

Daniele Pires Magalhães Espírito Santo

**Simulação de Potencial de Ação Espontâneo em Miócitos Cardíacos do  
Ventrículo Esquerdo de Camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Modelagem Computacional.

Orientador: Prof. D.Sc. Rodrigo Weber dos Santos

Coorientador: Prof. D.Sc. Saul de Castro Leite

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Espírito Santo, Daniele Pires Magalhães.

Simulação de Potencial de Ação Espontâneo em Miócitos Cardíacos do Ventrículo Esquerdo de Camundongos / Daniele Pires Magalhães Espírito Santo. -- 2014.

89 p. : il.

Orientador: Rodrigo Weber dos Santos

Coorientador: Saul de Castro Leite

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional, 2014.

1. modelos cardíacos. 2. arritmia. 3. liberação espontânea de cálcio. 4. potenciais de ação espontâneos. I. Santos, Rodrigo Weber dos, orient. II. Leite, Saul de Castro, coorient. III. Título.

Daniele Pires Magalhães Espírito Santo

**Simulação de Potencial de Ação Espontâneo em Miócitos Cardíacos do  
Ventrículo Esquerdo de Camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Modelagem Computacional.

Aprovada em 29 de Agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. D.Sc. Rodrigo Weber dos Santos - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. D.Sc. Saul de Castro Leite - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. D.Sc. Thales Nicolau Prímola Gomes  
Universidade Federal de Viçosa

---

Prof. D.Sc. Luis Paulo da Silva Barra  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico este trabalho aos meus  
pais e irmão, ao meu esposo  
Filipe e em especial aos meus  
orientadores.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me capacitar ao enfrentar todos os momentos, inclusive os mais difíceis.

Aos meus pais por todos os ensinamentos e pelo amor incondicional, que são a base da minha essência, o meu maior exemplo de perseverança.

Ao meu irmão Fábio pela amizade e carinho.

Ao meu esposo Filipe pela compreensão, apoio e amor em todos os momentos.

Ao meu orientador Rodrigo pelo conhecimento transmitido, pela paciência, incentivo e amizade.

Ao meu co-orientador Saul pela atenção e dedicação.

À Natália e ao Reginaldo por estarem sempre à disposição.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos, inclusive aos que fazem parte do Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, à minha amiga Fernanda, sei que posso contar com você como uma irmã.

*‘O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir. Uma pessoa não pode deixar de se sentir reverente ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que a pessoa tente apenas compreender um pouco mais desse mistério a cada dia. Nunca perca uma sagrada curiosidade. ’*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

A arritmia ventricular maligna é uma das principais causas de morte no mundo. Muitas vezes o início de um episódio de arritmia está associado a uma excitação inoportuna no coração, também denominada extra-sístole, ou Potencial de Ação Espontâneo (PAE). O surgimento de PAEs pode estar relacionado a mudanças estruturais ou moleculares nos canais iônicos e a alterações no ciclo de cálcio intracelular. Anormalidades no ciclo de cálcio podem gerar transientes de cálcio espontâneos (TCEs) e estes podem desencadear Potenciais de Ação Espontâneos (PAEs). Estudos experimentais mostram que o surgimento de TCEs é mais frequente sob a estimulação  $\beta$ -Adrenérgica. Em experimentos recentes, notou-se que a presença de episódios de TCEs em cardiomiócitos saudáveis não desencadeia a geração de PAEs. Em contrapartida, em camundongos com a mutação de super expressão da bomba NCX (NaCa), PAEs foram observados em miócitos isolados e foram relacionados a episódios de TCEs. O principal objetivo deste trabalho foi a simulação da formação de PAEs utilizando modelos computacionais desenvolvidos para cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de camundongos. Em particular os modelos computacionais foram capazes de reproduzir os cenários experimentais descritos acima, relacionando a geração de PAEs com a estimulação  $\beta$ -Adrenérgica e alterações de canais iônicos como a mutação NCX. Dessa forma, as simulações computacionais apresentadas neste trabalho permitem uma melhor compreensão dos complexos fenômenos associados a arritmias cardíacas.

**Palavras-chave:** modelos cardíacos. arritmia. liberação espontânea de cálcio. potenciais de ação espontâneos.

## ABSTRACT

Malignant ventricular arrhythmias are the major cause of death around the world. The beginning of an episode of arrhythmia is often associated with ectopic beats in the heart, also called extrasystole, or Spontaneous Action Potential (SAP). The development of SAP may be related to structural or molecular changes in ion channels and changes in intracellular calcium cycle. Abnormalities in calcium cycle can result in Spontaneous Calcium Transients (SCT) and these can trigger SAP. Experimental studies show that the development of SCT is more common under  $\beta_1$ -adrenergic stimulation. However, we found, in recent experiments, that the presence of episodes of SCT in healthy cardiomyocytes does not trigger the development of SAP. On the other hand, on mice presenting mutation of overexpression of NCX (NaCa) pump, SAP were observed in isolated cardiomyocytes and were related to episodes of SCT. Thus, we aimed, in this study, to simulate development of SAP using computational models developed for cardiomyocytes of left ventricle of mice. The computational models were able to reproduce the experimental scenarios described above, relating the development of SAP to the  $\beta$ -adrenergic stimulation and to the changes of ion channels as the NCX mutation. Therefore, the computational simulations showed in this work allow the best comprehension of the complex phenomena associated with cardiac arrhythmia.

**Keywords:** cardiac modeling. arrhythmia. spontaneous calcium release. spontaneous action potentials.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Justificativa .....	14
1.2	Objetivos .....	15
2	Eletrofisiologia Cardíaca .....	17
2.1	Estruturas Subcelulares .....	18
2.1.1	<i>Membrana Celular</i> .....	19
2.2	Potencial de Ação e Excitabilidade .....	21
2.3	Ciclo de $Ca^{2+}$ e algumas particularidades .....	24
2.4	Oscilações de Cálcio .....	26
2.5	O mecanismo de Liberação de $Ca^{2+}$ através do Receptor Rianodina - RR .....	27
2.5.1	<i>Etapas do LCIC</i> .....	29
2.6	Miofilamentos e contratilidade .....	30
2.7	Os mecanismos que atuam no processo de relaxamento do cardiomiócito .....	32
2.7.1	<i>Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA)</i> .....	33
2.7.2	<i>O Trocador <math>Na^+Ca^{2+}</math> (NCX)</i> .....	34
2.8	Liberação espontânea de $Ca^{2+}$ - LEC .....	35
2.9	O sistema nervoso autônomo SNA e as oscilações dos neurônios simpáticos .....	35
2.10	Estimulação $\beta$ - Adrenérgica ( $\beta$ 1-AR) .....	37
2.11	Isoproterenol .....	38
2.12	Fisiopatologia da Bomba $NaCa$ - Mutação NCX .....	39
3	Metodologia .....	40
3.1	Modelo Celular .....	40
3.1.1	<i>Difusão e Lei de Fick</i> .....	40
3.1.2	<i>Modelo elétrico para a membrana</i> .....	41
3.1.3	<i>Potencial de equilíbrio de Nerst</i> .....	42

3.2	Modelos para a Corrente Iônica .....	43
3.3	Modelos para os Canais Iônicos .....	44
3.3.1	<i>Modelo de Dois Estados</i> .....	44
3.4	Cadeias de Markov .....	46
3.5	O Modelo Computacional de Bondarenko <i>et al.</i> (2004) .....	48
3.6	O modelo computacional de Bondarenko (2014) .....	50
3.7	Simplificação do Modelo .....	53
3.8	O modelo de Chen <i>et al.</i> (2011) .....	55
3.9	Simulação Artificial de LECs .....	59
3.10	Simulação estocástica de LECs .....	59
3.10.1	<i>Estimativa do número de sarcômeros vizinhos ativos adjacentes:</i>	
	$m_{NSA}$ .....	63
3.10.1.1	<i>Primeira Hipótese</i> .....	63
3.10.1.2	<i>Segunda Hipótese</i> .....	66
3.11	Simulação da mutação <i>NCX</i> .....	68
3.12	Implementação e Ambiente Computacional .....	69
3.13	Experimentos Realizados .....	71
3.13.1	<i>Modelo de Bondarenko et al. (2004)</i> .....	71
3.13.2	<i>Modelo de Bondarenko (2014)</i> .....	71
4	Resultados e Discussão .....	72
4.1	Simulação de LEC de forma artificial .....	72
4.1.1	<i>Modelo de Bondarenko et al. (2004)</i> .....	72
4.1.2	<i>Modelo de Bondarenko (2014)</i> .....	74
4.1.2.1	<i>Reproduzindo estímulo <math>\beta_1 - AR</math> (ISO) e a mutação <i>NCX</i></i> .....	76
4.1.3	<i>Simulando LEC estocasticamente</i> .....	78
4.2	Trabalhos Futuros .....	79
5	Conclusão .....	81

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AC	adenilil ciclase
ADPRc	<i>Cyclic Adenosine Diphosphate-Ribose</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATPase	<i>adenylpyrophosphatase</i>
$\beta$ 1 - AR	$\beta$ 1 Adrenérgica(o)
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CASQ	Calsequestrina
Casq2	Calsequestrina 2
DC	Débito Cardíaco
ddp	Diferença de Potencial
DHP	Dihidropiridina
EDOs	Equações Diferenciais Ordinárias
ISO	Isoproterenol
JSR	<i>Junctional Sarcoplasmic Reticulum</i>
LCIC	Liberação de $Ca^{2+}$ induzida por $Ca^{2+}$
LEC	Liberação Espontânea de $Ca^{2+}$
MyBCP Ser 282	<i>Myosin Binding Protein-C</i> do tipo Ser 282
NaCa	Sódio Cálcio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaK-ATPase	<i>sodium-potassium adenosine triphosphatase</i>
NSR	<i>Network Sarcoplasmic Reticulum Space</i>
KCl	Cloreto de Potássio
NAV	Nodo Atrioventricular
NCX	$Na^{+}/Ca^{2+}$ <i>exchanger</i>

NCX-Tg	<i>cardiomyocyte-directed overexpression of NCX</i>
NSA	Nodo Sinoatrial
PA	Potencial de Ação
PAE	Potencial de Ação Espontâneo
PDA	Pós despolarizações atrasadas
PDE	<i>phosphodiesterases</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PLB	<i>phospholamban</i>
PMCA	<i>Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase</i>
PP	<i>Protein Phosphatases</i>
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PO <sub>4</sub>	Grupo Fosfato
RE	Retículo Endoplasmático
RS	Retículo Sarcoplasmático
RR	Receptor Rianodina
RR2	Receptor Rianodina do tipo 2
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i>
RyR 2	<i>Type 2 Ryanodine Receptor</i>
RUs	<i>Regulatory Units</i>
SAP	<i>Spontaneous Action Potential</i>
Ser/Thr	<i>Serine/Threonine Protein Kinase</i>
SERCA	<i>Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca-ATPase</i>
SERCA2a	<i>Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca-ATPase of type 2a</i>
SCR	<i>spontaneous Ca<sup>2+</sup> release</i>
SCT	<i>Spontaneous Calcium Transiente</i>
SERCA	Bomba de Ca <sup>2+</sup> do RS
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TCE	Transiente de Ca <sup>2+</sup> Espontâneo
TnI Ser 23/24	Troponina I do tipo Ser 23/24
WT	<i>Wild-Type</i>

# 1 INTRODUÇÃO

A contração do coração é precedida por um pulso elétrico denominado Potencial de Ação (PA). Para que o coração funcione como uma bomba, todos os miócitos devem contrair-se ritmicamente. A batida rítmica do coração é obtida pela propagação dos PAs, que funcionam como mensagens dos cardiomiócitos. O Nodo Sinusal (NSA) está localizado no átrio direito Figura (2.1), e é a região do músculo cardíaco responsável por controlar a propagação da onda elétrica, gerando PAs periódicos, ou seja uma atividade “marca-passo”. O PA gerado no NSA é transmitido para os átrios direito e esquerdo e, em seguida, para os ventrículos através do septo interventricular e de células especializadas para a condução rápida do PA (Fibras de Purkinje). Sob condições normais, este processo se repete várias vezes, causando batidas ritmadas de, aproximadamente, setenta e duas vezes por minuto em seres humanos. Esse sistema é suscetível a danos causados por doenças cardíacas que podem resultar em arritmias e ou contrações anormais que podem levar à morte.

Várias arritmias cardíacas são iniciadas por uma excitação inoportuna também denominada como focos ectópicos ou “ectopic foci” e extra-sístoles ou Potenciais de Ação Espontâneos (PAEs), que originam-se a partir de uma região foco no coração. Estudos recentes têm mostrado que estas excitações podem ser causadas por anomalias no ciclo de cálcio de cardiomiócitos ventriculares de coelhos (Chen *et al.*, 2012). PAEs induzem frentes de excitação de ondas que quebram-se em forma de propagação elétrica reentrante, podendo levar à taquicardia ventricular, e subsequentemente a arritmias. A eletrofisiologia dos miócitos cardíacos é um processo complexo, envolve o sistema elétrico, é ditada pela sensibilidade dos canais iônicos e pela diferença de potencial. A eletrofisiologia cardíaca é responsável também por regular o potencial da membrana e o mecanismo do ciclo de cálcio. Este resume-se no fluxo de íons de cálcio entre os compartimentos intracelulares de armazenamentos de cálcio, citoplasma e meio extracelular (Bers, 2002).

Modelos matemáticos do PA têm sido uma importante ferramenta, proporcionando

o entendimento e a exploração dos complexos fenômenos da eletrofisiologia celular há mais de meio século. Os modelos computacionais permitem que as informações extraídas dos experimentos, aqueles que possuem a finalidade de estudar diferentes componentes e mecanismos isolados, sejam combinadas para gerar uma visão da funcionalidade do sistema como um todo. Um dos estudos mais importantes nesta área é o trabalho de Hodgkin e Huxley (1952). Neste, foi desenvolvido o primeiro modelo quantitativo para o PA de um axônio gigante de lula. As suas equações são base para os modelos modernos da eletrofisiologia celular. Um dos primeiros modelos mais complexos foi o modelo de Bondarenko *et al.* (2004) para miócitos de camundongos. Este modelo considera um número maior de correntes do que Hodgkin e Huxley (1952), nos possibilitando fazer estudos mais completos. Na tentativa de reproduzir os efeitos da arritmia iniciada por uma excitação inoportuna, é raro encontrar estudos a respeito do ciclo de Cálcio que usam modelos para camundongos. Já existem muitos estudos baseados em modelos de coelho como em Chen *et al.* (2011) e em modelos para porquinho da índia como em Faber e Rudy (2007).

Recentemente, Bondarenko (2014) desenvolveu um modelo ainda mais complexo. Além da modelagem da eletrofisiologia, este modelo considera também a modelagem das reações bioquímicas de proteínas e suas relações com diferentes canais iônicos. O modelo de Bondarenko (2014) também modificou o sistema correspondente ao ciclo de  $Ca^{2+}$  dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de camundongos, tornando possível a simulação de efeitos correspondentes às irregularidades no ciclo de  $Ca^{2+}$ .

## 1.1 Justificativa

Pesquisas indicam que mais de 300 mil pessoas morrem no Brasil vítimas de anomalias relacionadas principalmente à atividade elétrica do coração. A morte súbita é um tipo de morte resultante de uma falha abrupta das funções cardíacas. Geralmente o que ocasiona esta falha é a arritmia. Esta é uma disfunção que afeta o sistema elétrico do músculo cardíaco, o que conseqüentemente produz ritmos anormais para o funcionamento saudável do coração. A irregularidade do ritmo cardíaco pode fazer com que os impulsos elétricos,

responsáveis por provocar a contração dos músculos das paredes cardíacas, tornem-se mais rápidos (taquicardia) ou se comportem de forma caótica (fibrilação).

A maior parte das arritmias é benigna, sendo que as malignas acometem principalmente pessoas que já possuem alguma doença cardíaca (Anderson, 1990). A arritmia ventricular maligna é umas das principais causas de morte no mundo (Kjekshus, 1990). A sinalização de  $Ca^{2+}$  intracelular desregulada implica uma variedade de arritmias cardíacas (Brunello *et al.*, 2013). Muitas delas são causadas por mutações, como a do trocador  $NaCa$  ou  $NCX$  (Pott *et al.*, 2012), ou como taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (Faber e Rudy, 2007).

Os modelos existentes que reproduzem PAEs são para cardiomiócitos ventriculares de coelhos Chen *et al.* (2011) ou para cardiomiócitos ventriculares de porquinhos da índia Faber e Rudy (2007), também existem modelos celulares para cardiomiócitos ventriculares de camundongos que reproduzem o PA (Bondarenko *et al.*, 2004; Bondarenko, 2014), mas não foram encontrados modelos que reproduzem PAEs em cardiomiócitos de camundongos.

## 1.2 Objetivos

Potenciais de Ação Espontâneos (PAEs) surgem geralmente devido aos episódios de liberação espontânea de  $Ca^{2+}$  (LEC). Através de dados experimentais Brunello *et al.* (2013); Pott *et al.* (2012) concluiu-se que sob estímulo  $\beta_1$  - AR os episódios de LEC têm maior probabilidade de surgir. O estímulo  $\beta_1$  - AR aumenta o ritmo cardíaco, isto porque faz com que os canais iônicos, principalmente o canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L, aumente o tempo médio de duração de abertura, ou faz com que o canal mude para o estado aberto com uma frequência maior. De acordo com dados experimentais a estimulação  $\beta_1$  - AR facilita a simulação das anormalidades no ciclo de  $Ca^{2+}$  Brunello *et al.* (2013); Pott *et al.* (2012); Faber e Rudy (2007).

O modelo de Bondarenko *et al.* (2004) é baseado em um conjunto de 41 equações diferenciais ordinárias (EDOs). As EDOs simulam correntes iônicas, bombas e a homeostase celular para reproduzir um PA. A homeostase é a propriedade que a célula

possui de regular o seu ambiente interno de modo a manter uma condição estável. Para isto, realiza múltiplos ajustes dinâmicos, controlados por diversos mecanismos ativos de regulação. Já o modelo de Bondarenko (2014) foi desenvolvido para representar a estimulação  $\beta 1$ -AR no miócito isolado do ventrículo esquerdo de camundongos, é baseado em Bondarenko *et al.* (2004), porém conta com um conjunto de 141 EDOs, que inclui tanto a abordagem eletrofisiológica quanto a bioquímica.

Portanto, um dos focos deste trabalho foi em testar os modelos de Bondarenko *et al.* (2004) e Bondarenko (2014) na intenção de reproduzir os efeitos da estimulação  $\beta 1$ -AR e do aumento de  $[Ca]_i^{2+}$ . Porém, o foco principal do trabalho concentrou-se em desenvolver um modelo celular estocástico para o ventrículo esquerdo de camundongos baseado em Chen *et al.* (2011), com a finalidade de simular os efeitos da Liberação Espontânea de  $Ca^{2+}$  (LEC) e a correspondente geração de um Potencial de Ação Espontâneo (PAE).

## 2 Eletrofisiologia Cardíaca

O coração é um órgão muscular contrátil constituído por duas bombas separadas por um septo vertical, uma do lado direito e outra do lado esquerdo, cuja função é impulsionar o sangue que leva oxigênio e nutrientes para todas as células do organismo pelo sistema arterial e o traz de volta pelas veias. Figura 2.1. Anatomicamente, cada uma das bombas apresenta uma câmara superior chamada átrio ou aurícula e uma câmara inferior chamada ventrículo.

O sangue arterial possui oxigênio na maior parte de sua composição e também é composto em menor proporção por gás carbônico. Depois de circular por todo o corpo, dá origem ao sangue venoso, que possui gás carbônico na maior parte de sua composição e pequenas proporções de oxigênio. Este desemboca no átrio direito através das veias cavas, passa pela válvula tricúspide e alcança o ventrículo direito de onde é bombeado na direção dos pulmões para as trocas gasosas. Depois de oxigenado dá origem ao sangue arterial novamente e, conduzido através das veias pulmonares até o átrio esquerdo, flui pela válvula mitral e chega ao ventrículo esquerdo. Dali é empurrado para a artéria aorta, que se encarrega de distribuí-lo pelo organismo.

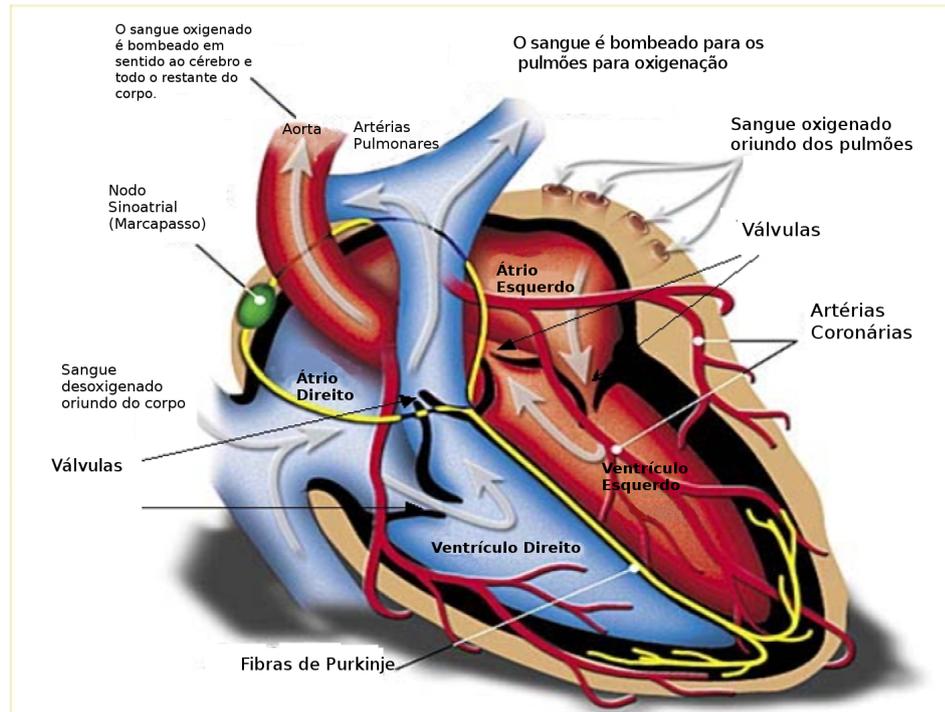


Figura 2.1: Coração. Adaptado de Daisy (2014)

Para realizar essa função mecânica de receber e bombear o sangue por meio de contrações (sístoles) e relaxamentos (diástoles), o coração é dotado de um mecanismo sincronizado, cujo funcionamento depende de um estímulo elétrico gerado por um agrupamento de células que desempenham o papel de um marca-passo natural. Desacertos na origem desse estímulo ou em sua condução pelas câmaras cardíacas são responsáveis pelo aparecimento das arritmias. Estas por sua vez geram batimentos cardíacos irregulares que podem resultar em sintomas de palpitação, fadiga, tonturas, desmaios e até mesmo parada cardíaca súbita.

