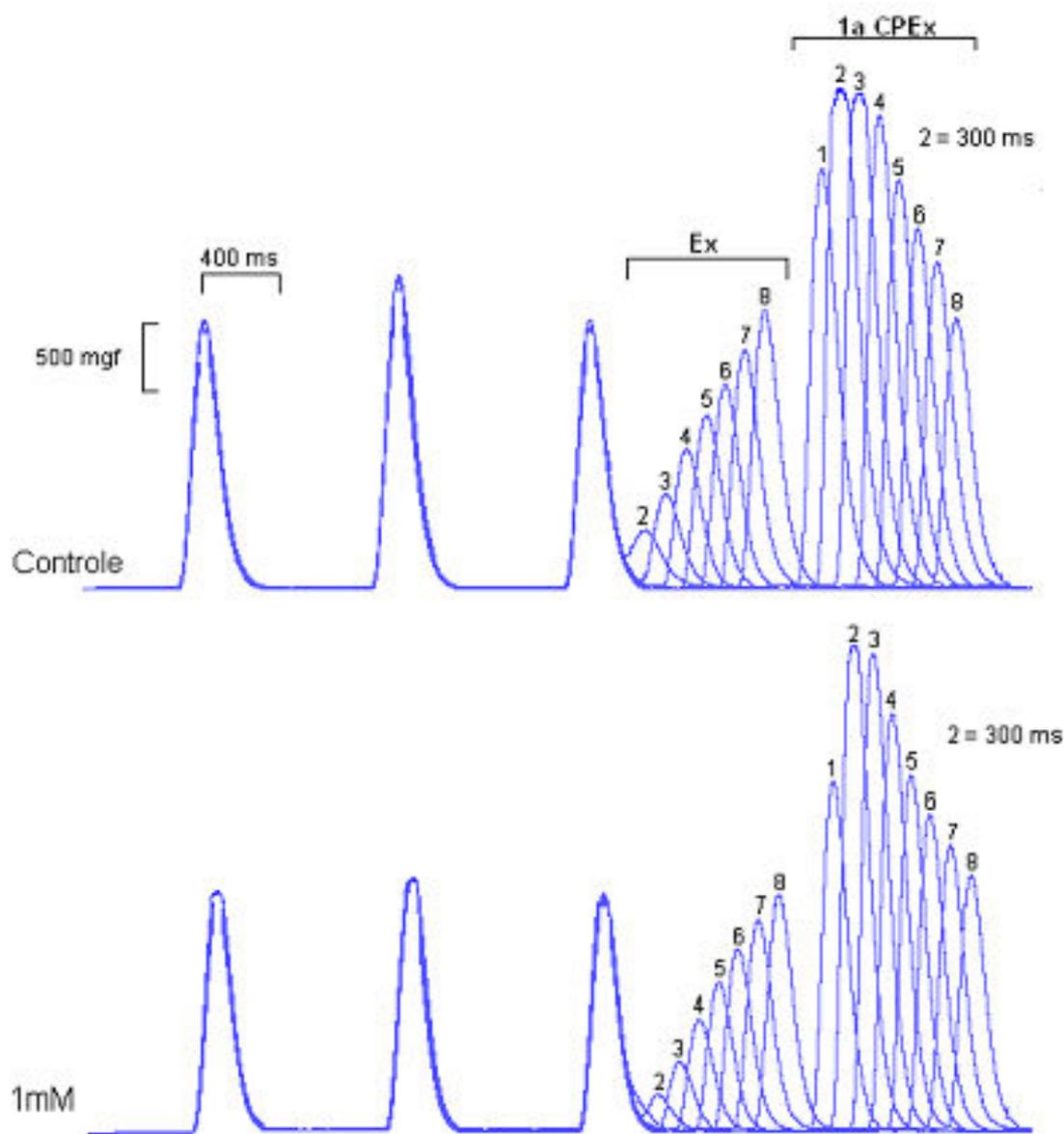


Figura 50 - Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEX, em função do IAEx e da adição da cafeína (1mM). Traçados experimentais superpostos mostrando três curvas de contração atrial obtidas com a preparação estimulada em ritmo regular, seguidas por respostas extrassistólicas e pela 1a.CPEX, ambas produzidas por diferentes IAEx (200 a 900 ms). No painel superior, estão os traçados obtidos no controle, enquanto que no inferior estão os que foram registrados com a adição de 1 mM de cafeína ao banho. A cafeína (1 mM) não modificou o comportamento das 1as.CPEX ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz; IAEx: 200 a 900 com incrementos de 100 ms)

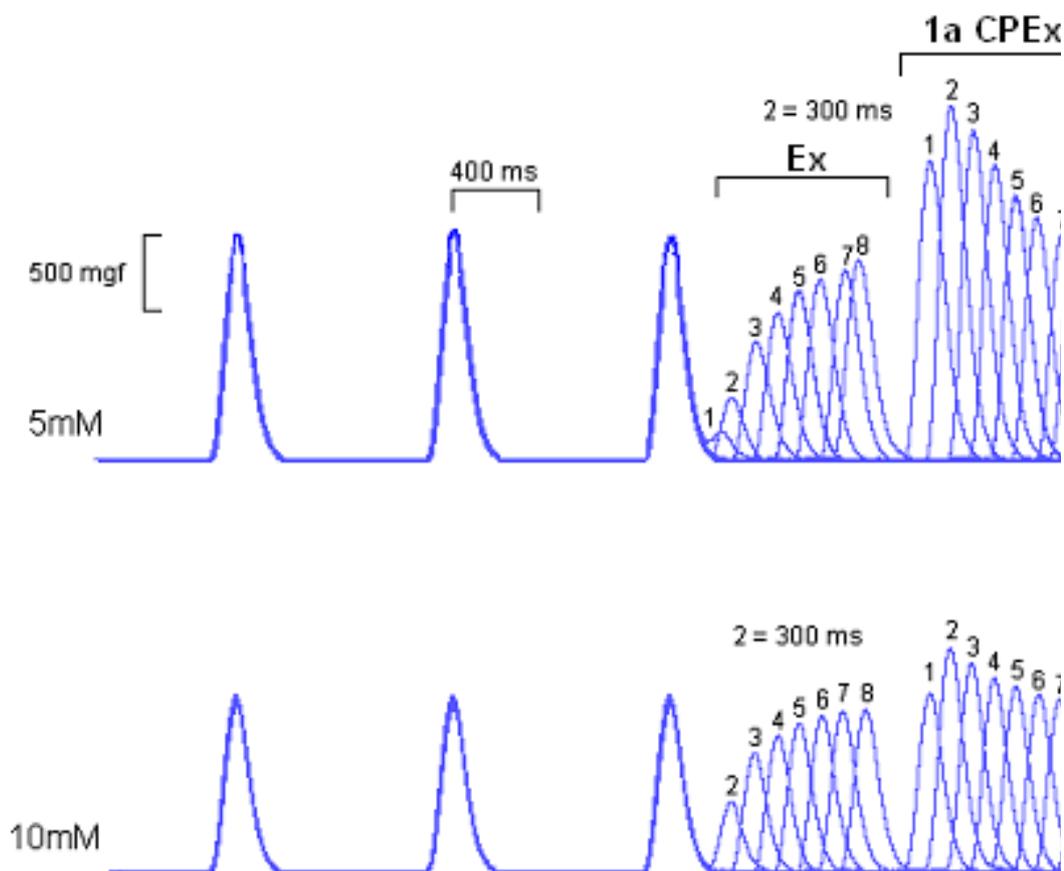


Figura 51 – Exemplo de experimento representativo para avaliar a amplitude da extrassístole e da 1a.CPEX, em função do IAEEx e da adição da cafeína (5 ou 10 mM). Traçados experimentais superpostos mostrando três curvas de contração atrial obtidas com a preparação estimulada em ritmo regular, seguidas por respostas extrassistólicas e pela 1a.CPEX, ambas produzidas por diferentes IAEEx (200 a 900 ms). No painel superior estão os traçados obtidos com a adição de 5 mM de cafeína ao banho, enquanto que no inferior estão os traçados registrados com 10 mM de cafeína. A cafeína não alterou o valor do menor IAEEx capaz de induzir uma resposta contrátil (200 ms). Todavia, a resposta extrassistólica com 5 mM de cafeína foi maior do que aquela com 10 mM. Apesar de ter reduzido as amplitudes das 1as. CPEX, a cafeína não modificou o comportamento destas contrações ($27 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz; IAEEx: 200 a 900 com incrementos de 100 ms).