## 2.1 Estruturas Subcelulares

O tecido cardíaco é composto por fibras musculares estriadas, constituído pelas células musculares cardíacas, também conhecidas por cardiomiócitos. Estes são células excitáveis que se organizam ligando-se umas às outras em série (Fawcett e McNutt, 1969). Os discos intercalados, ou discos Z, que podem ser observados na Figura (2.2), são na verdade membranas celulares que separam células individuais umas das outras. Nessas regiões

em que as membranas celulares se fundem, formam-se as junções comunicantes, ou *gap junctions*. Essas junções são muito permeáveis e possibilitam a difusão de íons e outras pequenas moléculas de uma célula para outra. Desta maneira, o tecido muscular cardíaco é um sincício, que é o conjunto de células que se fundem, perdendo parte de sua membrana e formando uma única massa citoplasmática multinucleada.

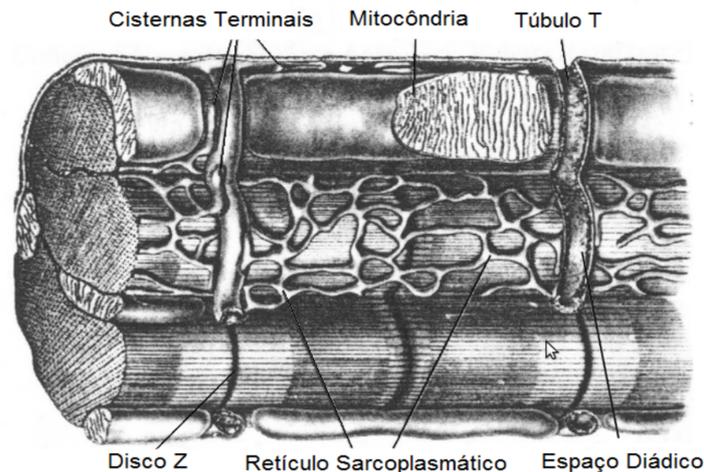


Figura 2.2: Sarcômero. Adaptado de Fawcett e McNutt (1969)

### 2.1.1 Membrana Celular

O fluxo das substâncias que entram e saem do citoplasma é controlado por uma membrana, que delimita o interior da célula (Alberts *et al.*, 2003). A membrana celular é constituída de uma bicamada fosfolipídica contínua que mantém uma relação ambivalente com a água. A bicamada é composta por fosfolípidos (lípidos complexos) que se encontram com as suas extremidades hidrofílicas (extremidades polares) viradas para os meios intra e extracelulares, criando uma barreira que não permite a passagem de íons e substâncias polares. Veja a Figura (2.3). Os fosfolípidos que constituem esta bicamada podem movimentar-se de modo a permitirem as trocas de substâncias. A membrana celular ou membrana plasmática das células do tecido muscular estriado são também conhecidas como sarcolema.

Os canais iônicos são compostos por proteínas que estão aderidas à membrana celular,

sendo responsáveis pelo mecanismo de transferência de determinados tipos de íons para dentro e fora da célula. Tanto o meio extracelular quanto o meio intracelular são constituídos de uma solução aquosa de sais, principalmente de  $NaCl$ ,  $KCl$  e  $CaCl_2$  que se dissociam em íons de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ . A bicamada fosfolipídica age como uma barreira evitando o fluxo livre desses íons, mantendo assim uma diferença de concentração e de potencial elétrico entre os meios.

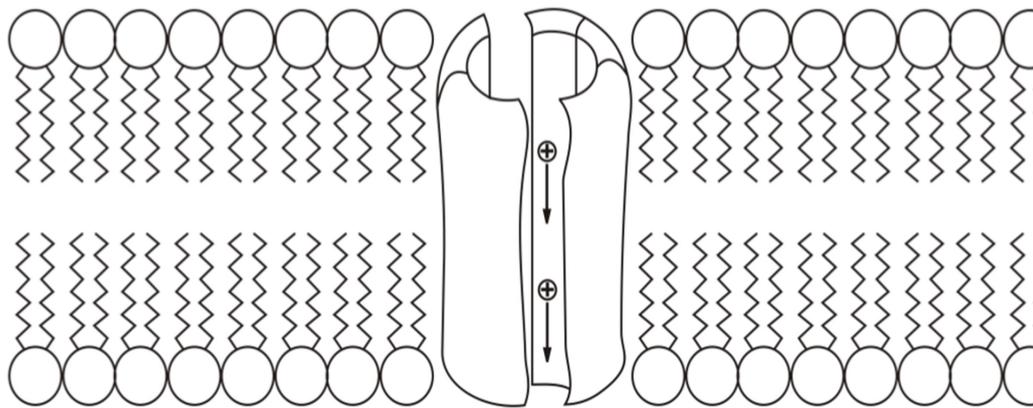


Figura 2.3: Estrutura básica da membrana celular e fluxo de íons através de um canal iônico. Adaptado de Campos (2008)

O transporte de íons e de moléculas entre os meios intracelular e extracelular pode ocorrer por meio de processos ativos (com gasto energético) e passivos (sem gasto energético) (Alberts *et al.*, 2003). Os canais iônicos são estruturas altamente seletivas e é através deles que ocorre o transporte passivo de íons através do processo de difusão. Uma outra característica dos canais iônicos é que eles são altamente sensíveis a determinadas variáveis do sistema celular, sendo que a maior parte tem seu comportamento regulado pelo potencial transmembrânico. A alteração do estado de condutividade do canal iônico pode ser vista na Figura (2.4).

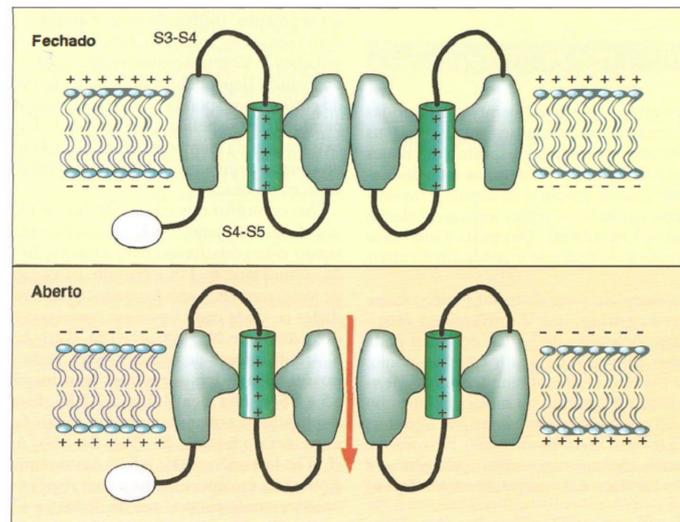


Figura 2.4: Abertura e fechamento dos canais iônicos sensíveis ao potencial transmembrânico. Adaptado de AIRES (2007)

## 2.2 Potencial de Ação e Excitabilidade

Quando células cardíacas são excitadas eletricamente, elas geram denominado de potencial de ação, que é uma variação no potencial transmembrânico destas células, causadas pelas correntes iônicas que cruzam os canais iônicos. Este estímulo se propaga para as outras células através das junções comunicantes e serve como ativador do processo de contração das células.

A membrana plasmática é também constituída por estruturas proteicas, que admitem a passagem de fluxos iônicos. A regulação do potencial transmembrânico (a diferença de potencial entre os meios intracelular e extracelular) é considerada uma das funções mais importantes da célula (Alberts *et al.*, 2003). Quando a membrana recebe uma corrente elétrica de intensidade suficiente, tal corrente dispara um longo caminho de variação do potencial transmembrânico, ou seja o Potencial de Ação - PA. O potencial de repouso (equilíbrio) da membrana é negativo (aproximadamente  $-80\text{mV}$  para fibras nervosas), devido às grandes diferenças de concentrações iônicas entres os meios intra e extracelular. A seguir podemos verificar as concentrações intra e extracelulares dos íons de  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ .

Tabela 2.1: Gradientes de Concentrações dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  em células de axônio gigante de lula

Íon	Meio Intracelular ( $\mu M$ )	Meio extracelular ( $\mu M$ )
$Na^+$	50000	497000
$K^+$	397000	20000

O Potencial de Ação se propaga por outras células através das junções comunicantes e pode ser caracterizado como o ativador de todo o processo de contração muscular. A Figura (2.5) a seguir mostra o potencial de ação cardíaco e destaca as fases de cada região, a polaridade da célula e correntes de entrada e saída de íons em cada fase do potencial ação.

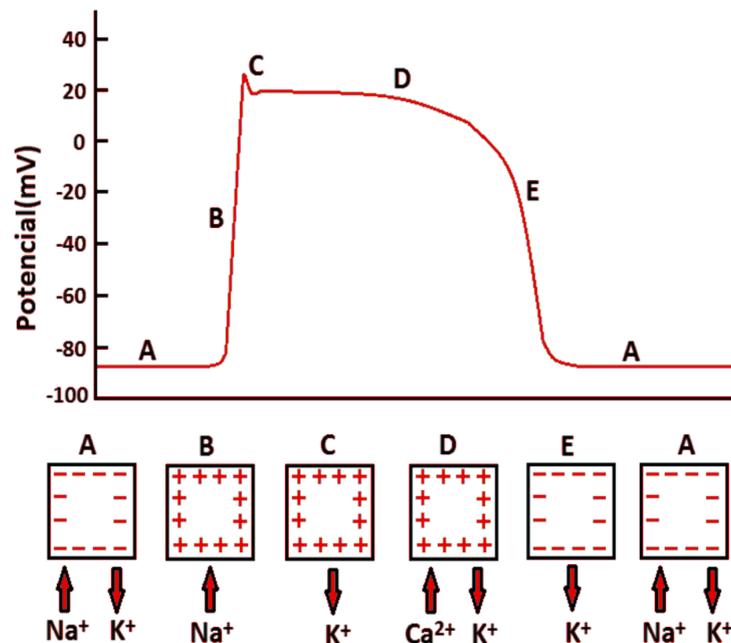


Figura 2.5: Potencial de ação ventricular cardíaco e suas fases: (A) Repouso, (B) Despolarização, (C) Repolarização Inicial, (D) Platô, (E) Repolarização, e as correntes iônicas relacionadas com a mudança de potencial em cada fase. Adaptado de de Barros (2013)

Na fase B o sódio entra na célula resultando em um potencial da membrana positivo em relação ao potencial de equilíbrio. Em seguida, os canais transitórios de potássio se abrem e geram uma corrente de saída deste íon. Isto auxilia na repolarização da célula e contribui para o pico da fase C. Uma característica dos canais transitórios é que eles

se inativam rapidamente. A fase D é conhecida como platô, durante esta fase há uma corrente despolarizante de cálcio. A entrada deste íon estimula a liberação de  $Ca^{2+}$  armazenada no retículo sarcoplasmático, fazendo com que o nível de  $Ca^{2+}$  intracelular aumente, promovendo a contração do miócito. Durante o repouso, a concentração de  $Ca^{2+}$  é mantida baixa no interior da célula, devido a resgatação do  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático e pela atuação do trocador sódio-cálcio na membrana celular. A entrada de  $Ca^{2+}$  nesta fase é contrabalançada por uma corrente repolarizante de potássio devido à um número maior de canais de potássio abertos neste instante. Os canais de cálcio se inativam com o tempo, enquanto mais canais retificadores de potássio são abertos. Um maior número de canais de potássio abertos resulta na fase E chamada de fase de repolarização. A duração de todo o processo do início da despolarização até o final da repolarização dura entre dezenas e centenas de milissegundos, ou seja a duração do Potencial de Ação varia de acordo com cada espécie. Resumindo, a cada potencial de ação ocorre a entrada de sódio e a saída de potássio no cardiomiócito.

A homeostase é o princípio que estabelece que, dentro de determinados limites, o organismo tende a manter a estabilidade do meio interno, apesar das variações no meio externo. A manutenção da homeostase intracelular é garantida por diversos mecanismos. Dentre eles a bomba  $Na^+K^+$  se destaca, ela retira três íons de sódio da célula para cada dois íons de potássio que entram, atuando também durante a fase de repolarização.

O nodo sinoatrial, ou sinusal, é uma estrutura anatômica do coração e sua função é gerar impulsos cardíacos sincronizados, normais. A propagação do estímulo elétrico iniciado no nodo sinoatrial segue seu caminho normal graças ao período refratário, que impede que as regiões do coração sejam re-estimadas. No entanto, um atraso na propagação gerado por uma barreira pode ser grande suficiente para que regiões do tecido saiam do período refratário e possam ser re-estimadas, gerando um padrão desordenado na propagação causando arritmia cardíaca. Desta forma, é neste instante que PAEs podem ser gerados, dando início a um episódio de arritmia. Na Figura (2.6) a seguir, pode-se observar o que acontece quando a o tecido cardíaco recebe mais de um estímulo.

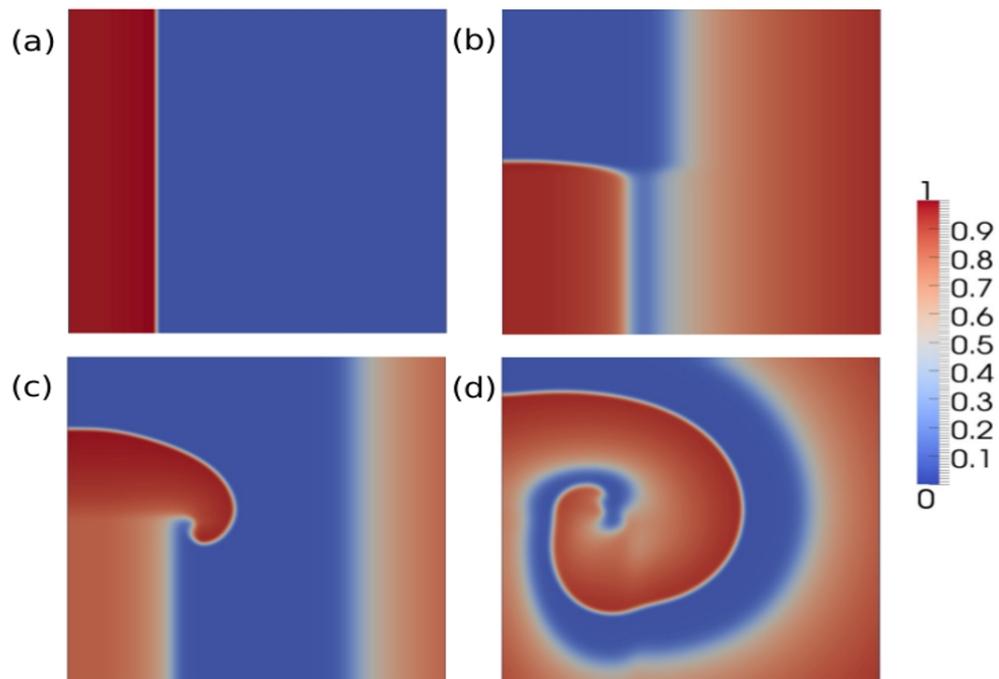


Figura 2.6: Exemplo da distribuição espacial do potencial transmembrânico. (a) Primeiro estímulo aplicado. (b) Segundo estímulo aplicado. (c) Formação de um espiral. (d) Espiral que mostra comportamento arritmico do coração. Adaptado de Campos (2013)

## 2.3 Ciclo de $Ca^{2+}$ e algumas particularidades

Os mecanismos pelos quais uma célula controla a concentração de  $Ca^{2+}$  são de interesse fundamental na eletrofisiologia celular. Para garantir que o  $Ca^{2+}$  esteja presente na quantidade fisiologicamente ideal, existem mecanismos de controle de  $Ca^{2+}$  operando em vários níveis diferentes. Qualquer mudança estrutural ou molecular nos canais iônicos pode desencadear uma incapacidade de remover o  $Ca^{2+}$  ou outra alteração no ciclo. Concentrações de  $Ca^{2+}$  elevadas e prolongadas são tóxicas. Anormalidades no ciclo podem fazer com que uma célula muscular seja mantida constantemente em um estado de tensão, podendo levar a diversos tipos de insuficiência cardíaca e até mesmo à morte.

Nos vertebrados, a maior parte do  $Ca^{2+}$  é armazenada nos ossos do corpo, a partir de onde pode ser liberado pela estimulação hormonal, a fim de manter uma concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  em cerca de  $1\text{ mM}$ , enquanto a concentração intracelular  $[Ca]^{2+}$  é mantida em cerca de  $0.1\ \mu\text{M}$ . Uma vez que a concentração interna é baixa, há um

gradiente de concentração íngreme do lado exterior de uma célula para o seu interior. Esta disparidade apresenta a vantagem de que as células são capazes de aumentar a sua concentração de  $[Ca]^{2+}$  rapidamente, através da abertura de canais de  $Ca^{2+}$ , confiando no fluxo passivo de um gradiente de concentração acentuado, mas tem a desvantagem sobre a energia que deve ser gasta para manter o  $Ca^{2+}$  citosólico em uma concentração baixa. Assim, as células têm mecanismos finos e sincronizados para controlar todo o fluxo e a remoção de  $Ca^{2+}$  intracelular (Keener e Sneyd, 1998).

Existem duas formas de remover o  $Ca^{2+}$  do citoplasma celular: o bombeamento para fora da célula e o armazenamento feito pelos compartimentos internos ligados à membrana como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático (RE) ou retículo sarcoplasmático (RS) e os grânulos de secreção. O retículo sarcoplasmático é uma forma especializada de retículo endoplasmático.

O influxo de cálcio também ocorre através de duas vias principais: influxo do meio extracelular, através de canais de  $Ca^{2+}$  na superfície transmembranar, e por liberação dos compartimentos de armazenamento internos. Os canais de  $Ca^{2+}$  da superfície membranar são de vários tipos diferentes: canais controlados pela diferença de potencial, que se abrem em resposta à despolarização da membrana celular, canais operados por receptores, que se abrem em resposta à ligação de um ligante externo, canais que se abrem em resposta à ligação de um segundo mensageiro celular, e os canais que se abrem em resposta a estímulos mecânicos. Canais de  $Ca^{2+}$  controlados por diferença de potencial são de grande importância neste trabalho, podemos observar a sua localização na membrana de acordo com a Figura (2.7).

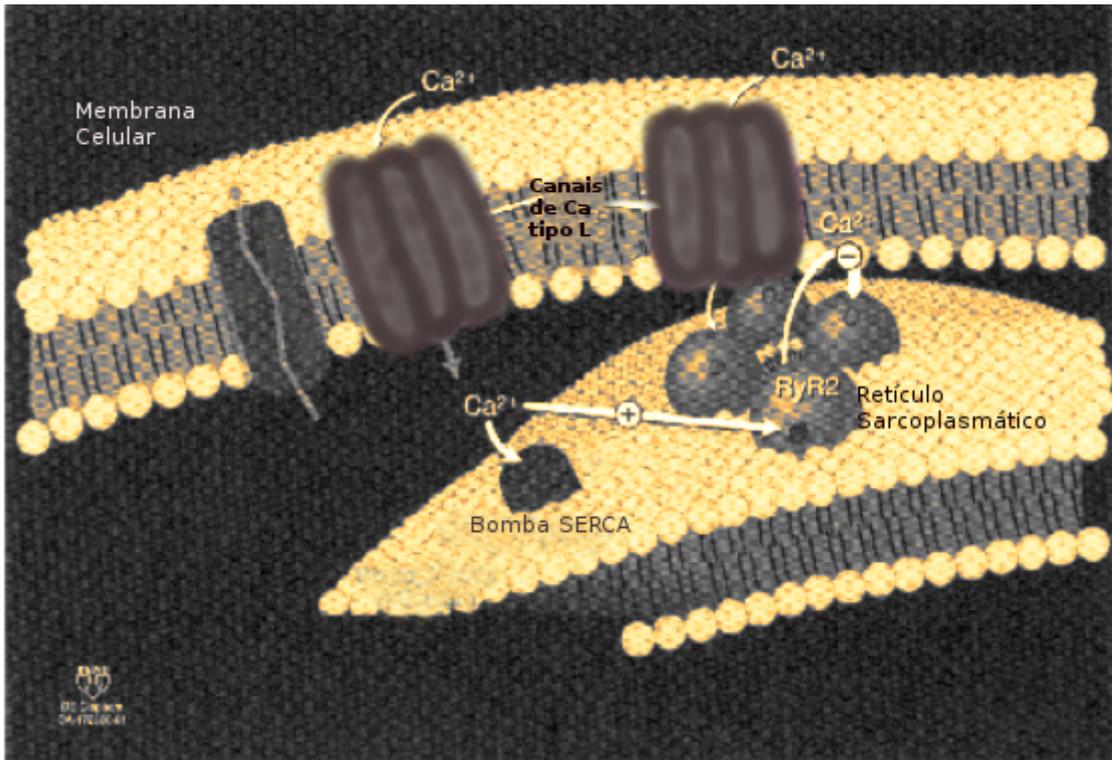


Figura 2.7: Retículo Sarcoplasmático. Adaptado de Keener e Sneyd (1998)

## 2.4 Oscilações de Cálcio

Miócitos exibem oscilações de  $[Ca]^{2+}$  intracelular devido à entrada e saída da célula, através da membrana celular, e também devido à mobilização do íon nas reservas intracelulares. A cinética do cálcio permite a ativação de diversos processos, como a contratilidade do miócito cardíaco.

Embora se saiba que o  $Ca^{2+}$  controla muitos processos celulares, o significado exato das oscilações de  $Ca^{2+}$  não é completamente compreendido na maioria dos tipos de células. Acredita-se que as oscilações são sinais codificados de frequência, permitindo que uma célula utilize o íon como segundo mensageiro, enquanto evita os efeitos tóxicos da elevada e prolongada concentração de  $[Ca]^{2+}$ .

Nos cardiomiócitos o principal papel do transiente de  $Ca^{2+}$  no interior dos cardiomiócitos está associado à contração do músculo cardíaco, portanto qualquer alteração assíncrona no ciclo de  $Ca^{2+}$  pode desencadear uma série de distúrbios na sequência de sístoles e diástoles.

## 2.5 O mecanismo de Liberação de $Ca^{2+}$ através do Receptor Rianodina - RR

Uma das principais formas de liberação do  $Ca^{2+}$  dos compartimentos de reserva intracelulares é através do Receptor Rianodina - RR. São moléculas complexas com grandes domínios citoplasmáticos, contém numerosos sítios de ligação para agentes que controlam o estado de atividade do domínio que forma o canal. O  $Ca^{2+}$  pode desencadear a liberação de  $Ca^{2+}$  por indução de  $Ca^{2+}$  (LCIC), a partir do RS através dos Receptores Rianodina (Endo *et al.*, 1970; Fabiato, 1983).

Os RR's localizam-se em regiões especializadas do RS denominadas T-túbulos, que se caracterizam como uma invaginação da própria membrana superficial (sarcolema), como podemos observar na Figura (2.8). O T-túbulo penetra e percorre transversalmente as células, ramificando-se e envolvendo os sarcômeros nos discos Z. A zona em que um sarcômero se liga ao seguinte traduz-se por uma linha mais escura presente nos miofilamentos, designada linha (ou disco) Z (do alemão *zwischen* - entre ou no meio). Um sarcômero corresponde ao espaço que separa duas linhas Z consecutivas. O RS possui uma localização estritamente intracelular. É composto por túbulos que correm longitudinalmente por entre as miofibrilas e, no disco Z, formam cisternas que entram em contato com o sistema transversal. A região do RS que entra em contato com o sistema transversal e constitui cisternas laterais é denominada retículo juncional. A combinação entre um túbulo transversal e duas cisternas laterais do RS recebe o nome de tríade. No miocárdio, também é comum a visualização de cisternas do RS em contato com o sarcolema e, nesse caso, são denominadas díades (Sommer e Waugh, 1976). Estes sistemas tubulares desempenham papel imprescindível na ativação da contração muscular.

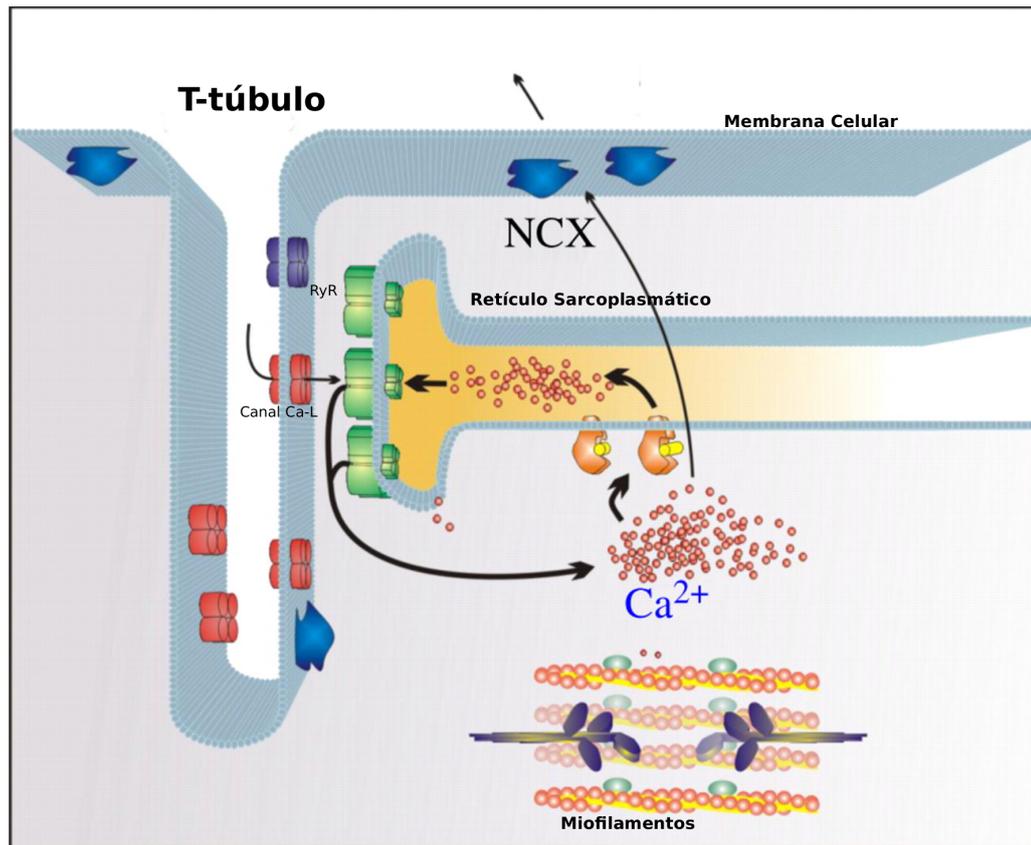


Figura 2.8: Dinâmica LCIC. Adaptado de Ibrahim *et al.* (2011)

Os RR's se encontram estrutural e funcionalmente associados a outras proteínas intrínsecas e, indiretamente, à proteína de ligação intraluminal do cálcio, a calsequestrina. A calsequestrina, triadina e junctina formam um complexo proteico associado com Receptor Rianodina do tipo 2 - RR2 facilitando a liberação de cálcio que ocorre durante a contração muscular (Knollmann, 2009). No músculo cardíaco a isoforma encontrada é a Calsequestrina 2 (Casq2), e uma de suas funções é proteger o coração de liberações espontâneas de cálcio. O cálcio une-se à calsequestrina com alta afinidade. Aproximadamente 50% do cálcio armazenado no RS está associado à calsequestrina. A Triadina é uma proteína transmembranar, associa-se à RR2 e Casq2 no lúmen do RS e está envolvida no acoplamento funcional entre ambos no lúmen, organizando estruturalmente o retículo (Guo e Campbell, 1995). A junctina é uma proteína de que liga a calsequestrina à membrana juncional do RS juntamente com a triadina (Jones *et al.*, 1995). A função da triadina e junctina é de contribuir para a retenção de Casq2 na junção do RS. A ausência de triadina ocasiona uma remodelação na junção do RS, reduzindo o contato entre estes,

prejudicando o acoplamento excitação-contração e a contração do miócito (Knollmann, 2009).

Há uma relação estreita do canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L que é sensível à diferença de potencial (ddp) e o sarcolema, o que permite rapidamente o influxo do íon, logo em seguida LCIC é iniciada através dos RR's no retículo sarcoplasmático (Stern, 1992). Canais sensíveis à ddp transmembrânica como o canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L são formados por multisubunidades de proteínas transmembranares que permitem o influxo de  $Ca^{2+}$  através dele. Este influxo dá origem à  $I_{CaL}$  que representa a corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L, essencial para a excitabilidade normal e para o acoplamento excitação-contração em miócitos cardíacos. Assim, o  $Ca^{2+}$  que entra através do canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L recebe e provoca um efeito muito maior nas regiões do citoplasma próximas aos RR's do que o  $Ca^{2+}$  nas regiões restantes do citoplasma. Além disso, se o  $Ca^{2+}$  é liberado do RS em um espaço confinado entre a RS e o sarcolema, os RR's podem ter um microdomínio diferente do que o experimentado pelo restante da célula (Stern, 1992; Kargacin, 1994; Stern *et al.*, 1997).

### **2.5.1 Etapas do LCIC**

Para entender melhor como funciona o processo de LCIC, consideraremos os 4 passos da Figura (2.9). Passo 1: quando ocorre o Potencial de Ação, ele propaga-se pela membrana e os canais sensíveis à ddp, como o canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L, são abertos permitindo a entrada dos íons que estão no meio extracelular. Passo 2: como a concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  é grande, quando o canal de  $Ca^{2+}$  é aberto devido à ddp, o influxo da corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L é iniciado. Passo 3: devido à localização dos Receptores Rianodina (RR's), bem próxima aos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, logo após a ativação da corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L os RR's, que são sensíveis aos íons de  $Ca^{2+}$ , são ativados e iniciam o processo de abertura. Passo 4: Após a abertura dos RR's, o  $Ca^{2+}$  armazenado no RS é liberado no citoplasma, aumentando a sua concentração intracelular. Assim funciona o processo de liberação de  $Ca^{2+}$  por indução de  $Ca^{2+}$ .

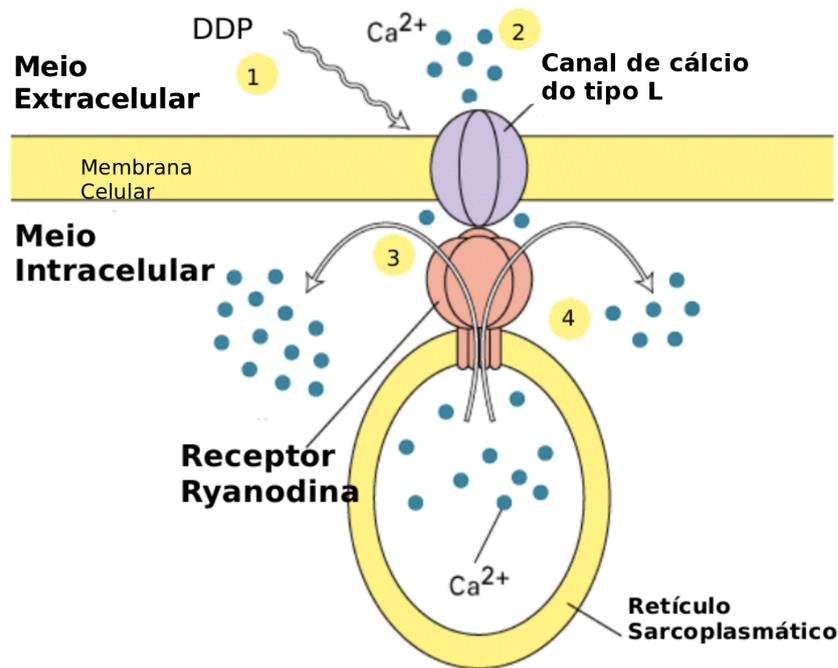


Figura 2.9: Passo a passo LCIC. Adaptado de Larry (2014)

## 2.6 Miofilamentos e contratilidade

As células musculares cardíacas são constituídas por sarcômeros, que representam as unidades subcelulares e possuem a estrutura contrátil, como pode se observar na Figura (2.8). O sarcômero possui uma estrutura organizada e repetitiva, composta pelos miofilamentos que são classificados em finos e grossos. Estes, encontram-se posicionados de forma intercalada, interagem e geram a força necessária à contração do músculo cardíaco. O sarcômero é limitado por duas linhas ou discos Z. Nos miofilamentos encontram-se as proteínas que participam do processo da contração. Os filamentos finos são longos polímeros compostos principalmente por uma dupla hélice de monômeros de actina. Os filamentos mais espessos são compostos principalmente por miosina, que é considerada uma molécula motor, uma vez que é capaz de converter a energia da hidrólise de ATP (a principal fonte de energia da célula) no movimento da cabeça da miosina. A nebulina é uma proteína de ancoramento que fixa a actina nos discos Z, e a tinina é uma longa proteína elástica, responsável por manter a integridade estrutural dos sarcômeros. Na Figura (2.10) a seguir, podemos observar a organização dos miofilamentos.

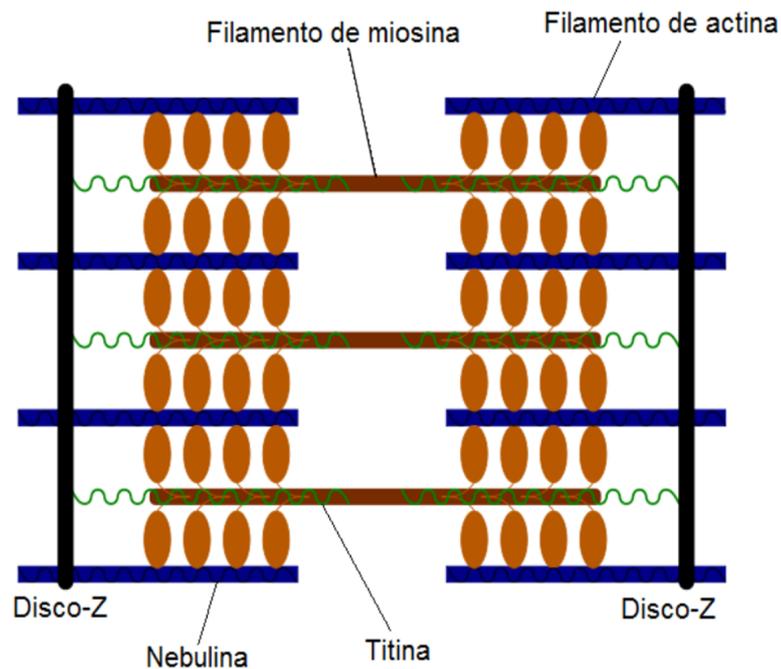


Figura 2.10: Organização dos miofilamentos. Adaptado de Sachse (2004)

O processo de contração começa quando a célula é estimulada eletricamente. Após o PA, os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L que são sensíveis ao potencial transmembrânico se abrem. Assim, inicia-se o fluxo de  $Ca^{2+}$ , que ativa LCIC. Após LCIC a concentração de  $Ca^{2+}$  sobe a níveis capazes de ativar os miofilamentos e a contração ocorre; em seguida, o RS recupera o  $Ca^{2+}$  através da bomba SERCA.

A interação dos filamentos de actina e miosina é controlada por proteínas regulatórias. A troponina e a tropomiosina são complexos de proteínas presentes no filamento fino de actina. Para manutenção das condições de repouso da célula, a troponina e a tropomiosina impedem que a cabeça da miosina se ligue à actina, funcionando assim como um bloqueio estérico dos sítios de ligação presentes neste filamento, e são também conhecidas como unidades regulatórias ou *regulatory units* (RUs). O bloqueio estérico significa que a disposição espacial dos átomos ou grupos nos sítios reacionais de uma molécula impede ou retarda uma reação. Quando a célula é estimulada e a concentração de  $Ca^{2+}$  aumenta, os íons de  $Ca^{2+}$  ligam-se à troponina C, o que provoca uma mudança de conformação da proteína, abrindo o sítio de ligação na actina para a miosina Figura (2.11). A ligação da miosina com a actina formam as pontes cruzadas. Consumindo o ATP a cabeça da miosina

se deforma e assim, um filamento desliza sobre o outro. Neste instante, os miofilamentos são encurtados aproximando os discos Z, o que reduz o comprimento da célula resultando no processo de contração da mesma. De acordo com a Figura (2.12) a seguir podemos observar este processo:

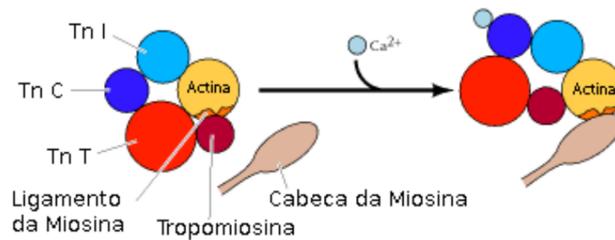


Figura 2.11: Ligação actina-miosina. Adaptado de Cooper (2000)

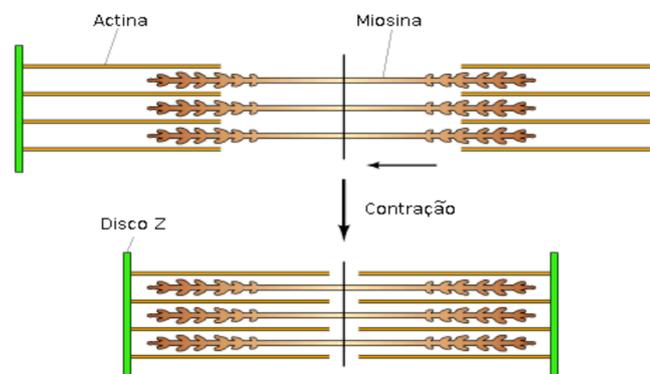


Figura 2.12: Contração do sarcômero. Adaptado de Cooper (2000)

## 2.7 Os mecanismos que atuam no processo de relaxamento do cardiomiócito

Os mecanismos anteriormente tratados atuam especificamente no processo de contração. Foi visto que durante o acoplamento excitação-contração, o cálcio entra através dos canais tipo L ativando a liberação dos estoques de cálcio do retículo através dos RR's. Isso aumenta o cálcio citoplasmático e inicia o processo de contração muscular. Para que

ocorra o processo de relaxamento é necessário que o  $Ca^{2+}$  seja removido do citoplasma. Os mecanismos que atuam no processo de relaxamento do miócito cardíaco são aqueles que atuam no processo de remoção do  $Ca^{2+}$  intracelular, como a bomba de  $Ca^{2+}$  da membrana conhecida como (PMCA) do inglês por *Plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase*, o trocador  $Na^+/Ca^{++}$  (NCX) ou a bomba de  $Ca^{2+}$  do RS (SERCA) (Marchand *et al.*, 2012).

A PMCA localiza-se na membrana plasmática e têm alta afinidade por cálcio e baixa velocidade de transporte. Alguns estudos mostram que seu papel na regulação diastólica é sutil e a contribuição em retirar cálcio da célula é de menor importância. Assim sendo, foi postulado que a PMCA serve para o ajuste fino da concentração de cálcio intracelular (Caroni *et al.*, 1982). Sendo assim, o principal mecanismo de extrusão do  $Ca^{2+}$  se dá pela atividade conjunta de SERCA e NCX. Com o  $Ca^{2+}$  citosólico aumentado, a expressão de SERCA e NCX precisa ser aumentada também para compensar e manter o equilíbrio intracelular. Se a expressão delas não corresponder ao excesso de  $Ca^{2+}$ , o cardiomiócito não reduz a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  de maneira satisfatória para a diástole, o que pode ser um fator negativo para o bom funcionamento cardíaco (Leskova e Kryzhanovsky, 2011).

### **2.7.1 Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA)**

SERCA é a bomba que transporta o  $Ca^{2+}$  do meio citosólico para o lúmen (é um espaço interno ou cavidade) do retículo sarcoplasmático. O RS do miócito cardíaco não serve apenas como reservatório de cálcio, mas também para manter a concentração de cálcio no citoplasma durante a contração e o relaxamento muscular. A remoção do cálcio do citosol pela bomba do RS (SERCA) para o retículo resulta no relaxamento muscular. A razão do relaxamento é determinada pela recaptação de cálcio pela SERCA 2a que é regulada por duas moléculas protéicas, o fosfolambam e a sarcolipina (Periasamy *et al.*, 2008). Uma vez recaptado pela SERCA, o  $Ca^{2+}$  é armazenado ligado à calsequestrina, que organiza o RS e permite que o cálcio esteja pronto para ser liberado próximo ao receptor de rianodina.

A SERCA 2a é a isoforma mais expressa no coração de mamíferos. Em roedores, SERCA 2a é mais comumente encontrada no átrio comparado com o ventrículo, sendo este um motivo para a duração da contração do átrio ser mais rápida que a do ventrículo. As expressões de SERCA 2a são alteradas conforme a idade, sendo relatado um decréscimo de quantidade e atividade de acordo com o envelhecimento, tanto em animais quanto em humanos. Esta diminuição está associada ao prolongamento da contração e diminuição da função cardíaca.