5.3.5.2 Tabulação dos dados referentes às extrassístoles vistas nas Fig. 50 e 51

Tabela 24 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da extrassístole obtida com diferentes IAEx na ausência e na presença da cafeína (1; 5; 10 mM)

IAEx (ms)	Controle		1 mM		5 mM		10 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200					220	13		
300	420	19	262	14	480	28	540	40
400	700	32	500	27	900	53	920	68
500	1040	48	820	45	1120	66	1040	77
600	1280	59	1100	60	1280	76	1140	85
700	1520	70	1340	74	1380	82	1180	88
800	1780	83	1540	85	1440	86	1220	91
900	2080	96	1740	96	1520	90	1240	92
Contr	2150	100	1810	100	1680	100	1340	100

5.3.5.3 Tabulação dos dados referentes às 1a.CPEX vistas nas Fig. 50 e 51

Tabela 25 - Tabulação dos dados referentes à amplitude da 1a.CPEX obtida com diferentes IAEx na ausência e na presença da cafeína (1; 5; 10 mM)

IAEx (ms)	Controle		1 mM		5 mM		10 mM	
	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)	(mgf)	(%)
200	3140	146	2580	142	2280	124	1360	101
300	3740	174	3620	200	2700	160	1700	127
400	3700	172	3560	196	2500	149	1580	118
500	3540	164	3120	172	2240	133	1480	110
600	3040	141	2640	146	2000	119	1420	106
700	2680	124	2360	130	1860	110	1360	101
800	2440	113	2120	117	1720	102	1320	98
900	2000	93	1880	104	1680	100	1280	95
Contr	2150	100	1810	100	1680	100	1340	100

Contr - controle

5.3.5.4 Efeito da cafeína sobre a expressão e o apagamento da memória depressora

A Fig. 52 mostra o IKMD em função do IAEx e da concentração de cafeína adicionada ao banho. Nela se pode ver que a cafeína a 5 mM reduziu o IKMDmax de $79,88 \pm 3,48$ para $56,68 \pm 6,62\%$ ($n = 3$, $p < 0,05$) e diminuiu a V_{medAMD} de $-1,78 \pm 0,50$ para $-0,60 \pm 0,10$ gf/s ($n = 3$, $p < 0,05$). Este resultado mostra que a cafeína é capaz de modificar a expressão e o apagamento da MD.

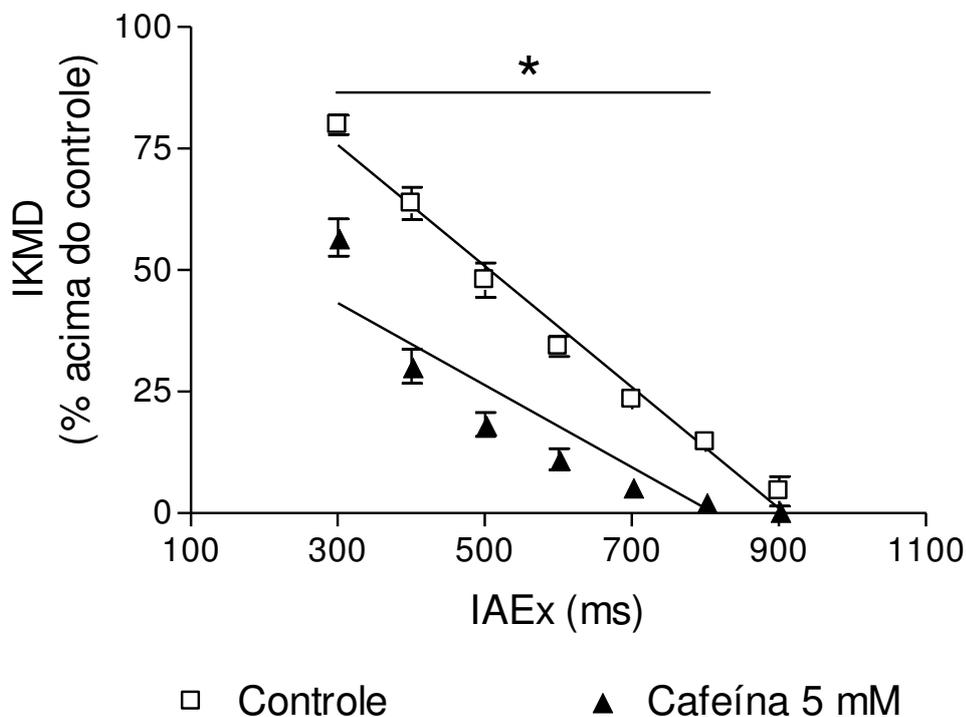


Figura 52 – Variação do IKMD e da V_{medAMD} em função do IAEx e da adição de cafeína ao banho ($n = 3$; $*p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.5.5 Efeito da cafeína sobre a expressão e o apagamento da memória excitadora

A Fig. 53 mostra que a cafeína (5 mM) reduziu o IKME_{max} de $77,14 \pm 1,02$ para $28,54 \pm 2,11\%$ ($n = 3$, $p < 0,05$) e também diminuiu a VmedAME de $-1,74 \pm 0,64$ para $-0,33 \pm 0,14$ gf/s ($n = 3$; $p < 0,05$), indicando que a cafeína trabalha negativamente para o desenvolvimento e apagamento do processo da memória excitadora.

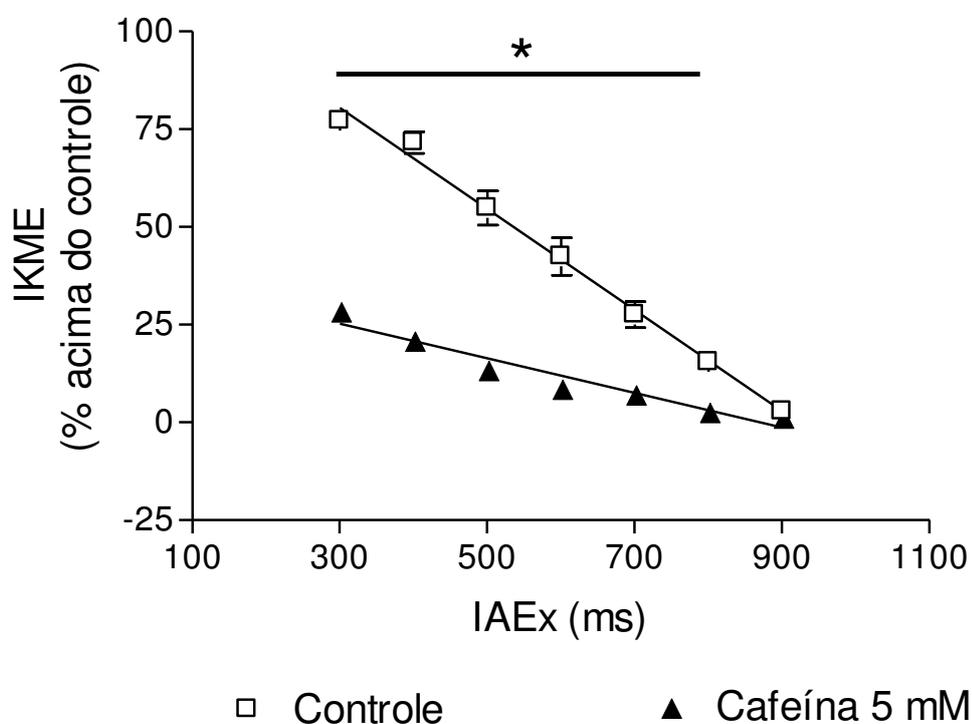


Figura 53 - Variação do IKME e da VmedAME em função do IAEEx e da adição de cafeína ao banho ($n = 3$; $*p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.5.6 Avaliação do efeito produzido pela cafeína sobre o processo de acumulação das memórias

5.3.5.6.1 Cafeína versus acumulação da memória depressora

A Fig. 54 mostra que o efeito da cafeína sobre o IKMDmax foi dependente do número de CCond empregadas. Nos experimentos com apenas 01 CCond, a adição de 5 mM de cafeína ao banho não modificou estatisticamente o IKMDmax, que variou de $76,69 \pm 5,37$ para $66,36 \pm 4,84\%$, ($n = 3$, $p > 0,05$). Contudo, quando o miocárdio atrial foi condicionado por 09 CCond, o IKMDmax sofreu uma redução estatisticamente significativa de $79,27 \pm 4,95$ para $47,50 \pm 4,04\%$ ($n = 3$; $p < 0,05$). O efeito da cafeína (5 mM) sobre a VmedAMD foi dependente do número de CCond empregadas no experimento. Quando o miocárdio foi submetido a 01 CCond a VmedAMD apresentou redução que não foi estatisticamente significativa, tendo variado de $-1,32 \pm 0,54$ para $-0,75 \pm 0,18$ gf/s ($n = 3$; $p > 0,05$). Todavia, quando o experimento foi feito em miocárdio pré-condicionado com 09 CCond, essa VmedAMD diminuiu significativamente de $-1,39 \pm 0,26$ para $-0,49 \pm 0,08$ gf/s ($n = 3$, $p < 0,05$).