### 2.7.2 O Trocador $Na^+Ca^{2+}$ (NCX)

Localizado na membrana plasmática, o NCX ( *do inglês  $Na^+Ca^{2+}$  exchanger current*) é uma bomba de  $NaCa$  que funciona como um trocador eletrogênico, contribuindo para o potencial de repouso da célula, uma vez que troca 3 íons de sódio pra 1 íon de cálcio. Primeiramente o NCX faz o efluxo do cálcio, responsável por remover aproximadamente 28% de sua concentração do citosol, sendo considerado um dos principais mecanismos de extrusão do  $Ca^{2+}$  (Weber *et al.*, 2002). No modo reverso, o NCX permite o influxo de cálcio (Bers, 2002; Mullins, 1979). Segundo Bers (2008) este influxo seria centenas de vezes menor do que o influxo via canais tipo L. Alguns autores admitem a possibilidade de isso contribuir para a liberação de cálcio do RS induzida por cálcio (Clark *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 2003), mas outros dizem que não (Lines *et al.*, 2006; Sham *et al.*, 1992). No músculo cardíaco o que permite o modo reverso do NCX são o potencial positivo de membrana e o aumento do sódio intracelular (Larbig *et al.*, 2010). O mecanismo sarcolemal da troca  $Na^+Ca^{2+}$  deve ser encarado como um processo importante na regulação da contratilidade miocárdica, uma vez que é capaz de modular a força de contração. A direção do movimento dos íons através do trocador  $Na^+Ca^{2+}$  depende do potencial da membrana e do gradiente químico para estes íons, o que, por sua vez, se correlaciona com a atividade da bomba  $Na^+K^+$ .

## 2.8 Liberação espontânea de $Ca^{2+}$ - LEC

Normalmente a liberação de  $Ca^{2+}$  do RS ocorre via LCIC, porém sob certas condições, esta liberação pode ocorrer espontaneamente, ou seja, na ausência de qualquer estímulo do sarcolema (Cheng *et al.*, 1993; Wier *et al.*, 1987). A liberação espontânea de  $Ca^{2+}$  - LEC ocorre também devido a flutuações dos RR's, que induzem *sparks*  $Ca^{2+}$  espontâneos, ou pulsos espontâneos. A liberação espontânea, que pode propagar como uma onda ao longo da célula, é mais facilmente observada quando a célula está com altas concentrações de  $Ca^{2+}$  (Orchard *et al.*, 1983). O  $Ca^{2+}$  que é liberado através deste pulso espontâneo, em parte, é bombeado para fora da célula pela corrente trocadora eletrogênica  $Na^+Ca^{2+}$  (Mechmann e Pott, 1986). A liberação pela corrente  $I_{NaCa}$  aumenta a concentração intracelular de  $Na^+$  induzindo uma despolarização transitória, o que resulta em uma atividade anormal de marcapasso (Ferrier *et al.*, 1973). De acordo com observações anteriores, (Capogrossi *et al.*, 1986) observou-se que houve uma variabilidade considerável, célula-a-célula, no aparecimento de liberação espontânea e, em particular, na frequência cardíaca. A LEC produz variações nas concentrações de  $Ca^{2+}$  do cardiomiócito podendo ocasionar uma série de problemas, principalmente se os canais iônicos apresentarem alguma alteração molecular em sua constituição.

## 2.9 O sistema nervoso autônomo SNA e as oscilações dos neurônios simpáticos

O SNA, através dos seus componentes simpático e parassimpático, desempenha um importante papel nos ajustes do sistema cardiovascular (Davini *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2000). Embora o coração tenha um padrão de contração inata, também é inervado pelo SNA a fim de responder as alterações fisiológicas necessárias do corpo. Os nodos sinoatrial (NSA) e atrioventricular (NAV) possuem a inervação simpática e a parassimpática. Neste trabalho destacaremos a simpática. Ações corporais necessárias a uma situação de emergência ou estresse são acionadas pela estimulação simpática (Foss *et al.*, 2000). A

inervação simpática é feita através de fibras dos gânglios cervicais e torácicos superiores e a inervação parassimpática é feita através de ramos dos nervos vagos, como pode ser observado na Figura (2.13).

A estimulação simpática intensa pode aumentar a frequência cardíaca, em adultos jovens, de 70 batimentos/minuto para 180 a 200 e até 250 batimentos/minuto, além disso, também pode aumentar a força de contração cardíaca e, conseqüentemente, o volume de sangue bombeado e a pressão de ejeção. Em geral, a estimulação simpática pode aumentar o débito cardíaco (DC) por duas a três vezes (Guyton e Hall, 2002). O conceito de DC refere-se à quantidade de sangue ejetado pelos ventrículos por unidade de tempo.

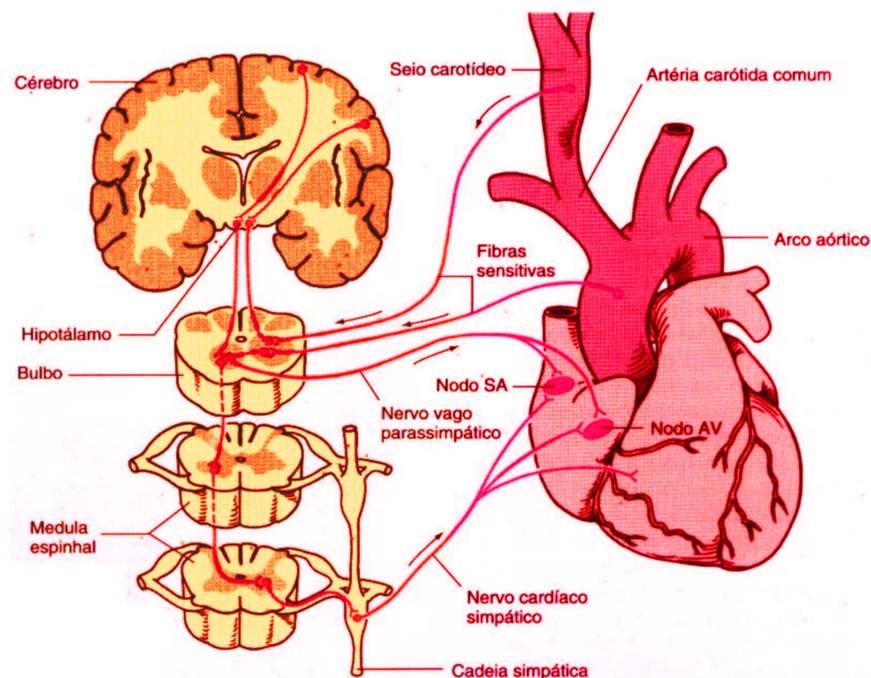


Figura 2.13: Inervação autonômica do Coração. Adaptado de Powers *et al.* (2000)

A estimulação dos nervos cardiovasculares simpáticos libera catecolaminas (compostos químicos) no sangue, como a adrenalina e norepinefrina (noroadrenalina) (MCARDLE *et al.*, 1998). Neurotransmissores como a norepinefrina aumentam a permeabilidade dos íons de sódio  $Na^+$  e de cálcio  $Ca^{2+}$  (Guyton e Hall, 2002). As fibras nervosas simpáticas também secretam a norepinefrina, que é também considerada como substância transmissora sináptica. Desta forma, as fibras que secretam norepinefrina são chamadas de adrenérgicas (Guyton e Hall, 2002).

## 2.10 Estimulação $\beta$ - Adrenérgica ( $\beta$ 1-AR)

O  $\beta$ 1-AR é o subtipo de receptores mais abundante no coração normal (70-80%) e é um receptor acoplado a Gs prototípico. Sua estimulação leva ao aumento da produção de AMP cíclico (cAMP) via adenilil ciclase (AC). cAMP atua principalmente na proteína quinase A (PKA). O processo de fosforilação é a adição de um grupo fosfato ( $PO_4$ ) a uma proteína ou outra molécula e é um dos principais participantes nos mecanismos de regulação das proteínas. A ativação de PKA fosforila um conjunto de proteínas reguladoras chave que controlam o ciclo de acoplamento de excitação-contração, tais como os canais de  $Ca^{+}$  do tipo L no sarcolema, os RR's sarcoplasmáticos e fosfolambam (PLB), que juntos coordenam aumentos significativos na inotropia cardíaca (Bers, 2002, 2008; Rapundalo, 1998). PLB é um regulador chave da ATPase de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) (SERCA2a). A fosforilação da PLB em Ser16 por PKA alivia sua inibição da SERCA2a, o que estimula muito a taxa e a quantidade de  $Ca^{+}$  citosólico armazenado pelo RS. Isso melhora o relaxamento e carregamento do RS do miocárdio, que por sua vez aumenta o transiente de  $Ca^{+}$  e a força durante a sístole (Simmerman e Jones, 1998; MacLennan e Kranias, 2003). Fosforilação PKA-dependente das proteínas miofibrilares troponina I (TnI) Ser23/24 e da proteína cardíaca C de ligação à miosina (MyBPC) Ser282 diminui sensibilidade miofibrilar ao  $Ca^{+}$  e, assim, acelera o relaxamento dos miofilamentos (Kobayashi e Solaro, 2005). Outra proteína de atuação de PKA é fosfolema. Reconhecida no início de ensaios de fosforilação como uma fosfoproteína fortemente regulada na fração do sarcolema (Palmer *et al.*, 1991), o seu papel foi enigmático até recentemente. Sabemos agora que é uma subunidade de *NaK*-ATPase (Despa *et al.*, 2005). Analogamente às interações PLB/SERCA, PKA-fosforilação de fosfolema alivia sua influência inibitória, estimulando assim a bomba de sódio.

A ação de cAMP/PKA é contrabalançada por fosfodiesterases (PDE) cAMP e proteínas fosfatases (PP) (Mansuy e Shenolikar, 2006). No coração de mamíferos, mais de 90% da atividade total PP é realizada com a contribuição das fosfatases Ser/Thr de tipos 1 e 2A (PP1 e PP2A) (Lüss *et al.*, 2000). Elas resultam de uma família de genes comuns e são altamente homólogos Cohen (2002). Sua ação é controlada principalmente

por sua localização e por componentes das subunidades de canais iônicos. Estes, são organizados em complexos de sinalização de macromoléculas, contendo não apenas PP, PKA, e a respectiva proteína-alvo, mas também vários PDEs (Mansuy e Shenolikar, 2006). Os complexos envolvem proteínas de base, tais como proteínas de ancoragem de quinase-A (PKAs), que têm como alvo a PKA em proximidade com os seus substratos e, portanto, conferem especificidade da sinalização de cAMP (Dodge-Kafka *et al.*, 2006).

Curiosamente, uma subunidade PP1, o inibidor PP1-1 (I-1), é fosforilado pela PKA e assim é ativado. A consequência é a redução de PP1 intermediada pela desfosforilação PLB e, portanto, a amplificação das respostas intermediadas por PKA aumentam a contratilidade (retroalimentação positiva) (Neumann *et al.*, 1991). A atividade dos RR's é equilibrada pela fosforilação do domínio regulador, cujo processo é realizado por várias proteínas quinases, nomeada por PKA (no caso dos RR's). Ativados de acordo com a atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à dihidropiridina - DHP, utilizam como via de segundos-mensageiros o ADPRc (ADP-Ribose cíclico) -  $Ca^{2+}$  - calmodulina, os RR's têm por função a amplificação dos sinais de  $Ca^{2+}$ . RYR2 é o tipo de receptor localizado no músculo cardíaco, fundamental para todo o processo de contração. Cardiomiócitos isolados exibem oscilações de  $Ca^{2+}$  intracelular na presença de um agonista que ativa ou desencadeia uma reação como o isoproterenol.

## 2.11 Isoproterenol

O isoproterenol ou isoprenalina é um medicamento simpaticomimético (efeito que se obtém ao estimular o sistema nervoso simpático) que atua ao nível dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Estimula os receptores  $\beta$  - AR cardíacos, causando efeitos como cronotropia e inotropia positivas. A função do isoproterenol é simular o sistema  $\beta$ -adrenérgico em experimentos com miócitos isolados.

## 2.12 Fisiopatologia da Bomba *NaCa* - Mutação *NCX*

Algumas mudanças estruturais ou moleculares nos canais ou receptores iônicos estão associadas a diferentes tipos de mutações. A super expressão ou aumento da atividade do trocador *NaCa* ou *NCX* em cardiomiócitos pode desencadear arritmias cardíacas. Pós despolarizações atrasadas - PDA's são consideradas como um acionador de arritmias. Elas são definidas como oscilações do potencial de membrana elétrica durante ou logo após o potencial de ação cardíaco. PDA's são observadas após repolarização plena do potencial da membrana como podemos observar na Figura (2.14) a seguir.

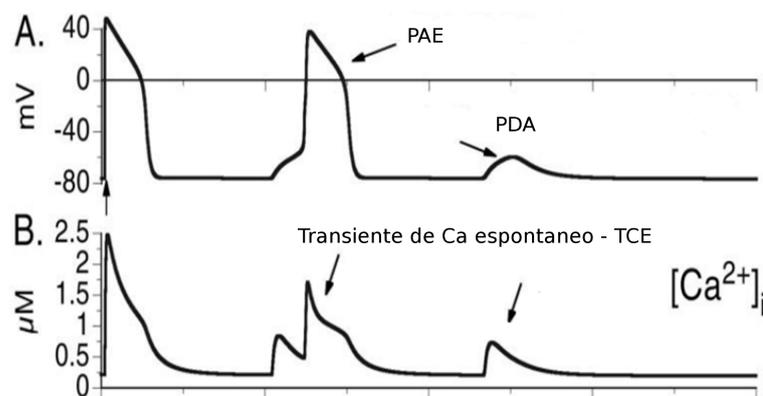


Figura 2.14: PDA, PAE e TCEs. Adaptado de Faber e Rudy (2007)

Diversos estudos têm mostrado que o aumento da expressão da bomba *NCX* pode provocar uma repolarização lenta. Este aumento explica a formação de PDA's, que podem provocar Potenciais de Ação Espontâneos - PAEs. Estes são os principais responsáveis pelo início da arritmia, provocam extra-sístoles, que iniciam todo um descompasso no sincronismo do ritmo cardíaco. Para compreender melhor os mecanismos de super expressão do trocador *NCX*, vários experimentos foram realizados com miócitos cardíacos isolados de camundongos. Foram realizados testes com miócitos de controle (WT) e miócitos com mutação do trocador *NCX* (*NCX-Tg*) (Pott *et al.*, 2012). Para realização dos experimentos os cardiomiócitos foram expostos ao isoproterenol. De 33 cardiomiócitos do genótipo WT, 5 apresentaram LEC. De 28 cardiomiócitos do genótipo *NCX-Tg*, 11 apresentaram LEC. Porém, apenas nos miócitos cardíacos com a mutação *NCX* os eventos de LEC ativaram PAEs.

## 3 Metodologia

### 3.1 Modelo Celular

Modelos matemáticos para eletrofisiologia celular são um componente chave da modelagem cardíaca. Eles servem tanto como ferramentas de investigação independentes, para verificar o comportamento de miócitos cardíacos individuais, quanto como um componente essencial da simulação da atividade elétrica do órgão como um todo. Como já foi visto em seções anteriores, o cardiomiócito possui uma membrana que separa o meio intracelular do meio extracelular. A membrana celular é constituída por uma bi-camada fosfolipídica. Uma de suas funções é separar os meios intracelular e extracelular e os respectivos íons de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^{2+}$  e vários outros, para dentro e fora da célula, o que mantém uma diferença de concentração iônica. Esta gera uma diferença de potencial através da membrana celular.

#### 3.1.1 Difusão e Lei de Fick

Através da membrana celular surgem gradientes de concentração para cada tipo de íon. Isto ocorre devido à diferença de concentração iônica, entre o meio intracelular e extracelular. O gradiente de concentração gerado induz a difusão de partículas de uma região de alta concentração para uma de baixa concentração. O processo de difusão é descrito pela Lei de Fick.

$$J_F = -D\nabla c, \quad (3.1)$$

onde,  $\nabla c$  é o gradiente de concentração do íon  $c$ ;  $D$  é o coeficiente de difusão do meio(intracelular ou extracelular);  $J_F$  é o fluxo dos íons.

### 3.1.2 Modelo elétrico para a membrana

Um capacitor é formado por duas placas condutoras separadas por um material isolante. Como a membrana separa cargas entre os meios intracelular e extracelular, em termos elétricos, ela pode ser modelada como um capacitor. Para a membrana, a bicamada fosfolipídica funciona como um material isolante, enquanto os meios intracelular e extracelular funcionam como as placas condutoras.

A capacitância é definida como a razão entre a carga armazenada e a voltagem necessária para armazenar esta carga, ou seja

$$C_m = \frac{Q}{V}, \quad (3.2)$$

onde,  $C_m$  é a capacitância,  $Q$  é a carga e  $V$  é o potencial transmembrânico. Neste sentido, a membrana celular impede a passagem de íons entre os meios intracelular e extracelular. Para completar o modelo da membrana, um resistor é colocado em paralelo a um capacitor. Conforme veremos adiante, as resistências associadas aos canais iônicos são funções não lineares da diferença de potencial entre os meios intracelular e extracelular. A Figura (3.1) ilustra o circuito elétrico correspondente ao modelo elétrico da membrana celular.

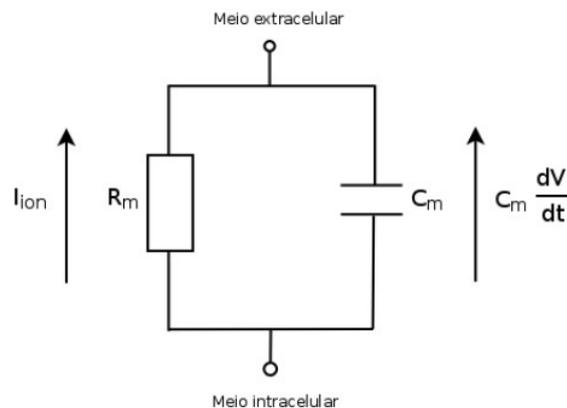


Figura 3.1: Modelo elétrico para a membrana

O fluxo de íons muda a quantidade de carga separada pelo capacitor, assim como o potencial transmembrânico, através da relação  $Q = C_m V$ .

Considerando a variação de carga no tempo tem-se:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dC_m V}{dt} = C_m \frac{dV}{dt}. \quad (3.3)$$

O termo  $dQ/dt$  é a variação da carga no tempo, que corresponde a uma corrente, denominada corrente capacitiva. A corrente total através da membrana celular é definida como uma soma da corrente capacitiva com o somatório das correntes iônicas,

$$I_{tot} = I_{ion} + C_m \frac{dV}{dt}. \quad (3.4)$$

Se o circuito da Figura (3.1) for fechado, isto é, não haverá transporte de íons para dentro ou fora do volume celular, (lei de Kirchhoff), o somatório das correntes que saem de um nó pertencente a um circuito elétrico é nulo.

$$I_{ion} + C_m \frac{dV}{dt} = 0. \quad (3.5)$$

### 3.1.3 *Potencial de equilíbrio de Nerst*

Uma das mais importantes equações da eletrofisiologia é a Equação de Nerst, que descreve como a diferença da concentração iônica entre duas fases pode resultar em uma diferença de potencial entre as mesmas.

As diferenças nas concentrações fazem com que os íons se movam no sentido contrário ao sentido dado pelo gradiente de concentração. Em contrapartida, a força do campo elétrico gerada pelo potencial transmembrânico faz com que os íons se dirijam no sentido contrário ao movimento de difusão. Um equilíbrio será alcançado quando o fluxo difusivo dos íons se igualar ao fluxo referente à diferença de potencial elétrico. O valor do potencial transmembrânico para tal equilíbrio, relativo a um íon isolado, é dado pela Equação de Nernst (Equação (3.6)), onde  $R$  é a constante dos gases ( $8,314J/Kmol$ ),  $T$  é a temperatura absoluta,  $z$  é a valência do íon,  $F$  é a constante

de Faraday ( $9,648 \times 10^4 C/mol$ ),  $c_e$  e  $c_i$  denotam as concentrações externa e interna do íon, respectivamente. A diferença de potencial através da membrana,  $V_{Nerst} = V_i - V_e$ , é dada por:

$$V_{Nerst} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{c_e}{c_i} \right), \quad (3.6)$$

que é a Equação de Nerst. A Equação (3.7) é válida para o caso em que um único tipo de íon pode atravessar a membrana. Neste caso, na situação de equilíbrio, ou seja,  $V = V_{Nerst}$ , o fluxo do íon em questão através da membrana será nulo. Para o caso em que a membrana é permeável a dois ou mais íons diferentes, é utilizada a formulação de Goldman-Hodgkin-Katz (Keener e Sneyd, 1998) também chamada de Equação GHK. Como exemplo, considerando-se os íons  $K^+$  e  $Na^+$ , a Equação GHK é dada por:

$$V_{GHK} = -\frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}{P_{Na}[Na^+]_e + P_K[K^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i} \right), \quad (3.7)$$

onde  $P_{Na}$ ,  $P_K$  e  $P_{Cl}$  são as permeabilidades dos íons de sódio potássio e cloro respectivamente, a Equação (3.7) depende também das concentrações intra e extracelulares destes íons, da temperatura  $T$ , da constante ideal dos gases  $R$  e da constante de Faraday  $F$ .

## 3.2 Modelos para a Corrente Iônica

Os modelos celulares são desenvolvidos com base no modelo linear Equação (3.8) e na Equação (3.7). A demonstração desta Equação pode ser encontrada em Keener e Sneyd (1998). Estes modelos foram desenvolvidos para estabelecer a relação da corrente (I-V) em um determinado canal iônico. O modelo linear para o íon  $S$ , dado pela Equação (3.8) a seguir, estabelece a corrente iônica  $I_S$ . Esta é uma função linear da diferença entre o potencial transmembrânico e o potencial de repouso  $E_S$  do íon  $S$ , sendo  $g$  a condutância do canal iônico em questão.

$$I_s = g(V - E_s). \quad (3.8)$$

A Equação (3.7) estabelece uma relação não linear entre a corrente iônica e o potencial transmembrânico, sendo obtida a partir da hipótese de campo elétrico constante sobre a membrana sarcoplasmática Keener e Sneyd (1998). Sendo  $I_s$  a corrente relativa ao íon  $S$ ,  $P_s$  a permissividade da membrana ao íon  $S$ ,  $c_i$  e  $c_e$  as concentrações intracelular e extracelular do íon  $S$ , respectivamente, assim temos que a Equação (3.7) é dada pela Equação (3.9).

$$I_s = P_s \frac{z^2 F^2}{RT} V \frac{(c_i - c_e) e^{-\frac{zFV}{RT}}}{1 - e^{-\frac{zFV}{RT}}}. \quad (3.9)$$

Geralmente, a condutância  $g$  associada a uma corrente iônica é uma função do potencial transmembrânico ou de determinadas concentrações iônicas sendo usualmente descritas através de modelos para o comportamento do canal iônico associado.

### 3.3 Modelos para os Canais Iônicos

Atualmente são realizados diversos experimentos sofisticados, permitindo a observação da ampla variedade de canais iônicos existentes na membrana celular. Uma das técnicas realizadas é a denominada *patch-clamp* (Neher e Sakmann, 1995). Nesta técnica as correntes iônicas são medidas através dos canais iônicos, mantendo-se o valor do potencial transmembrânico constante, permitindo o estudo quantitativo do comportamento destas correntes. A técnica *patch-clamp* foi desenvolvida por Neher e Sakmann (1995). Os canais iônicos alteram-se entre os estados condutivos e não condutivos, devido a diversas características, sendo a principal delas a diferença de potencial (ddp) entre os meios intracelular e extracelular. As alterações de estados levaram a uma série de modelos estocásticos para canais iônicos.

#### 3.3.1 Modelo de Dois Estados

As alterações de estados dos canais iônicos podem ser descritas como um espaço de estados discretos. Existem muitos modelos que descrevem o comportamento dos canais iônicos. O modelo mais simples para ilustrar esse conceito é o chamado modelo de dois estados, que estabelece dois possíveis estados para um canal iônico: aberto ( $O$ ) e fechado

(C) Figura (3.2). O modelo de dois estados é uma cadeia de Markov Simples. Tem-se como exemplo de modelo de dois estados o canal de potássio ( $K^+$ ).

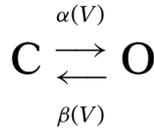


Figura 3.2: Modelo de dois estados. Adaptado de Keener e Sneyd (1998).

De acordo com a Figura (3.2), seja  $n$  a proporção de canais no estado  $O$  e  $(1 - n)$  a proporção de canais no estado fechado,  $\alpha(V)$  é a taxa de transição de  $C$  para  $O$  e  $\beta(V)$  é a taxa de transição de  $O$  para  $C$ , onde  $V$  é potencial transmembrânico. EDOs são formuladas em função destas taxas, como pode-se observar a seguir:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha(V)(1 - n) - \beta(V)n. \quad (3.10)$$

Fazendo  $du/dt = 0$ , têm-se:

$$n_{\infty}(V) = \frac{\alpha(V)}{\alpha(V) + \beta(V)}, \quad (3.11)$$

e

$$\tau_n(V) = \frac{1}{\alpha(V) + \beta(V)}. \quad (3.12)$$

onde,  $n_{\infty}$  e  $\tau_n(V)$  são funções respectivamente chamadas de valor assintótico de  $n$  e constante de tempo de  $n$ , as quais são mais facilmente obtidas através de procedimentos experimentais Keener e Sneyd (1998), e desta forma a EDO 3.10 fica:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_{\infty}(V) - n}{\tau_n(V)}. \quad (3.13)$$

No instante em que todos os canais iônicos do íon  $S$  estão no estado  $O$  determina-se  $g_{max,S}$ , a condutância para a população destes canais. A proporção de canais que estão

no estado  $O$  é estimada por  $n$  dada pela EDO 3.10. Ao utilizar-se o modelo linear para a relação entre a corrente e o potencial transmembrânico chega-se à seguinte Equação para a corrente iônica do íon  $S$ :

$$I_S = n g_{max,S} (V - E_s). \quad (3.14)$$

### 3.4 Cadeias de Markov

Cadeias de Markov é o nome dado a uma certa classe de processos estocásticos que tomam valores discretos e possuem a chamada propriedade de Markov. Esta é assim chamada em homenagem ao matemático russo Andrei Andreyevich Markov. Um Processo Estocástico é definido como uma coleção de variáveis aleatórias  $X(t)$  indexadas por um parâmetro  $t \geq 0$ , geralmente este parâmetro é entendido como tempo. Isto é, para cada valor  $t \geq 0$ ,  $X(t)$  é uma variável aleatória tomando valor em um conjunto  $E$ , denominado de espaço de estados. Geralmente, a variável aleatória representa o estado do sistema de interesse no instante  $t$ .

Um processo estocástico  $X(t)$  é chamado de Cadeia de Markov se o espaço de estados  $E$  é discreto e satisfaz a seguinte propriedade, denominada propriedade de Markov:

$$\begin{aligned} P[X(t_{k+1}) = x_{k+1} | X(t_k) = x_k, X(t_{k-1}) = x_{k-1}, \dots, X(t_1) = x_1, X(t_0) = x_0] = \\ P[X(t_{k+1}) = x_{k+1} | X(t_k) = x_k], \end{aligned} \quad (3.15)$$

para todo,  $k \in \mathbb{N}$ ,  $t_0 \leq t_1 \leq \dots \leq t_k \leq t_{k+1}$  e estados  $x_0, x_1, \dots, x_{k+1} \in E$ . Em relação ao tempo, uma cadeia de Markov pode possuir tempo discreto e se  $t$  é finito ou enumerável, e tempo contínuo é o caso contrário. Resumindo-se na ideia de que os estados anteriores são irrelevantes para a predição dos estados seguintes, desde que o estado atual seja conhecido.

Na cinética de canais iônicos, a cadeia de Markov é uma cadeia de parâmetro contínuo que permite observar um fenômeno durante o tempo de sua duração, o espaço de estados discretos e os estados cinéticos. Num modelo com essas características, as probabilidades de transições, por unidade de tempo, entre os estados cinéticos dependem unicamente do estado presente do canal e não dos estados anteriores pelo qual o canal transitou

(propriedade de Markov) (Kochetkov *et al.*, 1999; Rothberg e Magleby, 1999). A cinética dos canais iônicos tem sido modelada considerando-se que os tempos nos quais a proteína formadora do canal permanece nos seus diferentes estados cinéticos obedece a um processo estocástico Markoviano.

A Figura (3.3) a seguir mostra um modelo de Markov mais simples para que se possa entender melhor a modelagem da cinética dos canais iônicos. O modelo a seguir possui três estados em que o canal iônico pode estar: aberto (O), fechado (C) ou inativo (I), considerando o detalhe de que uma vez que o canal estiver no estado inativo, o mesmo não poderá retornar para os estados aberto ou fechado.

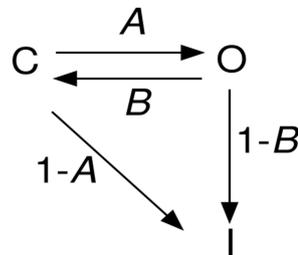


Figura 3.3: Cadeia de Markov com 3 estados. Adaptado de Keener e Sneyd (1998).

Seja  $i$ ,  $o$  e  $c$  as proporções de canais iônicos do íon  $S$  nos estados inativo, aberto e fechado, respectivamente, e também a corrente iônica  $I_S$  que é modelada pelo conjunto de EDOs a seguir:

$$\begin{aligned}
 I_s &= og_{S,max}(V - E_S) \\
 \frac{dc}{dt} &= -(A)c - (1 - A)c + (B)o \\
 \frac{do}{dt} &= (A)c - (B)o - (1 - B)o \\
 \frac{di}{dt} &= (1 - A)c + (1 - B)o,
 \end{aligned} \tag{3.16}$$

onde,  $A$ ,  $B$ ,  $(1-A)$  e  $(1-B)$  são as taxas de transição entre os estados.

Os modelos atuais são desenvolvidos com intenções de reproduzir cada vez melhor os efeitos das correntes iônicas, e para isto levam em consideração um número muito maior de estados. Tamanha complexidade demanda o ajuste de uma grande quantidade de parâmetros (taxas de transição), os quais são ajustados com dados experimentais.



cada corrente responsável pela gênese do Potencial de Ação.

Tabela 3.1: Especificação das correntes que atuam no modelo de Bondarenko *et al.* (2004)

Corrente	Nome	Função
$I_{Ca,L}$	corrente de Ca do tipo L ( <i>L-type Ca<sup>2+</sup> current</i> )	principal responsável pela entrada de $Ca^{2+}$ intracelular
$I_{pCa}$	bomba de $Ca^{2+}$ ( <i>sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> pump</i> )	retira íons de $Ca^{2+}$ do meio intracelular
$I_{NaCa}$	trocador $Na^+/Ca^{2+}$ ( <i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger ou NCX</i> )	troca dois íons de $Ca^{2+}$ intracelular por três íons de $Na^+$ extracelular
$I_{Cab}$	corrente de fundo do íon $Ca^{2+}$ ( <i>calcium background current</i> )	responsável pela entrada de $Ca^{2+}$ intracelular
$I_{Na}$	corrente rápida de sódio ( <i>fast Na<sup>+</sup> current</i> )	principal responsável pela entrada de $Na^+$ intracelular
$I_{Nab}$	corrente de fundo do íon $Na^+$	responsável pela entrada de $Na^+$ intracelular
$I_{NaK}$	bomba de $Na^+K^+$ ( <i>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump</i> )	responsável pela entrada de íons de $Na^+$ e saída de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Kto,f}$	<i>rapidly recovering transient outward K<sup>+</sup> current</i>	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Kto,s}$	( <i>slowly recovering transient outward K<sup>+</sup></i> )	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{K1}$	( <i>time independent inwardly rectifying K<sup>+</sup> current</i> )	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Ks}$	( <i>slow delayed rectifier K<sup>+</sup> current</i> )	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Kur}$	<i>ultrarapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current</i>	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Kss}$	<i>noninactivating steady-state voltage activated K<sup>+</sup> current</i>	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Kr}$	corrente de potássio <i>rapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current</i>	responsável pela saída de íons de $K^+$ do meio intracelular
$I_{Cl,Ca}$	corrente de cloro	ativa correntes de $Ca^{2+}$ através da retirada intracelular de íons de $Cl^-$
$I_{stim}$	corrente externa aplicada	responsável por estimular todas as outras correntes

Cadeias de Markov foram usadas para modelar as correntes iônicas:  $I_{CaL}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Kr}$ , e outras correntes também. Como já foi visto no capítulo anterior, um dos fluxos mais importantes do modelo é o responsável por liberar o cálcio do Retículo Sarcoplasmático:  $J_{release}$ . O cálculo para este fluxo foi modelado através de uma cadeia que representa os estados que o Receptor Rianodina (RR) assume. Veja maiores detalhes em Keizer e Levine (1996)

Nas Figuras a seguir pode-se observar que algumas cadeias possuem uma complexidade maior, como a  $I_{CaL}$ , Figura (3.5),  $I_{Na}$ , Figura (3.6) e a Cadeia que modela o Receptor Rianodina, Figura (3.7) .

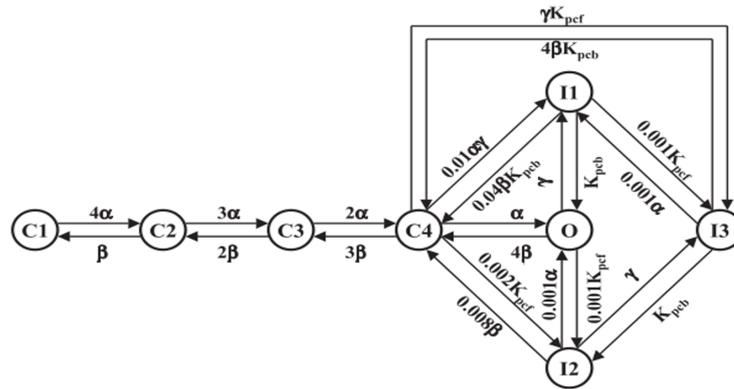


Figura 3.5: Diagrama esquemático do modelo de Markov do canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L.  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_4$  são estados fechados;  $O$  é o estado aberto; e  $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$  são estados inativos. As taxas  $\alpha$  e  $\beta$  dependem da voltagem, e  $\gamma$  depende de  $Ca^{2+}$ .  $K_{pcf}$  e  $K_{pcb}$  são respectivamente as taxas constantes para frente e para trás de tensão-insensível.

Adaptado de Bondarenko *et al.* (2004).

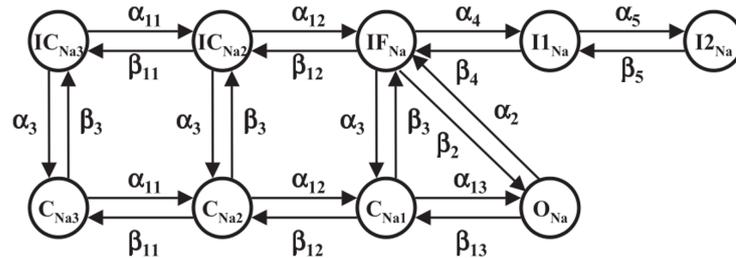


Figura 3.6: Diagrama esquemático do modelo de Markov do canal  $Na^+$ .  $C_{Na1}$ ,  $C_{Na2}$  e  $C_{Na3}$  são estados fechados;  $O_{Na}$  é o estado aberto; e  $IF_{Na}$  é o estado de inativação rápida,  $I_{Na1}$  e  $I_{Na2}$  são estados inativos intermediários; e  $IC_{Na2}$  e  $IC_{Na3}$  são estados de inativação-fechados. As taxas  $\alpha$  e  $\beta$  são as taxas de transição entre os estados. Adaptado de Bondarenko *et al.* (2004).

### 3.6 O modelo computacional de Bondarenko (2014)

Recentemente, foi desenvolvido este novo modelo de Bondarenko (2014) como uma atualização do anterior. O novo modelo pode simular os efeitos do sistema de sinalização  $\beta - 1$  adrenérgico ( $\beta 1 - AR$ ) sobre o comportamento de eletrofisiologia de um único miócito cardíaco, tais como: aumento moderado da duração do PA, aumento intracelular do transiente de  $Ca^{2+}$  e modificações na dinâmica de  $Na_i$ .

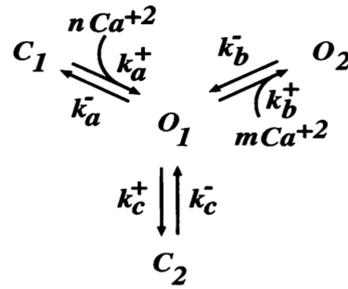


Figura 3.7: Diagrama esquemático do modelo de Markov para os quatro estados dos RyRs. O estado  $C_1$  e  $C_2$  são estados fechados;  $O_1$  e  $O_2$  são estados abertos. As taxas  $k$  são taxas constantes; somente os passos  $a$  e  $b$  são dependentes de  $Ca^{2+}$ . Adaptado de Keizer e Levine (1996).

O modelo matemático Bondarenko (2014) simula o comportamento bioquímico acoplado ao comportamento eletrofisiológico. A parte bioquímica foi separada em módulos: receptor  $\beta$ -1 adrenérgico, adenililciclase, fosfodiesterase, cAMP-PKA, proteínas fosfatases e inibidor-1, a dinâmica de cAMP e a dinâmica de PKA. Além disso, a parte de eletrofisiologia foi atualizada para incluir os grandes compartimentos celulares funcionais (caveolar, extracaveolar e citosol, Figura (3.8)). Em particular, o modelo inclui duas subpopulações de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, nos compartimentos caveolar e extracaveolar e o potencial na membrana é descrito pela seguinte Equação diferencial (3.18):

$$\begin{aligned}
 -C_m \frac{dV}{dt} = & I_{CaL} + I_{p(Ca)} + I_{NaCa} + I_{Cab} + I_{Na} + I_{Nab} \\
 & + I_{NaK} + I_{K,tof} + I_{K1} + I_{Kur} + I_{Kss} + I_{Kr} \\
 & + I_{Cl,Ca} + I_{stim}.
 \end{aligned} \tag{3.18}$$

O sistema de sinalização  $\beta$ -1-AR afeta cinco dessas correntes:  $I_{CaL}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Kto,f}$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{K1}$ . Em termos da dinâmica  $Ca^{2+}$ , Receptores Rianodina (RRs), fosfolambam, e troponina também são afetados pelo estímulo  $\beta$ -1-AR. Uma das maiores modificações do novo modelo estão na Cadeias de Markov de  $I_{CaL}$  Figura 3.9,  $I_{Na}$  Figura (3.10) e RyRs Figura (3.11). Neste último modelo, o tamanho das cadeias de Markov foi aumentada para 18, 18 e 8 estados, respectivamente. Várias outras modificações foram feitas no modelo recente.

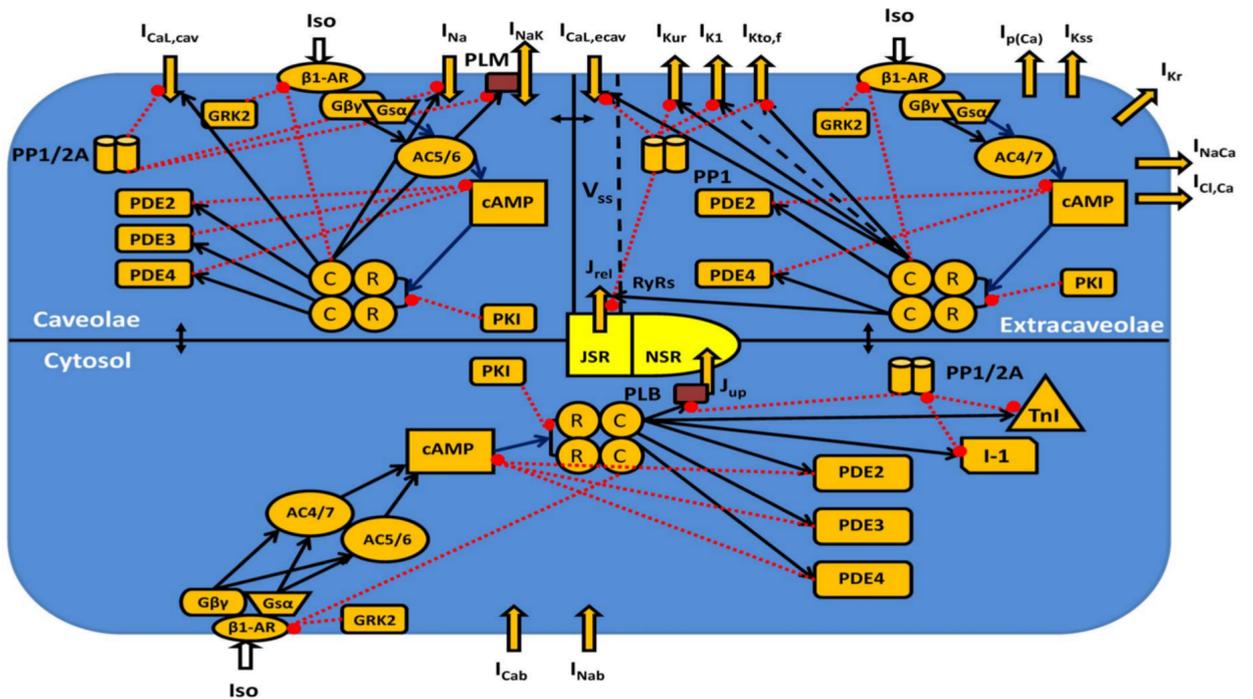


Figura 3.8: Modelo esquemático das correntes e fluxos do Modelo de Bondarenko (2014). Adaptado de Bondarenko (2014).

Mais detalhes podem ser encontrados no artigo original Bondarenko (2014).

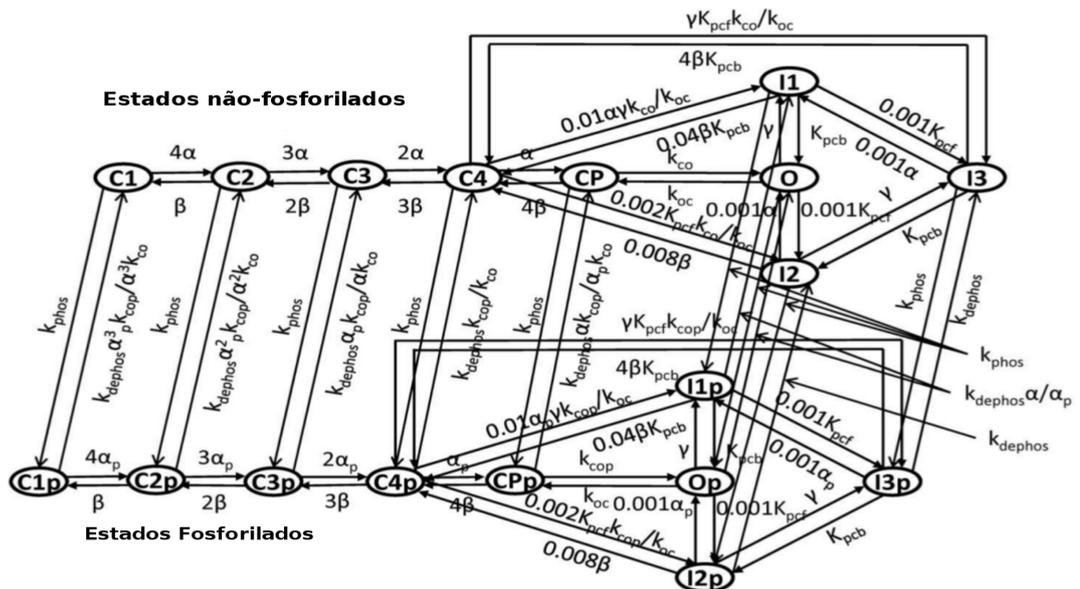


Figura 3.9: Cadeia de Markov para o canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L. Adaptado de Bondarenko (2014).