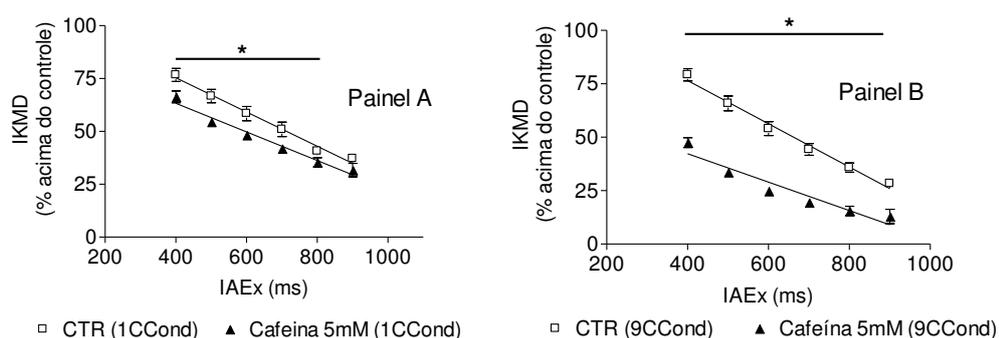


Figura 54 – Efeito da concentração de cafeína sobre o IKMD e a VmedAMD, em função do IAEx e do número de CCond. Painel A: 01 CCond; Painel B: 09 CCond. Os estudos foram feitos em situação controle e após adição de 5 mM de cafeína ao banho ($n = 3$; $*p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 400 V; 1 Hz).

5.3.5.6.2 Cafeína versus acumulação da memória excitadora

A importância da liberação do cálcio intracelular para o desenvolvimento da ME foi avaliada medindo-se o descritor IKME_{max} antes e depois da adição de cafeína ao banho (Fig. 55). Os resultados mostraram que, quando se empregou apenas 01 CCond, a adição de cafeína (5 mM) ao banho reduziu o IKME_{max} de $35,65 \pm 6,27$ para $19,26 \pm 5,74\%$ (45,97%, $n = 3$, $p < 0,05$). Com a preparação pré-condicionada com 09 CCond, o IKME_{max} diminuiu drasticamente de $79,84 \pm 3,72$ para $20,33 \pm 2,89\%$ (74,53%, $n = 3$, $p < 0,05$). Quando o experimento foi realizado com apenas 01 CCond, a adição de 5 mM de cafeína ao banho não alterou a VmedAME, pois, apesar de a inclinação da reta de regressão ter sido reduzida de $-1,13 \pm 0,41$ para $-0,54 \pm 0,22$ gf/s, este resultado não foi estatisticamente significativo ($n = 3$; $p > 0,05$). Todavia, nos testes em que o miocárdio esteve pré-condicionado com 09 CCond, estas potencializaram o efeito da cafeína, promovendo uma redução da inclinação da reta de regressão relativa ao apagamento de $-1,89 \pm 0,44$ para $-0,56 \pm 0,21$ (70,37%; $n = 3$, $p < 0,05$).

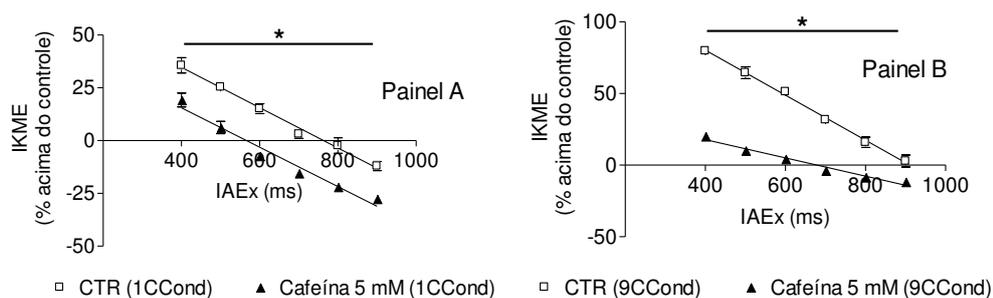


Figura 55 - Efeito da concentração de cafeína sobre o IKME e a VmedAME, em função do IAEx e do número de CCond. Painel A: 01 CCond; Painel B: 09 CCond. Os estudos foram feitos em situação controle e após adição de 5 mM de cafeína ao banho ($n = 3$; $*p < 0,05$; $27,0 \pm 0,1$ °C; Estimulação: 0,5 ms; 100 V; 1 Hz).

6 DISCUSSÃO

Considerações gerais. Nos experimentos realizados neste trabalho, o coração, ao ser retirado do tórax da cobaia, deixou de ser nutrido e oxigenado pelo fluxo coronariano. O sangue, com a riqueza dos seus componentes, era, a princípio, responsável pelo suprimento energético, pelo equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-básico, bem como pelo equilíbrio osmótico entre o meio externo e as células do miocárdio (BERNE e LEVY, 2001, BERS, 2006). Ao ser transferido para a solução de Tyrode contida na cuba, o miocárdio passou a receber apenas sais, glicose e oxigênio. Este carboidrato foi a única fonte de energia disponível para que o tecido atrial pudesse executar suas tarefas elétricas e contráteis. Por outro lado, a oxigenação e a eliminação de gás carbônico do tecido deixou de ser feita através da hemoglobina e dos capilares para depender apenas das propriedades difusionais dos gases no tecido miocárdico. No banho, o átrio trocou gases e nutrientes com o meio extracelular apenas por difusão. Este fenômeno depende de fatores entre os quais estão: a diferença de concentração dos gases, a temperatura do meio etc. Deve ser considerado que na cuba, sob superfusão com Tyrode, o átrio permaneceu a 27°C. Esta temperatura é cerca de 11 graus menor do que a temperatura do órgão, quando estava situado no interior do tórax do animal. Além disso, por não haver proteína na solução de Tyrode, o tecido cardíaco apresentou uma tendência para a formação de edema tissular. Em síntese, a nutrição por difusão, a baixa temperatura e a ausência de pressão oncótica na solução de Tyrode representam fatores estressantes para o miocárdio e exigem dele uma adaptação adequada ao novo meio a fim de continuar a desempenhar com eficiência as suas funções elétricas e mecânicas.

O exemplo mostrado na Fig. 16 deixa claro que o átrio de cobaia, removido do animal e colocado em solução de Tyrode a 27°C, apresenta sinais de adaptação ao novo meio. Inicialmente, a preparação foi mantida quiescente por 30 minutos. Durante este período esperou-se que ela se adaptasse à nova temperatura, osmolaridade, fonte de energia e à ausência

de pressão oncótica. Passada esta fase, o átrio foi estimulado eletricamente para contrair-se de forma rítmica com frequência de 1 Hz. O que se observou a partir daí foi que a preparação começou a gerar força de contração, cuja amplitude aumentou progressivamente até alcançar um valor final de equilíbrio. Isso somente foi atingido cerca de 20 minutos após o início da estimulação, tendo a amplitude da força se estabilizado num valor aproximadamente 30 % menor do que a força máxima desenvolvida logo no início da estimulação. Paralelamente ao aumento da força sistólica, a preparação apresentou um relaxamento diastólico progressivo que alcançou cerca de 100 mgf. A interpretação que oferecemos para esse comportamento é a de que o miocárdio, ao trabalhar, aprendeu a otimizar o seu sistema de bombeamento de cálcio citoplasmático, de forma a reduzir a concentração desse íon no citoplasma, após cada contração. Com menos cálcio livre no citoplasma, as células puderam relaxar mais intensamente do que relaxavam, quando o tecido esteve quiescente (BERS, 2002, CHEMLA et al., 2000). Assim, de certa forma o miocárdio ‘aprendeu’ a operar o seu sistema de bombeamento de cálcio. Semelhante aprendizado também se manifestou na amplitude da força sistólica. Ao se adaptar à realidade do novo meio externo, a preparação biológica ‘aprendeu’ a regular sua contratilidade da forma a adequá-la à quantidade de energia disponível. Talvez, por isso, a grande magnitude das primeiras contrações, vistas logo após o reinício da estimulação, não se mantiveram.

Este trabalho pressupõe que o ato de aprender subentende implicitamente a capacidade de o sistema reter informação, a fim de poder usá-la para tomar decisões ou para conseguir desenvolver estados de equilíbrios que sejam adaptados à realidade das condições operacionais de que dispõe. Atualmente, é aceito que há memórias distribuídas nas diversas partes dos sistemas biológicos complexos, tal como ocorre no ser vivo. Assim, processos de memorização podem ser encontrados no sistema imunológico (WANG et al., 2004; SEAMAN et al., 2004; VITTETA et al., 1991;) e no sistema digestivo (FURNESS et al., 2000). Estas memórias, contudo devem ser entendidas como memórias operacionais que retêm informação para permitir que, a nível local, algum grau de decisão possa ser

tomado. Este tipo de memória difere, contudo daquela que existe no sistema nervoso central, pois esta permite que as decisões sejam alcançadas, mesmo fora da dimensão objetiva, permitindo a dedução e previsão de fatos esperados para o futuro ou então proporciona condições para o desenvolvimento de pressupostos de natureza filosófica (ZOGHI, 2004; ZOGHI et al., 2004; ROSEN, 2001).

Para examinar a MD, usamos o clássico conhecimento de que as extrassístoles, por serem prematuras, surgem com pequena amplitude, interpretando este evento como decorrente da expressão da acumulação de MD. Para avaliar a capacidade tissular de construir e apagar a MD, empregamos um protocolo experimental baseado na produção de extrassístoles, estas obtidas com diferentes IAEx (Seed e Walker, 1988). Por sua vez, o exame dos processos de construção e de apagamento da ME foi realizado através da análise do comportamento da 1a.CPEx, esta produzida após uma pausa de duração igual ao período controle (1s). Esta pausa foi concebida, inicialmente, por Shimizu et al. (2000) e foi inserida no protocolo original de Seed e Walker para permitir o miocárdio ter tempo para apagar a carga de MD gerada pelo batimento extrassistólico. Com isso, favoreceu-se a expressão da ME, esta traduzida pelo fato de que, após a pausa de Shimizu, a amplitude da 1a.CPEx apresentou-se maior do que a amplitude das contrações controle. O 'overshoot' de força criado na 1a.CPEx reflete a carga de ME transferida para este batimento e formada, tanto pelas contrações controle (neste caso operando como condicionantes), quanto pela contração extrassistólica precedente.

No coração, é conhecido que toda vez que uma extrassístole ocorre, segue-se uma pausa pós extrassistólica que permite às câmaras cardíacas se encherem com maior volume de sangue, estirando mais as suas fibras e gerando uma primeira contração pós-extrassistólica mais forte. Este fenômeno foi bem explicado por Frank (1895, *apud* BERNE et al., 1979) e por Starling (1918, *apud* BERNE et al., 1979) e está baseado na Teoria dos Filamentos Deslizantes (GORDON et al., 1966). A lei de Frank & Starling, contudo, não explica convenientemente a potenciação pós-extrassistólica observada nos experimentos realizados neste trabalho, pois toda medida de

força de contração foi tomada em átrios que se contraíram em situação isométrica. Assim, a potenciação das primeiras contrações pós-extrassistólicas (YUE, 1985) exige que se encontre uma outra explicação que esteja baseada nos conhecimentos atuais a respeito dos mecanismos básicos envolvidos com a contração do músculo cardíaco.

À semelhança de outros tipos de músculos, o músculo cardíaco gera força em virtude da formação de pontes de ligação entre os filamentos finos de actina e a cabeça dos filamentos grossos de miosina (MacINTOSH, 2003). Isso acontece quando a tropomiosina é deslocada de sua posição natural na goteira existente no duplo filamento de actina, deixando livres os sítios que têm afinidade para se ligarem à miosina. A tropomiosina é uma proteína longa que se move toda vez que se forma ou se desfaz o complexo Troponina C/cálcio (TnC/Ca^{2+}). A formação do complexo TnC/Ca^{2+} ocorre quando a concentração de cálcio livre no citoplasma aumenta (VOET et al; 2000) A principal fonte deste cálcio é, no músculo cardíaco, o retículo sarcoplasmático (RS). Nesta organela, o cálcio se acumula graças à ação de um sistema de bombeamento altamente eficiente denominado de SERCA ("Sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase") (HUKE et al, 2003). O cálcio contido no RS sai através dos canais liberadores de cálcio, também conhecidos como canais receptores de rianodina. A abertura desses canais é promovida pelo cálcio proveniente do meio extracelular, passando pelos canais de cálcio tipo L existente no sarcolema. Os canais da rianodina se localizam na cisterna do RS, em frente à membrana dos túbulos T (ARVANITIS et al., 2010). O conjunto formado pela membrana do túbulo T, pelo estreito espaço intracelular contido entre ela e a membrana do RS, e pela própria membrana do RS, é conhecido como díade. Assim, a díade se compõe pelas duas membranas e pela fenda diádica (MARBAN, 2002, GATHERCOLE et al., 2000; NIGGLI, 1999). Nas díades estão situados os couplons formados por cerca de 100 canais de cálcio tipo L e 20 canais de rianodina. Quando o cálcio do meio extracelular ingressa na célula, através dos canais tipo L, ele induz a abertura dos canais de rianodina da membrana do RS, permitindo a liberação de cálcio ali estocado (BERS, 2004; DULHUNTY et al., 2002; MARX, 2001; ZHANG et al., 1997). Este fenômeno,

conhecido como “liberação de cálcio induzida por cálcio” (CICR, “calcium-induced calcium release”) é responsável pelo cálcio citoplasmático livre que vai promover a contração muscular (BERS, 2002, KITCHENS, 2003).

A geração de força no miocárdio é, como nos demais tecidos musculares, um fenômeno de natureza complexa. Os mecanismos básicos envolvidos com este processo incluem agentes estruturais e funcionais pertencentes ao patrimônio celular, bem como fatores externos que independem da célula, tais como composição e osmolaridade do meio extracelular, temperatura, campos elétricos etc. Deste modo, a amplitude e demais características da força de contração miocárdica, antes de alcançar um dado equilíbrio, exige que a célula regule os seus próprios mecanismos, equilibrando-os com os fatores que lhe são externos. Por isso, o mesmo tecido miocárdico pode, em situações experimentais ou fisiológicas diversas, contrair-se de modo também diverso. Se o miocárdio quiescente for colocado em situação experimental diferente da fisiológica em que estava acostumado a trabalhar e for desafiado a contrair-se por estimulação elétrica adequada, ele demandará algum tempo para alcançar as características do seu novo perfil mecânico. Isto exigirá que alcance um novo estado de equilíbrio inotrópico. Para isso, informações devem ser acumuladas a cada batimento, de forma a construir - e em certa proporção também desconstruir - sua atividade mecânica, visando alcançar um rendimento otimizado. Cada um destes eventos, deve variar em proporções adequadas, de modo que, por fim, quando tais processos se tornarem equivalentes, a amplitude das contrações passará a ser a mesma para todos os batimentos do miocárdio sob experimentação. Nesta situação, o músculo terá, assim, alcançado o seu equilíbrio contrátil, atendendo às condições de trabalho a ele oferecidas.

O presente estudo fixou os agentes externos (temperatura, oxigenação, frequência de estimulação, acesso e disponibilidade a nutrientes etc.) e também o grau de estiramento do tecido miocárdico estudado (1 gf), permitindo, assim, que a preparação biológica respondesse apenas ao elemento experimental testado.

O processo de redução da força contrátil do miocárdio foi aqui interpretado como a expressão de uma MD, enquanto que o aumento da

força de contração foi avaliado como sendo a capacidade de o tecido gerar uma ME.

Para sistematizar o presente trabalho, começaremos por analisar os resultados obtidos sobre a expressão das memórias em função de diferentes tratamentos impostos à preparação biológica. Por fim, discutiremos o processo de acumulação de MD e ME e os mecanismos que possam, por ventura, estar a elas associados.