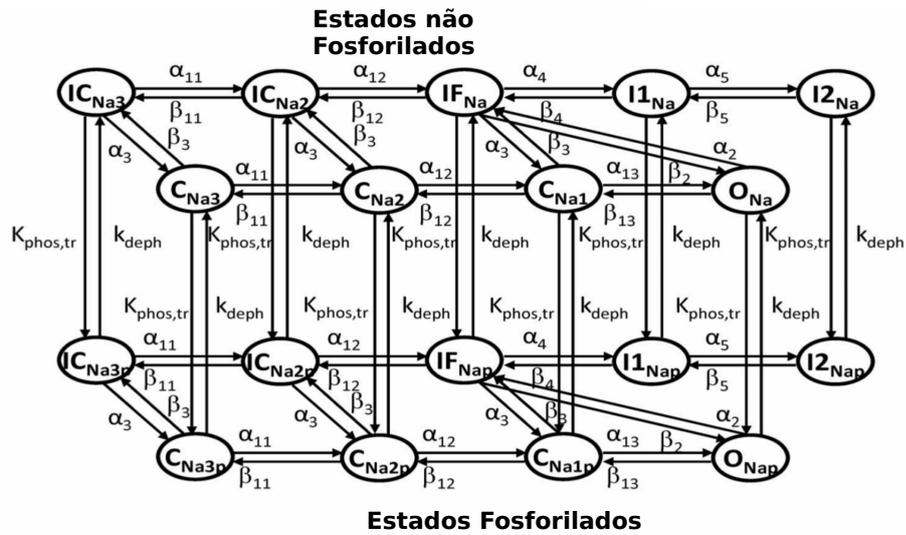


Figura 3.10: Cadeia de Markov para o canal de  $Na^+$ . Adaptado de Bondarenko (2014).

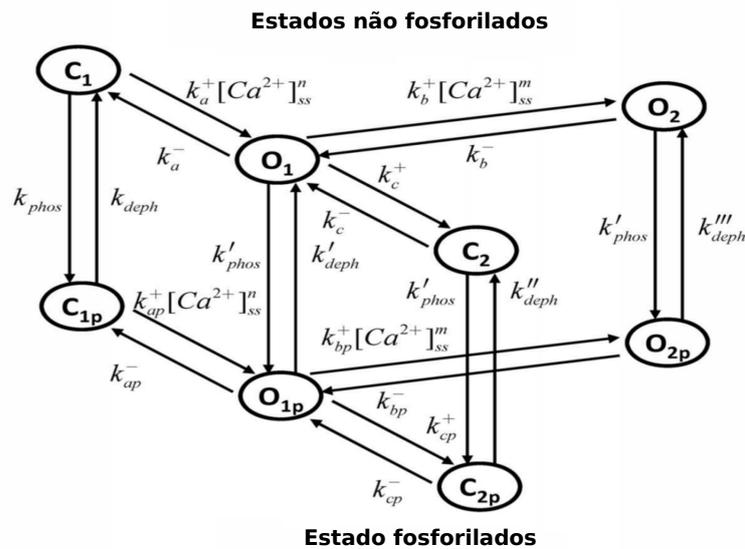


Figura 3.11: Cadeia de Markov para o Receptor Rianodina. Adaptado de Bondarenko (2014).

Ao observar as modificações realizadas nos modelos para os canais iônicos de  $I_{CaL}$ ,  $I_{Na}$  e  $RR$  têm-se uma noção da complexidade do atual modelo.

### 3.7 Simplificação do Modelo

Como mencionado anteriormente, o novo modelo de Bondarenko (2014) descreve os caminhos bioquímicos e o acoplamento da eletrofisiologia envolvidos na estimulação

$\beta$ -1 adrenérgica ( $\beta$ -1-AR). Uma vez que estamos interessados apenas nos aspectos de eletrofisiologia, foi implementada uma versão reduzida e simplificada deste modelo. Nossa implementação considera todas as 102 Equações Diferenciais Ordinárias (EDOs) associadas à parte eletrofisiológica, mas mantém as concentrações bioquímicas relevantes constantes, ou seja, independente do tempo. Portanto, para simular os efeitos do estímulo  $\beta$ -1-AR assim como no modelo original, considerou-se que os cardiomiócitos estão sob a presença de  $1.0\mu M$  de Isoproterenol (ISO). Desta forma assume-se que as concentrações responsáveis pela fosforilação, correspondentes à subunidade catalítica de PKA na caveolar, extracaveolar e compartimentos citosólicos são definidas para  $0.38\mu M$ ,  $0.78\mu M$  e  $0.3\mu M$ , respectivamente. Quatro proteínas são responsáveis pelo processo de desfosforilação, PP1, encontrada na caveolar e extracaveolar, e PP2A, encontrada na caveolar e no citosol, ambas as concentrações utilizadas foram, respectivamente:  $[PP1]^{cav} = 0.1\mu M$ ,  $[PP1]^{ecav} = 0.1\mu M$ ,  $[PP2A]^{cav} = 0.1\mu M$  e  $[PP2A]^{cyt} = 0.0607843\mu M$ . O total da concentração de fosfatase foi inicializado como  $[PP]^{cav} = 0.2\mu M$ . Estas proteínas assumem estes valores sob o estímulo  $\beta$ -1-AR, como segue a Figura a seguir:

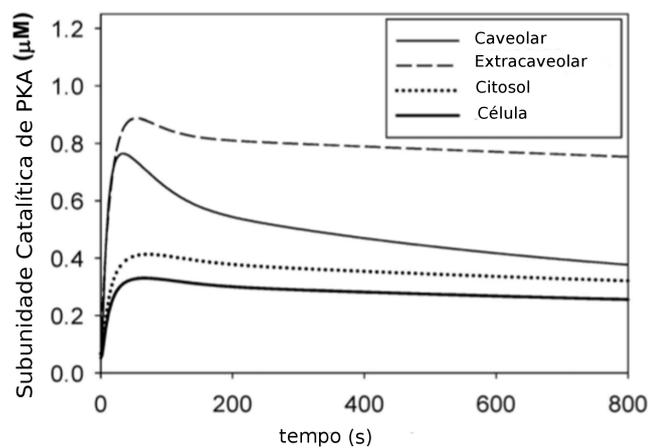


Figura 3.12: Variação das concentrações das subunidades catalíticas PKA durante o tempo. A linha fina representa a concentração: na cavolae, a linha tracejada na extracaveolar, a linha pontilhada nos compartimentos citosólicos, e a linha sólida em negrito representa todo o volume da célula. A concentração foi observada após a aplicação de  $1\mu M$  de Isoproterenol. Adaptado de Bondarenko (2014)

### 3.8 O modelo de Chen *et al.* (2011)

Como já foi visto em seções anteriores, o efluxo de  $Ca^{2+}$  correspondente à liberação espontânea de  $Ca^{2+}$  (LEC) ocorre devido às flutuações dos Receptores Rianodina (RRs). Estas flutuações podem induzir transientes de  $Ca^{2+}$  espontâneos (TCE's), que se propagam em formas de ondas de  $Ca^{2+}$ . A LEC pode induzir pós despolarizações atrasadas (PDAs), levando à atividade arritmogênica do coração. No trabalho de Chen *et al.* (2011) foi apresentado um modelo baseado em dados experimentais de LEC, reproduzindo a distribuição de tempo dos pulsos espontâneos de  $Ca^{2+}$  e as principais características da propagação de  $Ca^{2+}$  que são reproduzidas através de (TCE's). O modelo de Chen *et al.* (2011) foi acoplado a um modelo iônico para o potencial de ação ventricular de coelhos (Mahajan *et al.*, 2008). Foi implementado para estudar e reproduzir a formação da batida ectópica em um cabo unidimensional de cardiomiócitos, simulando LEC e PDAs. Além disto, o modelo reproduz o instante de maior probabilidade dos TCE's e as propriedades de propagação das ondas de  $Ca^{2+}$ . O modelo fenomenológico de LEC de Chen *et al.* (2011) simula características observadas experimentalmente em Wasserstrom *et al.* (2010).

Em Chen *et al.* (2011), o cardiomiócito é representado como uma coleção de compartimentos subcelulares distribuídos espacialmente, contendo elementos chave do ciclo de  $Ca^{2+}$  como podemos observar na Figura (3.13) a seguir. Estes compartimentos subcelulares são denominados como unidades de liberação de  $Ca^{2+}$  (ULCs). Cada ULC consiste em: 1) junção diádica, onde alguns Canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L (1-5 em número) estão na membrana celular em estreita proximidade com um grupo de 50 a 150 canais RRs, ligados ao espaço juncional do retículo sarcoplasmático; 2) espaço submembranar; 3) o volume do mioplasma, que representa o volume do espaço em que  $Ca^{2+}$  se difunde; 4)(JSR - *do inglês junctional sarcoplasmic reticulum*) espaço juncional do retículo sarcoplasmático, que representa a porção do RS que é próxima da membrana celular e 5)(NSR - *do inglês network sarcoplasmic reticulum space*) espaço correspondente a rede de RS, representando o conjunto de grandes quantidades de RS.

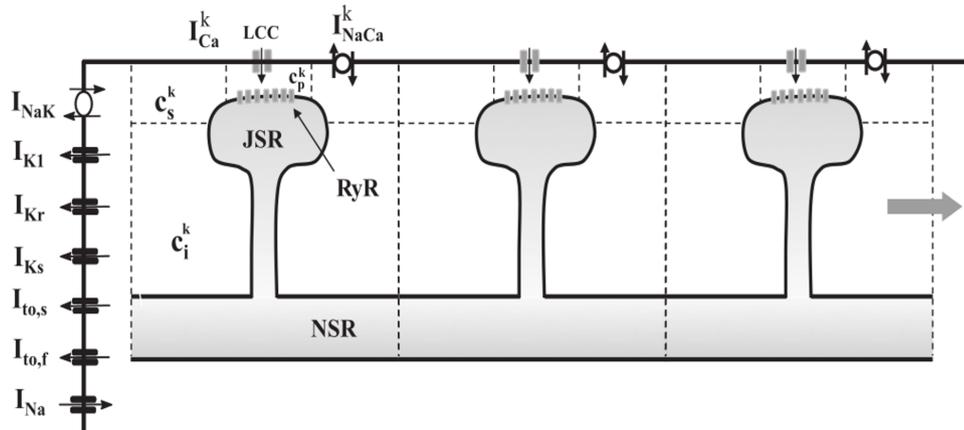


Figura 3.13: Ilustração de distribuição espacial dos canais iônicos e compartimentos envolvidos no ciclo de  $Ca^{2+}$ . A concentração de  $Ca^{2+}$  na junção diádica, o espaço submembranar, a região citoplasmática, o espaço juncional do retículo sarcoplasmático e o espaço correspondente à rede do retículo sarcoplasmático, são denotadas como  $c_p^k$ ,  $c_s^k$ ,  $c_i^k$ ,  $c_{jsr}^k$  e  $c_{skr}^k$  respectivamente,  $k$  escrito nos índices superiores correspondem a cada unidade de liberação do  $Ca^{2+}$ . Adaptado de Chen *et al.* (2011).

Chen *et al.* (2011) desenvolveu um modelo estocástico para simular LEC considerando os detalhes do esquema representado na Figura (3.13). A principal limitação do modelo estocástico, especialmente distribuído, é que ele é muito exigente em termos computacionais. Isso porque uma simulação de uma única ULC envolve a simulação estocástica exata de cerca de 100 canais de RRs independentes. No entanto, um miócito cardíaco típico consiste de cerca de  $10^4$  ULCs, e, por conseguinte, um modelo que considera um pequeno tecido de aproximadamente  $10^3$  células irá exigir a simulação de cerca de  $10^9$  canais iônicos, o que pode ser computacionalmente intratável. Assim, viu-se a necessidade de simplificar a distribuição espacial das ULCs na célula. A partir de estudos de ultra estrutura cardíaca, sabe-se que a célula pode ser dividida em várias seções de aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$  de largura e um diâmetro de 20 - 50  $\mu\text{m}$ , estas seções são denominadas como sarcômeros. Em um célula comum há cerca de 100 - 150 sarcômeros, e acredita-se que cada sarcômero contém aproximadamente a mesma quantidade e distribuição de proteínas envolvidas no ciclo de  $Ca^{2+}$ .

Para o desenvolvimento deste modelo foi utilizada a geometria da célula particionada em seções, como uma matriz linear de sarcômeros acoplados. Utilizando a descrição simplificada da célula foi possível modelar LEC especificando a taxa espontânea de TCE's para cada sarcômero e também a velocidade de uma frente de onda que se propaga e se move de um sarcômero para o outro. O miócito cardíaco foi dividido em uma estrutura 1D de 150 unidades, onde cada unidade corresponde a um sarcômero. Para modelar a dinâmica de LEC, cada unidade do sarcômero pode estar em dois estados, 1 ou 0 ou ativo ou inativo, respectivamente. A formação do transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo no sarcômero foi modelada de acordo com a atribuição de uma taxa que calcula a probabilidade em que um transiente espontâneo de  $Ca^{2+}$  pode acontecer em um sarcômero no intervalo de tempo  $dt$ .

Para realizar ajustes de acordo com os dados experimentais, a taxa de ativação espontânea utilizada foi:

$$\Gamma_s = \begin{cases} 0 & \text{se } x \leq 1 \\ 8 \times 10^{-9} \exp(13.1(x - 1)) & \text{se } 1 < x < 2.5 \\ 2.73 & \text{se } x \geq 2.5, \end{cases} \quad (3.19)$$

onde,  $\Gamma_s$  é dado em unidades de (pulsos de  $Ca^{2+}$ )/ms,  $x$  é a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS em unidade  $mM$ , o valor escolhido para a primeira condição de  $\Gamma_s$  foi  $x \leq 1mM$ , pois LEC é rara em concentrações menores do que  $1 mM$ . Para modelar a propagação de ondas de  $Ca^{2+}$  na direção longitudinal, o modelo da estrutura celular deve reproduzir a velocidade de onda de  $Ca^{2+}$  observada experimentalmente (Wasserstrom *et al.*, 2010). Para incorporar a velocidade de propagação ao modelo, foi implementada uma regra que, uma vez que a unidade da estrutura celular particionada é ativada (ou seja, ocorre uma transição de 0 - 1), uma unidade vizinha que está no estado 0 pode desencadear a transição para o estado 1, só depois de um tempo de espera  $\tau_w$ :

$$\tau_w = \frac{ds}{v_{Ca}}, \quad (3.20)$$

onde,  $d_s = 1\mu M$  é aproximadamente a distância entre os centros dos sarcômeros adjacentes e  $v_{Ca}$  é a velocidade de propagação da onda de  $Ca^{2+}$ :

$$v_{Ca}(x) = \exp[a(x - b)] + c, \quad (3.21)$$

onde  $a = 3.2mM^{-1}$ ,  $b = 0.6mM$ , e  $c = 112\mu m/s$ . Desta forma, pode-se garantir que a velocidade de propagação de uma unidade da estrutura celular particionada corresponda com a velocidade longitudinal da onda de  $Ca^{2+}$  medida experimentalmente.

Neste modelo a probabilidade de que um transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo aconteça em uma ULC e ative uma vizinha é fortemente dependente da concentração de  $Ca^{2+}$  armazenada no RS. Foi descoberto que no sistema acoplado de ULCs, a probabilidade de transmissão de uma ULC para a outra é uma função sigmóide da concentração de  $Ca^{2+}$  no RS, de modo que a baixa concentração de  $Ca^{2+}$  impede que a onda se propague, enquanto que em altas concentrações de  $Ca^{2+}$  a onda pode propagar-se a uma distância substancial na célula. Os dados experimentais foram modelados levando em conta que a propagação de  $Ca^{2+}$  só ocorre a partir de um valor mínimo para a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS, assim o limite da propagação é escolhido para que seja menor do que a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS, como o considerado em Wasserstrom *et al.* (2010). De acordo com estes dados, a concentração de  $[Ca^{2+}]_e = 4mM$ , que no atual modelo corresponde à concentração de  $Ca^{2+}$  no RS que é igual a  $1.4mM$ . Para este modelo foi escolhido o valor de  $x_o = 1.0mM$ , neste instante ocorre o início da propagação da onda. A função sigmoide escolhida é:

$$p(x) = \tanh[\lambda(x - x_o)] + 1/2, \quad (3.22)$$

onde,  $\lambda = 5.6mM^{-1}$  e  $x$  é a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS. Uma outra estimativa importante é a do valor de  $\tau_d$ , que corresponde ao tempo médio da duração do transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo em que todas as ULCs são ativadas praticamente ao mesmo tempo e liberam  $Ca^{2+}$  por um período comparável à duração média do período de ativação. Desta forma, o valor do tempo médio de duração do transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo é  $\tau_d = 30ms$ .

Este modelo reproduz vários efeitos da LEC como PDAs e PAEs, os detalhes podem ser encontrados em Chen *et al.* (2011).

### 3.9 Simulação Artificial de LECs

Em suma, acredita-se que os mecanismos associado à gênese dos PAEs são os seguintes (Faber e Rudy, 2007): um evento de liberação espontânea  $Ca^{2+}$  (LEC) ocorre; LEC dispara um evento transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo (TCEs); TCEs ativam a bomba de NCX; o influxo de  $Na^+$  provoca a geração de um PAE. Portanto, o principal fator que ativa um PAE pode ser considerado um evento TCE. LEC é um evento de natureza estocástica. Dados experimentais de Brunello *et al.* (2013), que é um trabalho recente, mostraram que sob estímulo  $\beta$ -AR, a frequência dos eventos de TCEs observados é de 5% em cardiomiócitos isolados de camundongos em testes realizados com o ciclo de 1Hz. Modelos estocásticos complexos têm sido desenvolvidos para descrever a gênese, desenvolvimento e efeitos dos eventos de TCEs em cardiomiócitos isolados (Chen *et al.*, 2011). Uma alternativa é prescrever um evento TCE e observar como este afeta a eletrofisiologia dos cardiomiócitos.

Para isso, foi feito: entre dois PAs impusemos a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir do RS, por substituição da variável  $J_{liberacao}$  do modelo por uma função prescrita  $J_{LEC}(t)$  que somente depende do tempo. A função  $J_{LEC}(t)$  reproduz os valores salvos da variável  $J_{liberacao}$  durante um PA, isto é  $J_{LEC}(t)$  tem a duração de aproximadamente 80ms.

### 3.10 Simulação estocástica de LECs

Para simular a LEC de forma estocástica acoplando o modelo de Chen *et al.* (2011) ao modelo de Bondarenko (2014), foi feito o particionamento da célula em 150 sarcômeros. Também foi criada uma nova variável  $J_{liberacao_2}$  que corresponde ao fluxo extra que o RS libera, devido à indução por intermédio de TCEs. Para isto viu-se a necessidade de calcular taxas de liberação espontânea e de influência do vizinho para que o novo fluxo  $J_{liberacao_2}$  esteja ativo ou inativo na mesma proporção em que os sarcômeros se ativam ou

se inativam.

Foi criada uma função  $Espon\tilde{t}aneo()$  que calcula o número de sarcômeros abertos ou ativos  $n_{NSA}$  naquele dado instante de tempo de acordo com a taxa representada pela Equação (3.26). Após o cálculo de  $n_{NSA}$  que varia de 0 a 150, o fluxo de  $J_{liberacao_2}$  é atualizado de acordo com a seguinte Equação:

$$J_{liberacao_2} = (v_1 \times (n_{NSA}/150) \times ([Ca]_{JSR} - [Ca]_{ss}) \times P_{RyR_{max}}). \quad (3.23)$$

Onde  $v_1 = 4.5ms^{-1}$  é a permeabilidade máxima do RR,  $[Ca]_{JSR}$  é a concentração de  $Ca^{2+}$  no espaço juncional do RS,  $[Ca]_{ss}$  concentração de  $Ca^{2+}$  no subespaço do RS e  $P_{RyR_{max}}$  é o fator de modulação do RR. Esta Equação foi baseada na Equação  $J_{release}$  de Bondarenko (2014). Após a atualização de  $J_{liberacao_2}$  ele é acrescentado ao  $J_{release}$  no cálculo de  $[Ca]_{ss}$  e subtraído do cálculo de  $[Ca]_{JSR}$  de acordo com as Equações (3.24) e (3.25).

Abaixo a equação que calcula a concentração de  $Ca^{2+}$  no subespaço do RS:

$$\frac{[Ca]_{ss}}{dt} = \frac{(J_{release} + J_{liberacao_2}) \times V_{JSR}}{V_{ss}} - \frac{J_{xfer} \times V_{myo}}{V_{ss}} + \frac{i_{CaL} \times A_{cap} \times C_m}{2 \times V_{ss} \times F}, \quad (3.24)$$

onde,  $J_{release}$  é o fluxo de liberação de  $Ca^{2+}$  do RS,  $J_{liberacao_2}$  é o fluxo de liberação espontânea do RS,  $V_{JSR} = 0.12 \times 10^{-6} \mu l$  é o volume juncional do RS,  $V_{ss} = 1.485 \times 10^{-9} \mu l$  é o volume do subespaço,  $J_{xfer}$  é o fluxo que sai do volume subespaço para o volume do mioplasma,  $V_{myo} = 25.84 \times 10^{-6} \mu l$  é o volume do mioplasma,  $i_{CaL}$  é a corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L,  $A_{cap} = 1.534 \times 10^{-4} cm^2$  é a área capacitiva da membrana,  $C_m = 1.0 \mu F/cm^2$  é a capacitância específica da membrana e  $F = 96.5 C/mol$  é a constante de Faraday.