Avaliação da expressão e dos mecanismo formadores da MD e ME.

Uma questão crucial que se levanta é identificar a sede de cada uma das memórias contráteis. Esta sede pode estar situada numa dada estrutura da anátomo-fisiologia celular ou pode estar distribuída entre estruturas anatômicas e mecanismos fisiológicos, dando a ela uma sede virtual. Os caminhos para investigar os mecanismos básicos que suportam a MD e a ME devem incluir os tratamentos experimentais que sejam largamente conhecidos.

Memória contrátil não é memória elétrica: variação da concentração de potássio extracelular foi usada para distingui-las. Chatterjee (1969 a,b), Rosenbaum (1982), Alessandrini et al. (1997), Yu et al (1999), Herweg et al. (2001), Rosen (2001), Kolb, (2002), Libbus (2002), Petberg e Rosen (2004), Chandra et al. (2003), Rosen e Plotnikov (2002), Moss (2004), Sosunov et al. (2008), Kooshkabadi et al. (2009) propugnaram pela existência de uma memória de natureza elétrica no miocárdio de mamíferos. A expressão desta memória estava associada ao deslocamento da alça vetorial da onda T do vetocardiograma de cães, após terem sido mantidos sob estimulação elétrica artificial.

Para distinguir o objetivo deste trabalho daqueles referentes à memória elétrica, as MD e ME foram testadas alterando-se os potenciais de repouso das células miocárdicas. Isto foi feito submetendo-se o músculo cardíaco a diferentes concentrações de potássio (Figs. 30 e 31). Os resultados mostraram que os descritores destas memórias não foram modificados, indicando que elas representam um fenômeno miocárdico

diverso daquele relativo à memória elétrica. É sabido que o miocárdio, mesmo em coração isolado de animal, contém terminações nervosas capazes de liberar estoques de acetilcolina e, assim, de modificar o comportamento contrátil por aumentar a condutância da membrana celular ao potássio. Este efeito pode contribuir para alterar o potencial de repouso das células. Para suprimi-lo, experimentos foram conduzidos em presença de atropina, a fim de bloquear os receptores muscarínicos (Figs. 35 e 36). Os resultados mostraram que, em preparações incubadas com atropina, não houve qualquer modificação na expressão ou no apagamento de MD ou ME, sugerindo, assim, que a memória contrátil seja um fenômeno diferente daquele relativo à memória elétrica.

Avaliação do papel do potássio nos mecanismos relativos à MD e ME. Para complementar os resultados obtidos com concentrações diferentes de potássio no meio extracelular, bem como os que foram vistos submetendo-se as preparações à atropina, investigamos o comportamento das memórias, após o bloqueio inespecífico de canais para potássio. A adição de TEA ao banho não modificou os descritores de MD (Fig. 40), porém alterou os descritores de ME. Com TEA, tanto o IKME quanto a VmedAME foram reduzidos (Fig. 41). Este pode ser um efeito decorrente apenas do bloqueio dos canais de potássio, mas pode, por outro lado, refletir a alteração na duração do potencial de ação (DPA). É sabido que durante a fase de platô, quando a célula miocárdica permanece despolarizada, há um aumento da condutância de sua membrana para o cálcio. É nesta fase que ocorre a principal entrada de cálcio nas células, o que se faz via canais de cálcio do tipo L. Este cálcio é fundamental para promover a contração muscular, mas se, além disso, ele também tiver papel ativo nos processos de construção e de desconstrução de ME, então seria esperado que o TEA produzisse um efeito semelhante àquele visto com o aumento do cálcio extracelular. Esta hipótese foi confirmada, tal como se verá adiante.

O fato de o TEA ter alterado os descritores de ME, porém não ter modificado os de MD sugere que os níveis de cálcio intracelular necessários para promover MD devem ser maiores do que aqueles que constroem ME.

Influência do cálcio sobre as memórias contráteis. A contribuição do cálcio para o mecanismo da contração muscular tem sido largamente estudada (GUERRERO-HERNANDEZ et al., 2010; COOPER et al., 2010; LAVER, 2007; RICHARD et al., 2006; BLATTER et al., 2003). Em se tratando de fenômenos contráteis, é justificável que se estude a possível influência que este íon possa exercer sobre o desenvolvimento e o apagamento das memórias contráteis.

As correntes sarcolemas de cálcio promovem a liberação do cálcio estocado no RS (BERS et al., 2004). A elevação do cálcio livre intracelular induz a interação deste íon com a troponina C, levando ao processo de contração muscular. Os resultados vistos na Fig. 46 mostraram que a elevação do cálcio externo reduziu tanto o IKMDmax, quanto a VmedAMD. Isto indica que esta manobra experimental dificulta a transferência de MD, gerada batimentos precedentes, para a extrassístole, bem como dificulta o apagamento desta memória.

No que se refere a ação da concentração de cálcio extracelular sobre os descritores de ME, os resultados, sumarizados na Fig. 47, mostraram que o aumento do cálcio promoveu uma redução do IKMEmax, indicando que este íon dificulta a expressão da ME. Além disso, o cálcio elevado diminuiu a VmedAME, sugerindo que ele atua no sentido de estabilizar as informações que levam à construção de ME.

Influência da cafeína sobre as memórias contráteis. A cafeína é o alcalóide 1,3,7-trimetilxantina. Ela promove, em dose adequada, um pronunciado efeito estimulante sobre o músculo cardíaco (Si, et al., 2010). Na sua presença, a força de contração miocárdica é aumentada estando este efeito relacionado à liberação de cálcio dos estoques intracelulares, principalmente, daqueles existentes no RS. Com isto, a concentração citoplasmática de cálcio livre se torna maior e a força de contração aumenta. Isto pode se passar sem que haja alteração nas correntes sarcolemas de cálcio. O estudo do efeito da cafeína sobre as memórias contráteis mostrou que ela reduz tanto a transferência de MD, posto que o IKMDmax diminuiu,

quanto a VmedAMD, uma vez que este descritor também foi reduzido pela ação do alcalóide (Fig. 52). No que tange à ME (Fig. 53), a cafeína também reduziu o IKME_{max} e a VmedAME. Estes resultados mostram que o efeito da cafeína sobre a expressão e o apagamento das memórias contráteis muito se assemelha àquele visto com a elevação do cálcio extracelular (Figs.46 e 47) e se assemelha parcialmente com o efeito produzido pelo TEA sobre a ME (Fig. 41).

Estudo dos processos de acumulação das memórias contráteis

Prospecção guiada pelo número de Contrações Condicionantes. A amplitude da força de contração miocárdica, gerada em cada batimento, depende da expressão simultânea de ambas as memórias MD e ME. O protocolo de Conde-Garcia permitiu que fosse conhecido que, nas condições experimentais empregadas neste trabalho, tanto a expressão, quanto o apagamento destas memórias somente foram afetadas pelos últimos 10 batimentos (Figs. 27 e 28). Assim, batimentos que ocorram num passado mais longínquo, não contribuem para a amplitude da força de uma dada contração miocárdica.

Propecção guiada pelo potássio, atropina e TEA. Manobras experimentais que visaram alterar os fluxos de potássio através do sarcolema, não produziram efeito sobre os descritores de MD ou de ME. Os estudos foram realizados em átrios submetidos a diferentes concentrações de potássio (Figs. 32 e 33), ou à incubação com atropina (Figs. 37 e 38.) ou TEA (Figs. 42 e 43). Isto sugere que as correntes de potássio na exercem um papel importante nos mecanismo de acumulação nem de apagamento de MD ou ME.

Prospecção guiada pelo efeito do cálcio e da cafeína sobre a MD. Nossos resultados mostraram que nos experimentos em que se empregou 01 CCond, o aumento do cálcio externo de 1,37 para 5,47 mM reduziu o IKMD_{max}, porém, em preparações pré-condicionadas com 09 CCond a elevação do cálcio externo não modificou esta variável. Para compreender

este resultado, alguns experimentos foram realizados visando mobilizar os estoques intracelulares de cálcio, ao invés de alterar as correntes sarcolemas deste íon. Isto foi feito adicionando-se cafeína ao banho. Na presença deste alcalóide e em preparações pré-condicionadas com 01 CCond, a IKMDmax não foi modificada. NO entanto, quando 09 CCond foram empregadas para pré-condicionar o miocárdio, a cafeína reduziu de forma significativa o IKMDmax. Como pode o cálcio influenciar o processo de acumulação, a fim de gerar MD? Para responder a esta questão nós consideraremos dois mecanismos de cálcio nas células miocárdicas. O primeiro refere-se à corrente de cálcio que entra nas células cardíacas via canais de cálcio do tipo L. O segundo, está relacionado à liberação de cálcio dos estoques intracelulares, principalmente do RS. Ambos os mecanismos contribuem para aumentar o cálcio livre no citoplasma e, por esta razão, promover a força de contração miocárdica. Para compreender estas questões, nós fizemos experimentos variando a corrente de entrada de cálcio pelo canais tipo L, o que pode ser realizado elevando-se a concentração de cálcio no meio externo. Em outros experimentos, nós modificamos a liberação do cálcio estocado no RS, usando cafeína. Estas abordagens foram feitas em átrio pré-condicionado com 01 ou com 09 CCond. Nossos resultados mostraram que em preparações pouco condicionadas (01 CCond), o aumento do cálcio externo promoveu um aumento da amplitude das extrassístoles, sugerindo que, neste caso, a transferência de MD tenha sido reduzida. Todavia, quando os átrios foram fortemente pré-condicionados (09 CCond), a elevação do cálcio externo não alterou as amplitudes das extrassístoles, indicando que a transferência de MD é, sem dúvida, um fenômeno que depende da carga de cálcio intracelular, mas é também um fenômeno que admite saturação. Por esta razão, o pré-condicionamento do miocárdio com 09 CCond transfere para as células uma carga de cálcio que é suficiente para maximizar suas forças de contração, o que equivale a dizer que o forte pré-condicionamento minimiza a transferência de MD. Este efeito ocorre de forma independente da concentração de cálcio no meio extracelular ser alta ou baixa.

A contribuição dos estoques intracelulares de cálcio para o processo de acumulação de MD foi estudada usando-se a habilidade de a cafeína liberar o cálcio contido no RS. Os resultados surpreendentemente mostraram que a contribuição do cálcio livre intracelular para a transferência de MD depende de onde se originou o cálcio, isto é, se ele veio do meio extracelular ou se veio do RS. Esta observação pode ser justificada porque quando o cálcio se originou do RS (adição de cafeína, p.ex.) a transferência de MD se comportou de forma diferente daquela observada quando a fonte de cálcio havia sido o meio externo. Quando a cafeína foi usada em átrio fracamente condicionado (01 CCond) não se observaram alterações nas amplitudes das extrassístoles. Isto sugere que a transferência de MD independe da liberação de cálcio a partir do RS nas preparações que foram pré-condicionadas com apenas 01 CCond. Tal comportamento pode ser entendido se aceitarmos que um “pool” mínimo de cálcio seja construído pelo pré-condicionamento com 01 CCond. Entretanto, em átrios fortemente pré-condicionados (09 CCond) a adição de cafeína pôde mobilizar uma quantidade maior de cálcio do RS. Este “pool” extra foi construído durante o longo período de condicionamento (09 CCond). Tal hipótese explica o aumento na amplitude das extrassístoles observadas nestes casos. O aumento na amplitude das força é um sinal direto da diminuição da transferência de MD entre os batimentos.

Prospecção guiada pelo efeito do cálcio e da cafeína sobre a ME. A elevação da concentração de cálcio no meio extracelular não modificou os descritores de ME em preparações pré-condicionadas com 01 CCond. Entretanto, quando elas foram pré-condicionadas com 09 CCond a elevação do cálcio externo reduziu o IKME_{max} e também a VmedAME. Nas preparações pré-condicionadas com 01 CCond, a adição de cafeína ao banho reduziu o IKME_{max}, mas não alterou a VmedAME. Quando as preparações foram pré condicionadas com 09 CCond a cafeína reduziu drasticamente o IKME_{max} e também a VmedAME.

Com respeito à ME avaliada em átrios pré-condicionados com 01 CCond, o aumento do cálcio externo de 1,37 para 5,47 mM não modificou a

1a.CPEx, indicando que a transferência de ME não foi afetada por tal manobra experimental. Contudo, quando os estoques de cálcio intracelulares foram saturados com 09 CCond, a elevação do cálcio extracelular reduziu a amplitude da 1a.CPEx, sugerindo que a ME foi negativamente afetada por esta manobra. Assim, nós podemos concluir que, em preparações pré-condicionadas com 09 CCond, a transferência de ME foi reduzida.

A cafeína adicionada ao banho promoveu uma redução do IKME_{max} tanto em preparações pré-condicionadas com 01 quanto com 09 CCond. Isto sugere que a ME é mais influenciada pelo cálcio proveniente do RS do que aquele que vem do meio extracelular.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho descreveu a capacidade de o miocárdio construir e desconstruir memórias que atuam sobre a sua contratilidade, sugerindo que elas têm papel relevante na busca de equilíbrio do tecido biológico com as demandas de trabalho e as fontes de energia e nutrição disponíveis no meio. Foram investigados mecanismos que estão relacionados com os processos de acumulação e de expressão tanto da memória depressora, quanto da memória estimuladora. Deste estudo pôde-se concluir que:

1. As memórias contráteis são de dois tipos: depressora e excitadora;
2. As memórias contráteis representam um fenômeno novo e diferente da memória elétrica descrita por outros autores;
3. A amplitude da força de contração do miocárdio, que está em equilíbrio com as demandas e com os recursos nutricionais e energéticos, depende do balanço entre ambas as memórias;
4. Um dado batimento cardíaco expressa um conteúdo de memória que, nas condições experimentais empregadas neste trabalho, é construído durante os últimos 10 batimentos;
5. Os processos de construção e desconstrução (apagamento) envolvem mecanismos associados à carga intracelular de cálcio.

REFERÊNCIAS

ALESSANDRINI, R. S.; McPHERSON, D.D.; KADISH, A.H.; KANE, B.J.; GOLDBERGER, J. J. Cardiac memory: a mechanical and electrical phenomenon. **Am. J. Physiol.**, v. **272**, p.1952-1959, 1997.

ARVANITIS D. A., et al., **Histidine - rich calcium binding protein: the new regulator of sarcoplasmic reticulum calcium cycling**, J Mol Cell Cardiol (2010), doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.021

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Physiology**. 4a Ed, 2001

BERNE, R.; SPERELAKIS, N.; GEIGER, S. R. **Handbook of Physiology**, American Physiological Society, Maryland, 1979.

BERS, D. M. **Altered cardiac myocyte Ca⁺² regulation in heart**. Physiology, v. 21, p. 380 -387, 2006

BERS, D. M. **Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function**. J. Mol. Cell. Cardiol., v. 37, p. 417-429, 2004.

BERS, D. M. **Cardiac excitation-contraction coupling**. Nature, v. 415, p.198-205, 2002.

BLATTER, L. A.; KOCKSKÄMPER, J.; SHEEHAN, K.A.; ZIMA, A. V.; HÜSER, J.; LIPSIUS, S. L. **Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes**. J. Physiol., v.546, p.19-31, 2003.

BRITTSAN, A. G.; [KRANIAS, E. G.](#) **Phospholamban and cardiac contractile function**. J. Mol. Cell. Cardiol., v. 32, n. 12, p. 2131-9, 2000.

CARAFOLI, E. **Calcium signaling: a tale for all seasons**. PNAS, v. 99, n. 5, p. 1115-1122, 2002.

CARVALHO, A.C.C.; BARCELLOS, L. C.; SANTOS, P. E. B.; MASUDA, M. O. **Eletrofisiologia do coração**. In. Fisiologia. Ed. AIRES, M.M. 2a ed., Rio de Janeiro, Brasil: Ed. Guanabara Koogan, 1999

CHANDRA, P.; ROSEN, T. S.; HERWEG, B.; DANILO, P.; ROSEN, M. R. **Left atrial pacing induces memory and is associated with atrial tachyarrhythmias**. Cardiovascular Research, v.60, n. 2, p. 307-314, 2003.

CHATTERJEE, K.; HARRIS, A.; DAVIES, G.; LEATHAM, A. **Electrocardiographic changes subsequent to artificial ventricular depolarization**. Br. Heart J., v.31, p. 770-9, 1969.

CHATTERJEE, K.; HARRIS, A. M.; DAVIES, J. G.; LEATHAM, A **T-wave changes after artificial pacing**. [Lancet](#), v. 12, n. 1, p. 759-60, 1969.