Abaixo a equação que calcula a concentração de  $Ca^{2+}$  no espaço juncional do RS:

$$\frac{[Ca]_{JSR}}{dt} = B_{JSR} \times (J_{tr} - (J_{release} + J_{liberacao_2})). \quad (3.25)$$

Em que  $B_{JSR}$  é uma concentração de  $Ca^{2+}$  que depende da concentração de Calsequestrina no local juncional do RS e  $J_{tr}$  é o fluxo de  $Ca^{2+}$  que vêm da rede do RS para o local juncional do RS.

A função  $Esponaneo()$  calcula o valor de  $n_{NSA}$  de acordo com a variável  $ran$  que assume valores aleatórios entre  $[0, 1]$  calculados conforme a função  $rand$ . Desta forma, o valor de  $n_{NSA}$  é incrementado de acordo com a taxa  $\lambda(n_{NSA}) \times dt$ , ou seja se o valor de  $n_{NSA}$  for menor ou igual a 150 e se  $ran$  for menor ou igual à taxa  $\lambda(n_{NSA}) \times dt$  o valor de  $n_{NSA}$  é incrementado.

Os sarcômeros são desativados quando  $n_{NSA}$  for maior do que 0 e se o tempo atual menos o tempo do início da ativação dos sarcômeros  $(t_{atual} - t_{inicial}) > \tau_d$ , ou seja, se isto ocorrer  $n_{NSA} = 0$ , onde  $\tau_d = 60ms$  é o tempo médio de duração da onda de  $Ca^{2+}$ .

O modelo que temos para a abertura e fechamento dos sarcômeros corresponde ao seguinte diagrama de estados:

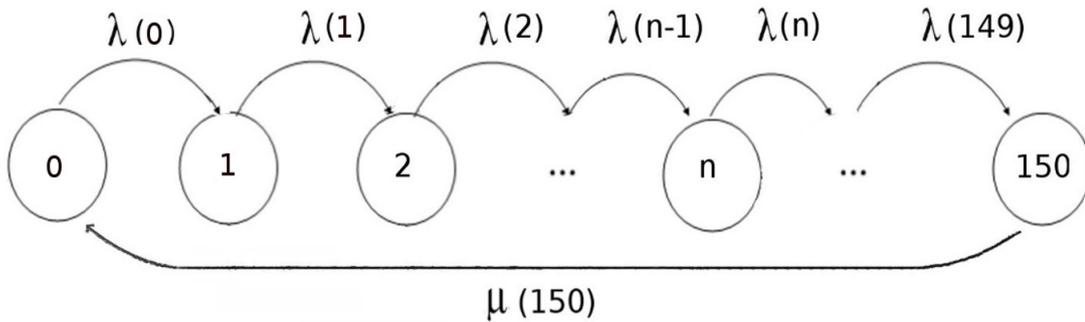


Figura 3.14: Diagrama de estados que representa a ativação e desativação dos 150 sarcômeros. A taxa  $\lambda(n_{NSA})$  é a taxa de ativação, calculada pela Equação (3.26). A taxa  $\mu(150)$  corresponde a taxa de desativação dos sarcômeros, que desativam-se todos ao mesmo tempo.  $\mu(150)$  é igual a  $\frac{1}{\tau_d}$  como será visto a seguir.

O cálculo da taxa  $\lambda(n_{NSA})$  foi efetuado com base no diagrama de estados a seguir Figura (3.14), em termos da modelagem da cadeia de Markov  $N = N(t), t \geq 0$ . A variável  $N(t)$  representa o número de sarcômeros abertos da estrutura celular, e toma valor no

espaço de estados  $E = \{0, 1, \dots, 150\}$ , cujas taxas de transição são dadas através do diagrama Figura (3.14). De acordo com o diagrama a taxa de ativação espontânea mais a taxa de ativação via influência do vizinho é dada por:

$$\lambda(n_{NSA}) = (150 - n_{NSA}) \times \Gamma_s + (150 - n_{NSA}) \times LEC_{IV}. \quad (3.26)$$

A desativação dos sarcômeros é feita de forma determinística por enquanto, todos eles são fechados de acordo com um tempo médio de duração do transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo. Para o modelo de Bondarenko (2014) a taxa correspondente ao tempo médio  $\tau_d = 60ms$  do TCE foi ajustada para  $\mu(150) = \frac{1}{\tau_d}$ . A taxa de abertura espontânea foi escolhida de acordo com a taxa  $\Gamma_s$  do modelo de Chen *et al.* (2011) Equação (3.19). No modelo de Chen *et al.* (2011) a taxa foi escolhida de acordo com dados experimentais de coelhos, entretanto como o modelo de Bondarenko (2014) é para camundongos, foram feitos ajustes para esta taxa, como pode-se observar na Equação a seguir:

$$\Gamma_s = \begin{cases} 0 & \text{se } x \leq \min \\ \left( 8 \times 10^{-9} \exp(13.1(x \times (10^{-3}) - 1)) \times \frac{1.5}{((\max \times 10^{-3}) - (\min \times 10^{-3}))} \right) & \text{se } \min < x < \max \\ 2.73 & \text{se } x \geq \max, \end{cases} \quad (3.27)$$

onde os valores de  $\max = 1400$  e  $\min = 1300$  foram estipulados para ajuste de parâmetros e o termo  $(1.5/((\max \times 1.e - 03) - (\min \times 1.e - 03)))$  foi acrescentado para ajustar a curva de acordo com a Equação (3.19), inclusive o termo foi acrescentado também para um ajuste das unidades, uma vez que o modelo de Bondarenko (2014) foi implementado com os valores das concentrações em unidades de  $\mu M$  e  $x$  é a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS. Para o cálculo da taxa de influência dos vizinhos denominada por,  $LEC_{IV}$ , foram realizados os seguintes cálculos:

$$LEC_{IV} = m_{NSA} \times (1/\tau_w) \times p, \quad (3.28)$$

onde,  $m_{NSA}$  é o número médio de vizinhos abertos adjacentes,  $\tau_w$  é o tempo médio de espera que um sarcômero leva até ativar uma unidade vizinha, e  $p$  é a probabilidade de um transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo acontecer em um sarcômero e ativar uma unidade vizinha, ambos os valores utilizados para  $\tau_w$  e  $p$  foram calculados de acordo com as Equações (3.20) e (3.22) respectivamente, conforme Chen *et al.* (2011). O cálculo de  $m_{NSA}$  é realizado de acordo com a expressão:

$$m_{NSA} = \alpha \left( \frac{2n_{NSA}}{149} \right) + (1 - \alpha) \left( \frac{2}{150 - n_{NSA}} \right), \quad (3.29)$$

$n_{NSA}$  corresponde ao número de sarcômeros abertos e  $\alpha$  é um parâmetro entre  $[0,1]$ , representado por:

$$\alpha = \frac{\Gamma_s}{\Gamma_s + LEC_{IV}}. \quad (3.30)$$

A seção a seguir explica como foi feita a estimativa da taxa  $m_{NSA}$ , Equação (3.29).

### **3.10.1 Estimativa do número de sarcômeros vizinhos ativos adjacentes: $m_{NSA}$**

Para fazer a estimativa para o cálculo do número de sarcômeros vizinhos ativos (ou abertos) adjacentes de um sarcômero inativo (ou fechado) foram consideradas duas hipóteses.

#### 3.10.1.1 Primeira Hipótese

Considera que todos os sarcômeros ativos estão distribuídos uniformemente. Através desta hipótese foram feitas as seguintes considerações: Seja  $j$  o número que representa um determinado sarcômero,  $n_{NSA}$  o número de sarcômeros abertos. Seja  $S_j$  uma variável

aleatória que indica se o  $j$ -ésimo sarcômero está ativo ou não, isto é:

$$S_j = \begin{cases} 1 & \text{se o } j\text{-ésimo sarcômero está aberto} \\ 0 & \text{se o } j\text{-ésimo sarcômero está fechado.} \end{cases} \quad (3.31)$$

Seja  $(a_1, \dots, a_N) \in \{0, 1\}^N$ , uma sequência de 0's 1's qualquer, onde  $N$  é o número total de sarcômeros. Considerando a hipótese de que os sarcômeros estão uniformemente distribuídos têm-se:

$$P((S_1, \dots, S_N) = (a_1, \dots, a_N)) = \frac{1}{\text{n}^\circ \text{ total de seq. possíveis}}. \quad (3.32)$$

Escolha um  $j \in 2, \dots, N - 1$  qualquer. A probabilidade do sarcômero  $S_j$  possuir dois vizinhos fechados, dado que  $S_j$  está fechado é:

$$P(S_{j-1} = 0, S_{j+1} = 0 | S_j = 0) = \frac{P(S_{j-1} = 0, S_j = 0, S_{j+1} = 0)}{P(S_j = 0)}. \quad (3.33)$$

Assumindo uma condição periódica de contorno entre os sarcômeros, de acordo com a Figura (3.15):

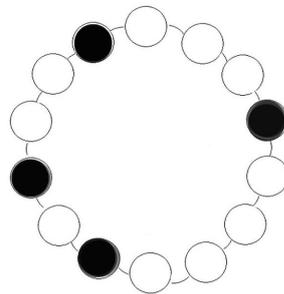


Figura 3.15: Representação da condição periódica de contorno entre os sarcômeros.

Como os sarcômeros fechados estão distribuídos de forma uniforme, podemos supor que  $j = 2$ , sem perda de generalidade:

$$\begin{aligned}
P(S_1 = 0, S_2 = 0, S_3 = 0) &= \frac{\text{número de seqüências com três zeros consecutivos}}{\text{número total de seqüências}} \\
&= \frac{\binom{N-3}{n_{NSA}}}{\binom{N}{n_{NSA}}} = \frac{(N-n_{NSA})(N-n_{NSA}-1)(N-n_{NSA}-2)}{N(N-1)(N-2)}, \quad (3.34)
\end{aligned}$$

onde,  $\binom{N}{n_{NSA}}$  é o número de formas de distribuir o número de sarcômeros ativos  $n_{NSA}$  em  $N$  espaços. Analogamente:

$$P(S_j = 0) = \frac{N - n_{NSA}}{N}, \quad (3.35)$$

assim,

$$P(S_{j-1} = 0, S_{j+1} = 0 | S_j = 0) = \frac{(N - n_{NSA} - 1)(N - n_{NSA} - 2)}{(N - 1)(N - 2)}. \quad (3.36)$$

Usando as mesmas ideias, a probabilidade do sarcômero  $S_j$  possuir um vizinho aberto, dado que está fechado é:

$$\begin{aligned}
P(S_{j-1} = 1, S_{j+1} = 0 \cup S_{j-1} = 0, S_{j+1} = 1 | S_j = 0) &= \\
&= 2P(S_{j-1} = 1, S_{j+1} = 0 | S_j = 0), \quad (3.37)
\end{aligned}$$

pela simetria do problema. Portanto, temos:

$$\begin{aligned}
P(S_{j-1} = 1, S_j = 0, S_{j+1} = 0) &= \quad (3.38) \\
&= \frac{\binom{N-3}{n_{NSA}-1}}{\binom{N}{n_{NSA}}} = \frac{(N - n_{NSA})(N - n_{NSA} - 1)n_{NSA}}{(N - 1)(N - 2)N},
\end{aligned}$$

e desta forma,

$$P(\text{um vizinho aberto} | S_j = 0) = \frac{2(N - n_{NSA} - 1)n_{NSA}}{(N - 1)(N - 2)}. \quad (3.39)$$

Analogamente,

$$P(\text{dois vizinhos abertos} | S_j = 0) = \frac{n_{NSA}(n_{NSA} - 1)}{(N - 1)(N - 2)}. \quad (3.40)$$

Concluindo, o número médio de vizinhos abertos de um sarcômero fechado de acordo com a Figura (3.15), dado que  $n_{NSA}$  sarcômeros estão abertos é:

$$\begin{aligned} m_1(n_{NSA}) &= 0 \times P(\text{zero vizinhos abertos} | S_j = 0) + \\ &\quad 1 \times P(\text{um viz. aberto} | S_j = 0) + \\ &\quad 2 \times P(\text{dois vizinhos abertos} | S_j = 0) = \\ &= \frac{2(N - n_{NSA} - 1)n_{NSA}}{(N - 1)(N - 2)} + \frac{2n_{NSA}(n_{NSA} - 1)}{(N - 1)(N - 2)}. \end{aligned} \quad (3.41)$$

Logo:

$$m_1(n_{NSA}) = \frac{2n_{NSA}}{(N - 1)}. \quad (3.42)$$

### 3.10.1.2 Segunda Hipótese

Para esta hipótese, tome como exemplo um determinado “bloco” de sarcômeros vizinhos, suponha que inicialmente um deles é ativado espontaneamente. Cada sarcômero vizinho a este ativa-se agora por influência dele, e através desta influência todo o bloco de vizinhos se ativa, como na Figura 3.16. Suponha agora que todos os sarcômeros ativos estão próximos, sendo  $N$  o número de sarcômeros e  $n_{NSA}$  o número de sarcômeros abertos. Considera-se que esta é uma hipótese mais razoável, se a taxa de iniciação da liberação espontânea for muito menor do que a taxa de influência dos vizinhos. Desta forma, torna-se necessário o uso do parâmetro  $\alpha$  calculado pela Equação (3.30) para balancear as duas estimativas.

Para este caso o cálculo é bem simples: i) Se  $x < N - 2$ , então cada sarcômero fechado somente poderá ter no máximo um vizinho aberto. Somente dois dos  $N - n_{NSA}$  fechados possuem um vizinho aberto.

ii) Se  $x = N - 1$ , então o sarcômero fechado possui dois vizinhos abertos. O número

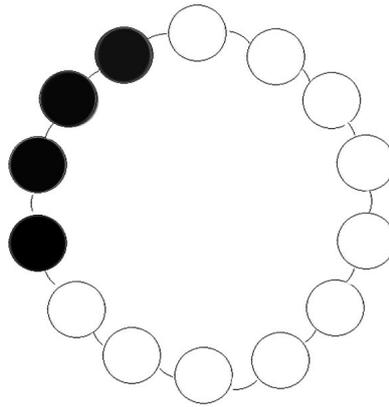


Figura 3.16: Representação do bloco de sarcômeros vizinhos ativos.

esperado de vizinhos abertos de um sarcômero fechado escolhido de forma aleatória é:

$$\begin{aligned}
 m_2(n_{NSA}) = & 0 \times P(\text{zero vizinhos abertos}) + \\
 & 1 \times P(\text{um vizinho aberto}) + \\
 & 2 \times P(\text{dois vizinhos abertos}).
 \end{aligned} \tag{3.43}$$

Sabe-se que:

$$P(\text{zero vizinhos abertos}) = \begin{cases} \frac{N-n_{NSA}-2}{N-n_{NSA}} & \text{se } 0 < n_{NSA} < N - 1 \\ 0 & \text{se } n_{NSA} = N - 1 \end{cases} \tag{3.44}$$

e,

$$P(\text{um vizinho aberto}) = \begin{cases} \frac{2}{N-n_{NSA}} & \text{se } 0 < n_{NSA} < N - 1 \\ 0 & \text{se } n_{NSA} = N - 1 \end{cases} \tag{3.45}$$

e,

$$P(\text{dois vizinhos abertos}) = \begin{cases} 0 & \text{se } 0 < n_{NSA} < N - 1 \\ 1 & \text{se } n_{NSA} = N - 1 \end{cases} \tag{3.46}$$

Portanto,

$$m_2(n_{NSA}) = \begin{cases} \frac{2}{N-n_{NSA}} & \text{se } 0 < n_{NSA} < N - 1 \\ 2 & \text{se } n_{NSA} = N - 1, \end{cases} \quad (3.47)$$

Ou melhor:

$$m_2(n_{NSA}) = \frac{2}{(N - n_{NSA})}. \quad (3.48)$$

Unindo as duas hipóteses chegamos à Equação (3.29) citada anteriormente para estimar  $m_{NSA}$ :

$$m_{NSA} = \alpha \times m_2(n_{NSA}) + (1 - \alpha) \times m_1(n_{NSA}). \quad (3.49)$$

Considerando que a primeira e a segunda hipóteses correspondem respectivamente ao cálculo do primeiro e segundo termos da Equação (3.29).

### 3.11 Simulação da mutação $NCX$

Como já foi visto em seções anteriores, um dos principais mecanismos de remoção do  $Ca^{2+}$  do miócito cardíaco é a corrente trocadora  $I_{NaCa}$  ou  $I_{NCX}$ . A mutação na bomba  $NaCa$  também conhecida como super expressão da bomba  $NCX$  envolve muitas mudanças na eletrofisiologia de um miócito cardíaco isolado como o descrito em Pott *et al.* (2012). Notavelmente este estudo demonstra uma mudança relevante consistindo em um aumento de 25 vezes na expressão da bomba  $I_{NCX}$ .

Para reproduzir este efeito, simulamos a principal mudança associada à mutação  $NCX$ , aumentando o parâmetro  $k_{NaCa}$  dos modelos Bondarenko *et al.* (2004) e Bondarenko (2014) em diferentes níveis, a partir de 50 % até 25 vezes de acordo com a Figura (3.17), onde  $k_{NaCa}$  é o fator de escala da do trocador  $NCX$ .

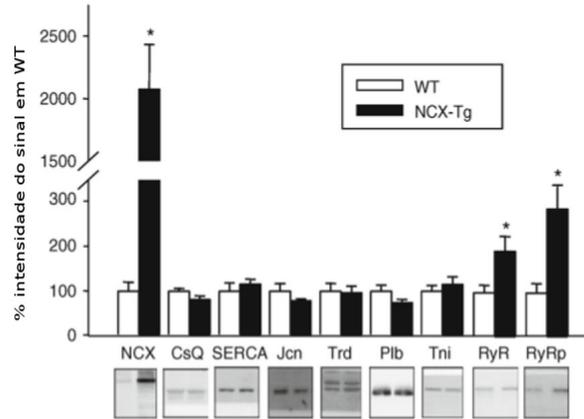


Figura 3.17: Comparação da expressão das proteínas em miócitos de controle(WT) e em miócitos que apresentaram a mutação(NCX-Tg). Adaptado de Pott *et al.* (2012)

### 3.12 Implementação e Ambiente Computacional

Ambos os modelos, Bondarenko *et al.* (2004) e Bondarenko (2014), foram implementados através da linguagem de programação C. Como os sistemas de EDOs são altamente *stiff*, principalmente porque possuem EDOs resultantes das cadeias de Markov modeladas para os canais iônicos, foi utilizado o método de integração BDF através da biblioteca CVODE (Cohen e Hindmarsh, 1996). O máximo passo de tempo utilizado nas simulações foi inicializado em  $0.01ms$ .

As simulações foram executadas em um processador Intel Core i7 (1.6 GHz, 8 GB RAM).

Para todas as simulações a corrente de estímulos foi:  $I_{stim} = 80pA/pF$ ,  $\tau_{stim} = 1.0ms$  que é o tempo de duração deste estímulo, a uma frequência de  $1Hz$ . Porém, na simulação artificial de LECs  $I_{stim}$  é iniciada quando  $t = 20ms$ . Já na simulação de LECs estocástica  $I_{stim}$  é iniciada em  $t = 1000ms$ .

O Pseudocódigo (1) abaixo representa o modelo de Bondarenko (2014) com  $J_{LEC}(t)$  imposto de forma artificial:

A seguir podemos compreender melhor como foi feita a implementação ao visualizar o Pseudocódigo da resolução do modelo celular, algoritmo 2, com o cálculo da liberação espontânea de forma estocástica.

---

**Algoritmo 1:** Pseudocódigo Bondarenko 1.
 

---

```

inicializa o  $dt$  e o  $tempo_{final}$ ;
inicializa parâmetros e as condições iniciais das  $EDO's$ ;
enquanto  $t < tempo_{final}$  faça
  | calcula o lado direito das  $EDO's$ ;
  | se  $t > 500ms \ \&\& \ t < 580ms$  então
  | |  $J_{liberacao} = J_{LEC}(t)$ 
  | fim
  | resolve as  $EDO's$ ;
  |  $t += dt$ ;
fim
retorna solução do sistema de  $EDO's$ ;

```

---



---

**Algoritmo 2:** Pseudocódigo Bondarenko 2.
 

---

```

inicializa o  $dt$  e o  $tempo_{final}$  ;
inicializa parâmetros e as condições iniciais das  $EDO's$ ;
enquanto  $t < tempo_{final}$  faça
  | calcula o lado direito das  $EDO's$ ;
  | chama a função  $Esponaneo()$  para realizar o cálculo estocástico;
  |  $n_{NSA} \leftarrow$  cálculo estocástico;
  | atualiza  $J_{liberacao_2}$  de acordo com o cálculo de  $n_{NSA}$ ;
  | resolve as  $EDO's$ ;
  |  $t += dt$ ;
fim
retorna solução do sistema de  $EDO's$ ;

```

---

Como já foi dito anteriormente o cálculo estocástico de sarcômero é realizado de acordo com a função  $Esponaneo()$ , a seguir podemos observar o Pseudocódigo (3):

---

**Algoritmo 3:** Pseudocódigo de  $Esponaneo()$ .
 

---

```

 $ran \leftarrow$  cálculo aleatório entre  $[0,1]$ ;
calcula  $\lambda(n_{NSA}) \times dt \leftarrow$  de acordo com a Equação (3.26);
se  $n_{NSA} < 150 \ \&\& \ ran \leq \lambda(n_{NSA}) \times dt$  então
  |  $n_{NSA} ++$ ;
fim
se  $n_{NSA} > 0 \ \&\& \ (t_{atual} - t_{inicial}) > \tau_d$  então
  |  $n_{NSA} = 0$  ;
fim
retorna o valor de  $n_{NSA}$ ;

```

---

## 3.13 Experimentos Realizados

### 3.13.1 Modelo de Bondarenko et al. (2004)

Os primeiros testes realizados foram com o Modelo de Bondarenko *et al.* (2004). Para simular LEC de forma artificial através da imposição de  $J_{LEC}(t)$  durante o intervalo de tempo  $500ms < t < 580ms$ . Em seguida, aumentou-se o parâmetro  $k_{NaCa}$  em até 25 vezes para reproduzir os efeitos da mutação do trocador  $NCX$ .