CHEMLA, D.; COIRAULT, C.; HEBERT, J-L.; LACARPENTIER, Y. **Mechanisms of relaxation of the human heart**. NIPS, v. 15, p. 78-83, 2000.

CHIESI, M.; SHWALLER, R. **Reversal of Phospholamban-induced inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} - ATPase by tannin**. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 202, n. 3, p. 1668-1673, 1994.

CONDE-GARCIA, E. A. **Biofísica**. 1ª ed. São Paulo: Savier, 1998. p. 27-49

COOPER, P. J. et al., **Excitation- contraction coupling in human heart failure examined by action potential clamp in rat cardiac myocytes**, J. Mol. Cell. Cardiol. (2010), doi:10.1016/j.yjmcc.2010.04.012

DE PAOLI, P.; CERBAI, E.; KOIDL, B.; KIRCHENGAST, M.; SARTIANI, L.; MUGELLI, A. **Selectivity of different calcium antagonists on T- and L-Type calcium currents in guinea-pig ventricular myocytes**. Pharmacological Research, v. 46, n. 6, p. 491-97, 2002.

DE TOMBE, P. P. **Cardiac myofilaments: mechanics and regulation**. Journal of Biomechanics, v. 36, p. 721–730, 2003.

DORIGO, P.; GAION, R. M.; BERGAMIN, M.; GIACOMETTI, A.; VALENTINI, E.; MORAGNO, I. **Comparison between the cardiac effects induced by**

muzolimine and furosemide in guinea-pig atria. Cardiovascular Drugs and Therapy, v. 4, p. 1477-1486, 1990.

DULHUNTY, A. F.; HAARMANN, C. S.; GREEN, D.; LAVER, D. R.; BOARD, P. G.; CASAROTTO, M. G. **Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle.** Progress in Biophysics & Molecular Biology, v. 79, p. 45-75, 2002.

FABIATO, A. **Calcium-induced calcium release from the cardiac sarcoplasmic reticulum.** Am. J. Physiol., v. 245, p. 1-14, 1983.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F.; RAMESH, V.; **Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles.** [Biophys. J.](#), v. 77, n. 3, p.1528-39, 1999.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; KUNZE, W. A. **Memory in the enteric nervous system.** GUT, v. 47, p. 60-62, 2000.

GATHERCOLE, D. V.; COLLING, D. J.; SKEPPER, J. N.; TAKAGISHI, Y.; LEVI, A. J.; SEVERS, N. J. **Immunogold-labeled L-type calcium channels are clustered in the surface plasma membrane overlying junctional sarcoplasmic reticulum in guinea-pig myocytes-implications for excitation-contraction coupling in cardiac muscle.** [J. Mol. Cell. Cardiol.](#), v. 32, n. 11, p. 1981-94, 2000.

GORDON, A. M.; HUXLEY, A. F. JULIAN, F. J. **The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres.** J. Physiol., v.184, p.170-192, 1966.

GRANZIER, H.; LABEIT, S. **[Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring.](#)** J. Physiol., v. 541, n. 2, p. 335-342, 2002.

GUATIMOSIM, S.; DILLY, K.; SANTANA, L. F.; SALEET JAFRI, M.; SOBIE, E. A.; LEDERER, W. J. **Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transient.** J. Mol. Cell. Cardiol., v.34, n.8, p.941-50, 2002.

GUERRERO-HERNENDEZ, A.; DAGNINO-ACOSTA, A.; VERKHRATSKY, A. **An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+) store: Release**

and leak channels have differential access to a concealed Ca(2+) pool. Cell Calcium, v. 48, p. 143-149, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998.

HAMILTON, S. L.; SERYSHEVA, I.; STRASBURG, G. M. **Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling.** News Physiol. Sci., v. 15, p. 281-284, 2000.

HERWEG, B.; CHANG, F.; CHANDRA, P.; DANILO, P.; ROSEN, M. R. **Cardiac memory in canine atrium. Identification and implications.** Circulation, v. 103, p. 455-461, 2001.

HO, R.; FAN, D.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. **Calcium content of peripheral and central mitochondria in the guinea pig myocardium: electron probe analysis.** Cell Calcium, v. 33, p. 247-256, 2003.

HOBAL, I. A.; MAACK, C.; O'ROURKE, B. **Partial inhibition of sodium/calcium exchange restores cellular calcium handling in canine heart failure.** Circ. Res., v. 95, p. 292-299, 2004.

HOUAISS, A.; VILLAR, M. S. **Dicionário Houaiss da língua portuguesa.** 1ª ed Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

HUKE, S.; LIU, L. H.; BINIAKIEWICZ, D.; ABRAHAM, W. T.; PERIASAMY, M. **Altered force–frequency response in non-failing hearts with decreased SERCA pump-level.** Cardiovascular Research, v. 59, n.3, p. 668-677, 2003.

JI, Y.; LOUKIANOV, E.; PERIASAMY, M. **Analysis of Sarcoplasmic Reticulum Ca+2 Transport and Ca+2 ATPase Enzymatic Properties Using Mouse Cardiac Tissue Homogenates.** Analytical Biochemistry, v. 269, p. 236-244, 1999.

JOHNSON, R.; SWARTZ, M. H. **Electrocardiografia. Uma abordagem simplificada.** Guanabara, 1986

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

KATZ, A. M. **T wave “memory”: possible cause relationship to stress induced change in cardiac ion channels?** J. Cardiovasc. Electrophysiol., v. 3, p. 150-159, 1992.

KAZMIERSKI, S. T.; ANTIN, P. B.; WITT, C. C.; HUEBNER, N.; MCELHINNY, A. S.; LBEIT, S.; GREGORIO, C. C. **The complete mouse nebulin gene sequence and the identification of cardiac nebulin.** [J. Mol. Biol.](#), v. 328, n. 4, p.835-46, 2003.

KITCHENS, S. A.; BURCH, J.; CREAZZO, T. L. **T-type Ca^{2+} current contribution to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in developing myocardium.** J. Mol. Cell. Cardiol., v. 35, n. 5, p. 515–523, 2003.

KOLB, J. M. **Cardiac memory—persistent T wave changes after ventricular pacing.** Journal of Emergency Medicine, v. 23, n. 2, p. 191-197, 2002.

KOOSHKABADI, M.; WHALEN, P.; YOO, D.; LANGBERG, J. **Stretch-activated receptors mediate cardiac memory.** Pacing Clin. Electrophysiol., v. 32, p. 330-335, 2009.

LAVIER, D. R. **Ca^{2+} stores regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channels via luminal and cytosolic Ca^{2+} sites.** Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., v. 34, p. 889-96, 2007.

LANGER, G. A.; BRADY, A. J. **The mammalian myocardium.** John Wiley & sons, New York, USA, 1974

LIBBUS, I.; ROSENBAUM, D. S. **Remodeling of cardiac repolarization: mechanisms and implications of memory.** Cardiac Electrophysiology Review, v. 6, p. 302-310, 2002.

LINKE, W. A.; FERNANDEZ, J. M. **Cardiac titin: molecular basis of elasticity and cellular contribution to elastic and viscous stiffness components in myocardium.** J. Muscle Res. Cell. Motil., v. 23, n. 5-6, p. 483-97, 2002

MacINTOSH, B. R. **Role of calcium sensitivity modulation in skeletal muscle performance.** NIPS News in Physiological Science, v. 18, p. 222-225, 2003.

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

MENDEZ, C.; MOE, G. K. **Atrioventricular Transmission. In: Electrical Phenomena in the Heart.** Ed. De Mello, W. C., Academic Press, New York, p. 263-291, 1972.

MOLEIRO, F. **La repolarización ventricular y el fenómeno de memoria cardíaca.** Avances Cardiol., v. 21, n. 1, p. 55-57, 2001.

MARBAN, E. **Cardiac channelopathies.** Nature, v. 415, p. 213-218, 2002.

MARX, S. O.; GABURJAKOVA, J.; GABURJAKOVA, M.; HENRIKSON, C.; ONDRIAS, K.; MARKS, A.R. **Coupled gating between cardiac calcium release channels (Ryanodine receptors).** Circ. Res., v. 88, p. 1151-1158, 2001.

MOREIRA, C.G.; RIOS, E.; ALVAREZ, E.; BARRIOS, E.; PEREZ, S.; SANCHEZ, A. **The inotropic memory of amphibian myocardium.** Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, v. 85, p. 435-453, 1977.

MOSS, R. L.; FITZSIMONS, D. P. **Frank-Starling Relationship. Long on importance, short on mechanism.** Circ. Res., v. 90, p. 11-13, 2002.

NIGGLI, E. **Ca²⁺ sparks in cardiac muscle: is there life without them?** News Physiol. Sci., v. 14, n. 4, p. 129-134, 1999.

NOTSU, T.; TANAKA, I.; TAKANO, M.; NOMA, A. **Blockade of the ATP-sensitive K⁺ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes.** J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 260, n. 2, p. 702-781, 1992.

OLIVEIRA, E. D.; LEITE, T. S.; SILVA, B. A.; CONDE-GARCIA, E. A. **Inotropic effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck leaf extracts on the guinea pig atrium.** Braz. J. Med. Biol. Res., v. 38, n. 1, p. 111-118, 2005.

OGAWA, Y. **Role of ryanodine receptors.** [Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.](#), v. 29, n. 4, p. 229-74; 1994.

PAES DE CARVALHO, A.; HOFFMAN, B. F.; DE PAULA CARVALHO, M. **Voltage-time course and the effect of acetylcholine on atrial and nodal cells of the rabbit heart.** *J. Gen. Physiol.*, v.54, p. 607-635, 1969

PATBERG, K. W.; ROSEN, M. R. **Molecular determinants of cardiac memory and their regulation.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 36, n. 2, p. 195-204, 2004.

POZZAN, T.; [RIZZUTO, R.](#); [VOLPE, P.](#); [MELDOLESI, J.](#) **Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.** *Physiol. Rev.*, v.74, n. 3, p. 595-636, 1994.

REUTER, H.; HENDERSON, S.A.; HAN, T.; MOTTINO, G.A.; FRANK, J.S.; ROSS, R.S.; GOLDHABER, J.I.; PHILIPSON, K.D. **Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na⁺-Ca²⁺ exchange.** *Cell Calcium*, v. 34, n. 1, p.19-26, 2003.

RICHARD, P.; DANILO, P. J. R.; COHEN, I. S.; BURKHOF, D. ROSEN, M. R. **A role for renin-angiotensin system in the evolution of cardiac memory.** *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, v.10, p. 545-551, 1999.

RICHARD, S.; PERRIER, E.; FAUCONNIER, J.; PERRIER, R.; PERREIRA, L. GÓMEZ, A. M.; BÉNITAH, J. P. **“Ca²⁺- induced Ca²⁺ entry” or how the L-type channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells.** *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 90, p. 118-135, 2006.

RIOS, E.; CASTRO, J.; MOREIRA, C. G. **The inotropic memory of amphibian myocardium, I – Identification of two simultaneous mechanisms and statement of a model.** *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, v. 83, n. 27-42, 1975.

ROSEN, M. R. **The heart remembers: clinical implications.** *Lancet*, v. 357, p. 468-471, 2001.

ROSEN, M. R.; PLOTNIKOV, A. N.; **The pharmacology of cardiac memory.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 94, p. 63-75, 2002.

ROSENBAUM, M. B.; BLANCO, H. H.; ELIZARI, M. V.; LAZZARI, J. O.; DAVIDENKO, J. M. **Electrotonic Modulation of the T Wave and Cardiac Memory**. *Am. J. Cardiol.*, v. 50, n. 2, p. 213-22, 1982.

SCOOTE, M.; POOLE-WILSON, P. A.; WILLIAMS, A. J. **The therapeutic potential of new insights into myocardial excitation-contraction coupling**. [Heart](#), v. 89, n. 4, p. 371-6, 2003.

SEAMAN, M. S.; PEYERL, F. W.; JACKSON, S. S.; LIFTON, M. A.; GORGONE, D. A.; SCHMITZ, J. E.; LETVIN, N. L. **Subsets of memory cytotoxic T lymphocytes elicited by vaccination influence the efficiency of secondary expansion in vivo**. *J. Virol.*, v. 78, n. 1, p. 206-15, 2004.

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

SHIMIZU, J.; ARAKI, J.; IRIBE, G.; IMAOKA, T.; MOHRI, S.; KOHNO, K.; MATSUBARA, H.; OHE, T.; TAKAKI, M.; SUGA, H. **Postextrasystolic contractile decay always contains exponential and alternants components in canine hearts**. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 279, n. 225-233, 2000.

SI, K. W.; LIU, J. T.; HE, L. C.; LI, X. K.; GOU, W.; LIU, C.H.; LI, X.Q. **Effects of caulophine on caffeine-induced cellular injury and calcium homeostasis in rat cardiomyocytes**. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v. 107, p. 976-981, 2010.

SOSUNOV, E. A.; ANYUKHOVSKY, E. P.; ROSEN, M. R. **Altered ventricular stretch contributes to initiation of cardiac memory**. *Heart Rhythm.*, v.5, p. 106-113, 2008.

SUN, X. H.; PROTASI, F.; TAKAHASHI, M.; TAKESHIMA, H.; FERGUSON, D. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle**. *J. Cell. Biol.*, v. 129, n. 3, p. 659-71, 1995.

TANAKA, H.; KAWANISHI, T.; SHIGENOBU, K. **Optical bioimaging: from living tissue to a single molecule: atrio-ventricular difference in myocardial excitation contraction coupling - sequential versus**

simultaneous activation of SR Ca²⁺ release units. J. Pharmacol. Sci., v. 93, p.248-252, 2003.

TRAFFORD, A. W.; DÍAZ, M. E.; EISNER, D. A. **Coordinated control of cell Ca²⁺ loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increase L-Type Ca²⁺ current.** Circ. Res., v. 88, p.195-201, 2001.

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

VASCONCELOS, C. M. L.; ARAÚJO, M. S.; SILVA, B. A.; CONDE-GARCIA, E. A. **Negative inotropic and chronotropic effects on the guinea pig atrium of extracts obtained from *Averrhoa carambola* L. leaves.** Braz J. Med. Biol. Res., v. 38, n. 7, p. 1113-1122, 2005.

VITETTA, E. S.; BERTON, M. T.; BURGER, C.; KEPRON, M.; LEE, W. T.; YIN, X. M. **Memory B and T cells.** Annu. Rev. Immunol., v. 9, p. 193-217, 1991.

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

WANG, R. X.; BOLAND, G. J.; VAN HATTUM, J.; DE GAST, G. C. **Long-term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination.** World J. Gastroenterol., v. 10. n. 2, p. 260-263, 2004.

WEST, T. C. **Electrophysiology of the sinoatrial node.** In: **Electrical phenomena in the heart.** Ed De Mello, W.C. Academic Press, New York, 1972

WIER, W. G.; BALKE, C. W. **Ca²⁺ release mechanisms, Ca²⁺ sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle.** Circ. Res., v. 85, p. 770-776, 1999.

ZAVECZ, J. H.; LEVI, R. **Histamine-induced negative inotropism: mediation by H1-receptors.** J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 206, n. 2, p. 274-80, 1978.

ZHANG, L.; KELLEY, J.; SCHMEISSER, G.; KOBAYASHI, Y. M.; JONES, L. R. **Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor.** The Journal of Biological Chemistry., v. 272, p. 23389-23397, 1997.

ZOGHI, M. **Cardiac Memory: Do the Heart and the Brain Remember the Same?** Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology. v. 11, p. 177-182, 2004.

[ZOGHI, M.](#); [NALBANTGIL, S.](#) **Electrical stunning and hibernation: suggestion of new terms for short- and long-term cardiac memory.** [Europace](#), v. 6, n. 5, p. 418-24, 2004

YU, H.; MCKINNON, D.; DIXON, J. E.; GAO, J.; WYMORE, R.; COHEN, I. S.; DANILO, P. J. R.; SHVILKIN, A.; ANYUKHOVSKY, E. P.; SOSUNOV, E. A.; HARA, M.; ROSEN, M. R. **Transient outward current, I_{to1} , is altered in cardiac memory.** Circulation, v. 99, n. 14, p.1898-905, 1999.

YUE, D. T.; BURKHOFF, D.; FRANZ, M. R.; HUNTER, W. C.; SAGAWA, K. **Postextrasystolic potentiation of the isolated canine left ventricle. Relationship to mechanical restitution.** Circ. Res., v. 56, n. 3, p. 340-350, 1985.