### 3.13.2 Modelo de Bondarenko (2014)

Inicialmente, foi feita uma comparação das curvas correspondentes aos PAs, transiente de  $Ca^{2+}$  e  $I_{CaL}$  na ausência e presença de  $1 \mu M$  de ISO. Da mesma forma anterior, realizou-se a simulação de LEC artificialmente, através de  $J_{LEC}(t)$ . O parâmetro  $k_{NaCa}$  foi aumentado em até 2,5 vezes para reproduzir os efeitos da mutação  $NCX$ . Este parâmetro foi aumentado em apenas até 2,5 vezes porque já foi o suficiente para reproduzir o Potencial de Ação Espontâneo. Simulou-se LEC de forma estocástica de acordo com os Pseudocódigos (2) e (3). Por último, o parâmetro  $k_{NaCa}$  foi aumentado em até 2,5 vezes para reproduzir a mutação  $NCX$ , no modelo para LEC estocástica.

## 4 Resultados e Discussão

Este capítulo, apresenta os resultados obtidos com a simulação do transiente de  $Ca^{2+}$  usando os dois modelos descritos no capítulo anterior.

### 4.1 Simulação de LEC de forma artificial

#### 4.1.1 Modelo de Bondarenko et al. (2004)

Imposição do pulso espontâneo de  $Ca^{2+}$  entre dois PAs através da função  $J_{LEC}(t)$ , que é uma função que depende apenas do tempo e como já foi explicado no capítulo anterior, reproduz os valores salvos de  $J_{liberacao}$  durante um PA, isto é  $J_{LEC}(t)$  tem duração de aproximadamente 80 ms.

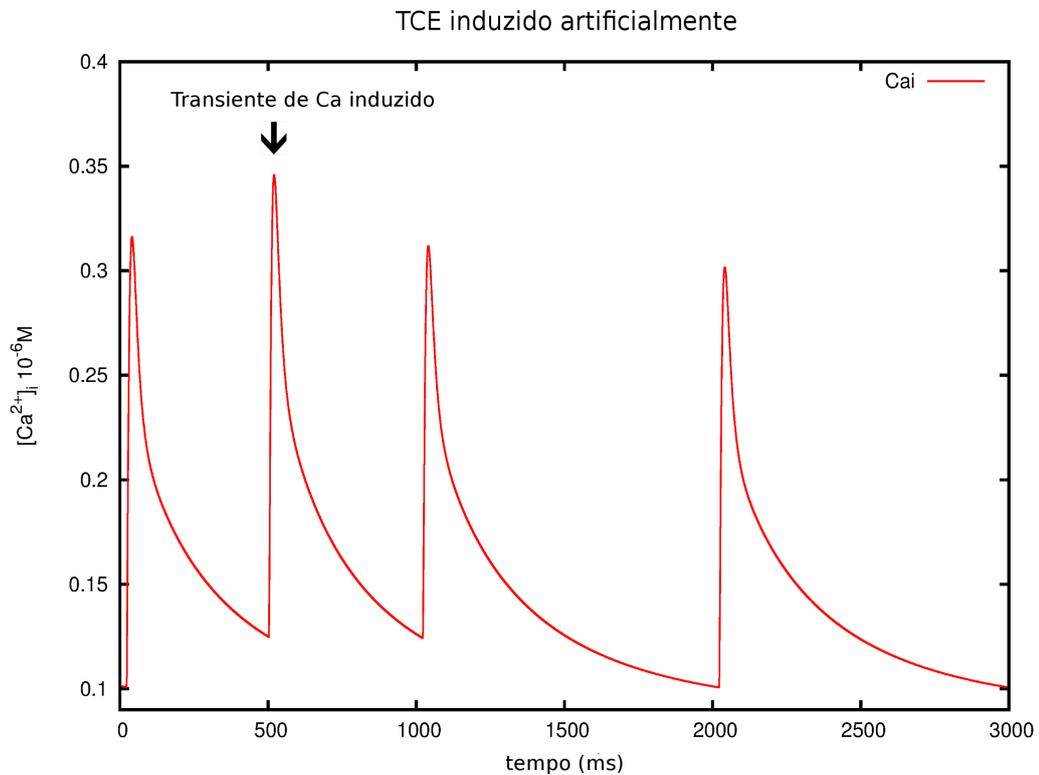


Figura 4.1: Transiente de  $Ca^{2+}$  (miócitos com frequência de 1Hz) e em  $t = 500ms$  a simulação de um transiente de  $Ca^{2+}$  (TCEs)

Foram realizados vários testes com o modelo de Bondarenko *et al.* (2004) com a finalidade de testar os efeitos da LEC. Primeiramente, de acordo com a Figura (4.1), foi induzido o transiente de  $Ca^{2+}$ . Nenhum efeito foi observado no PA. Em seguida, o parâmetro  $k_{NaCa}$  foi aumentado em 1,5; 2,0; 2,5 vezes e nenhum efeito da LEC foi observado. Desta forma viu-se a necessidade de aumentar o parâmetro  $k_{NaCa}$  até o máximo que já foi observado em dados experimentais. Veja a Figura (3.17) em que o parâmetro  $k_{NaCa}$  assume valores até 25 vezes maiores. O último teste realizado com este modelo foi o aumento de  $k_{NaCa}$  em 25 vezes, observe a Figura a seguir:

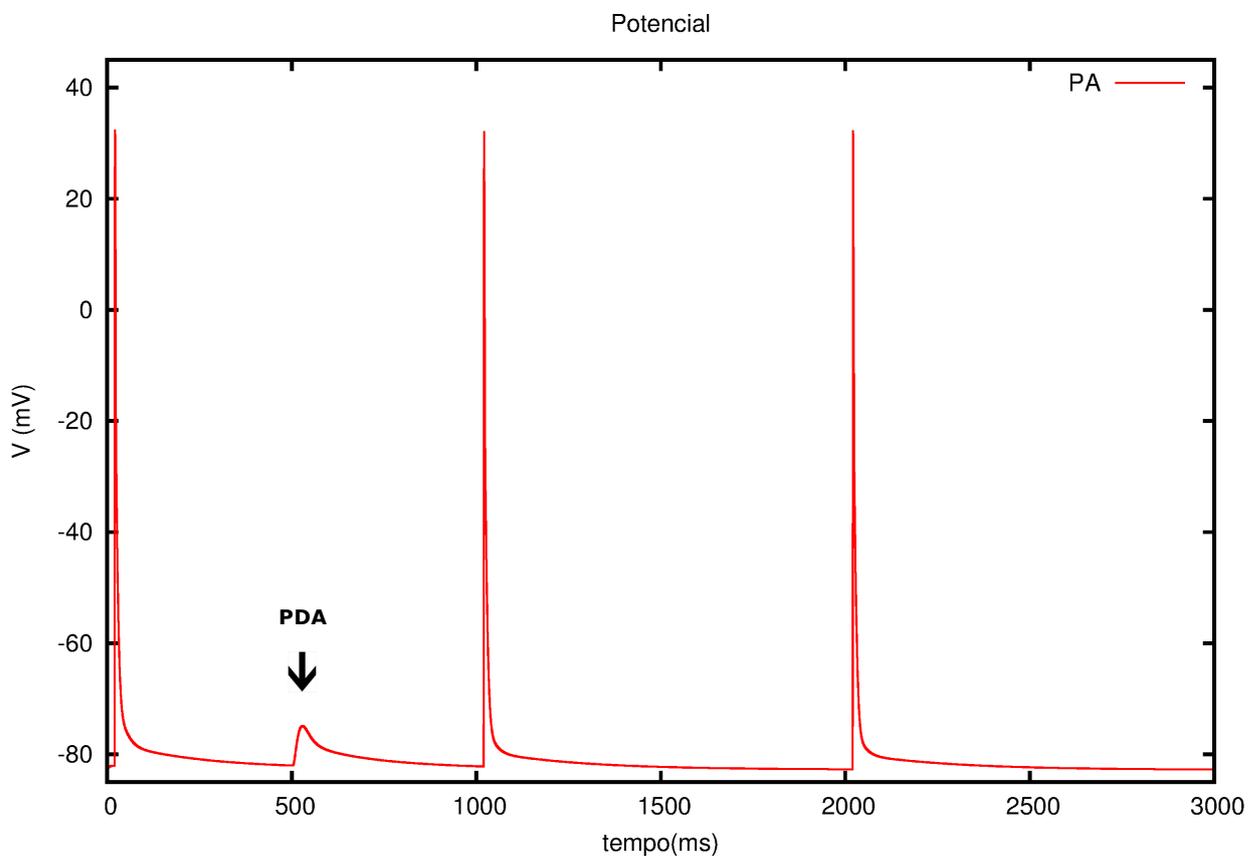


Figura 4.2: Potenciais de Ação de controle (Miócitos com frequência de 1Hz)

Como o modelo de Bondarenko *et al.* (2004) foi desenvolvido para garantir a homeostase celular, todas as equações foram ajustadas para este fim, e o modelo não reproduz PAEs. Através da Figura (4.2) que mesmo ao aumentar a expressão da bomba NCX em 25 vezes, o que podemos observar é a leve formação de uma PDA. Assim, no presente trabalho o modelo de 2004 não reproduziu os efeitos da estimulação  $\beta_1 - AR$  e portanto não gerou Potenciais de Ação Espontâneos (PAEs).

### 4.1.2 Modelo de Bondarenko (2014)

Inicialmente foram realizados alguns testes com a finalidade de comparar o teste que representa o cardiomiócito de controle (WT) em condições normais, com o teste que representa o cardiomiócito de controle (WT) sob estímulo  $\beta$ -AR, na presença de  $1 \mu M$  de Isoproterenol. As maiores alterações foram observadas no Potencial de Ação, Figura (4.3), no transiente de  $Ca^{2+}$ , Figura (4.4), e na corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L, Figura (4.5).

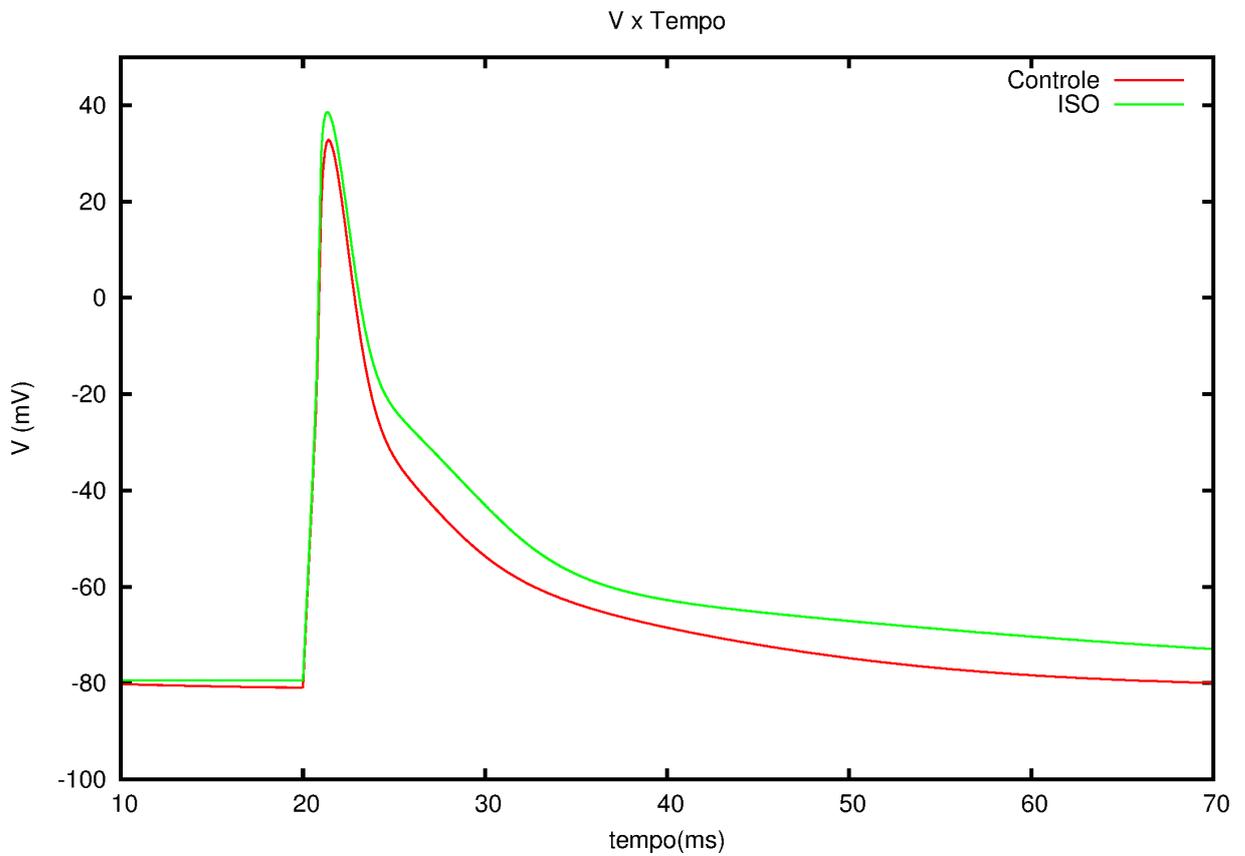


Figura 4.3: Representação da comparação do PA em células de controle com o PA de células sob estímulo  $\beta$ -AR ( $1 \mu M$  de ISO).

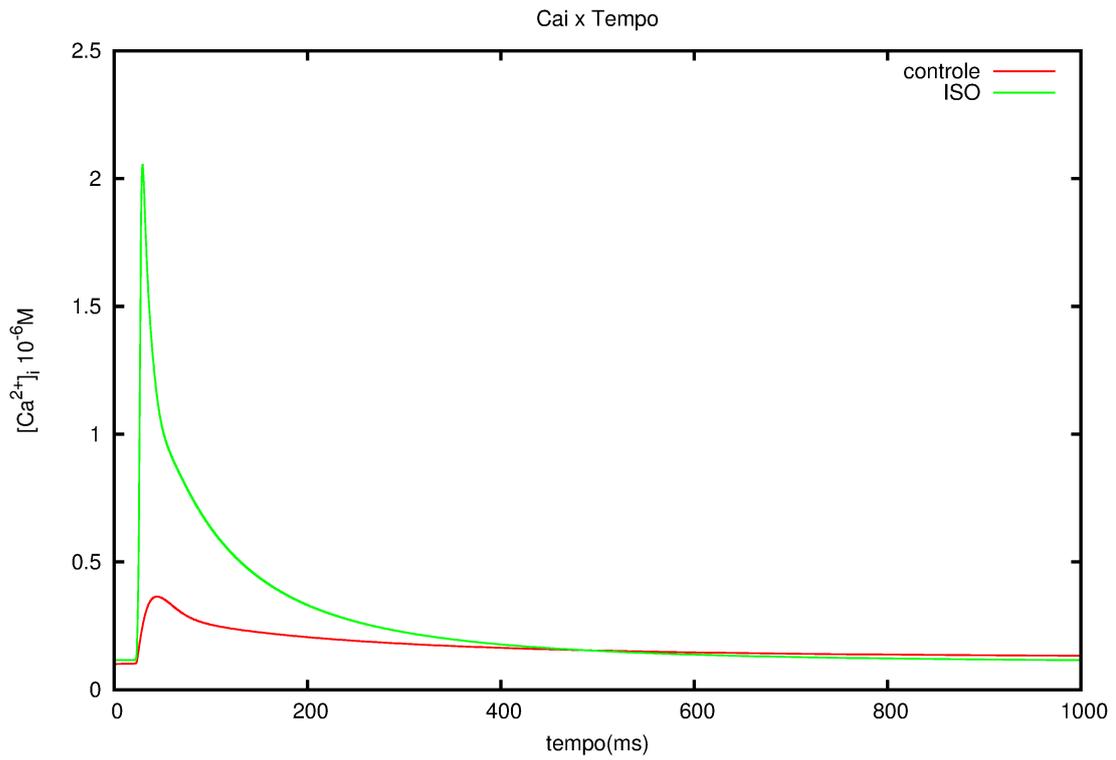


Figura 4.4: Representação da comparação do transiente de  $Ca^{2+}$  em células de controle com o transiente de  $Ca^{2+}$  de células sob estímulo  $\beta$ - AR ( $1 \mu M$  de ISO).

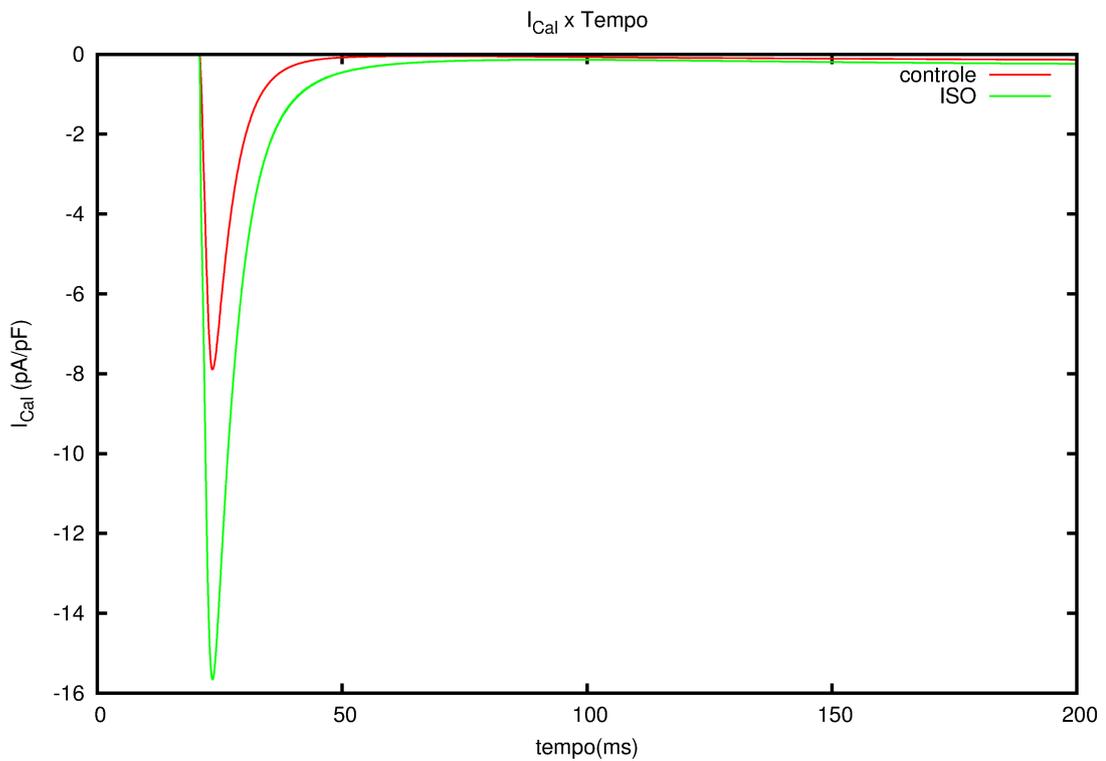


Figura 4.5: Representação da comparação da corrente  $I_{CaL}$  em células de controle com a corrente  $I_{CaL}$  de células sob estímulo  $\beta$ - AR ( $1 \mu M$  de ISO).

De acordo com as Figuras anteriores 4.3, 4.4 e 4.5, pode-se observar que as maiores alterações estão no transiente de  $Ca^{2+}$  e na corrente  $I_{CaL}$ .

#### 4.1.2.1 Reproduzindo estímulo $\beta_1 - AR$ (ISO) e a mutação $NCX$

Impusemos o pulso de  $Ca^{2+}$  espontâneo, da mesma forma que foi imposto no modelo de 2004, através de  $J_{LEC}(t)$ . Além deste detalhe, foram feitas as simulações representando a mutação  $NCX$ , através do aumento do parâmetro  $k_{NaCa}$  que toma valores a partir de 1 (normal, sem mutação) até 25 vezes mais. Para valores altos de  $k_{NaCa}$  foram observadas a ocorrência de *delayed afterdepolarizations* - DADs, observe a Figura (4.6). Estas são, como já foi visto nos capítulos anteriores, oscilações da diferença de potencial da membrana que ocorrem após a fase de repolarização completa do potencial de ação cardíaco.

A seguir pode-se acompanhar o resultado do modelo em relação à combinação do efeito de ISO juntamente com a mutação  $NCX$ . Os testes realizados representam os efeitos de 1.0  $\mu$ M de ISO. A Figura (4.6) a seguir representa os testes realizados com diferentes expressões de  $I_{NCX}$ :  $k_{NaCa}$  foi aumentada a partir de 1 (sem mutação) até 2,5 vezes. Para os menores valores que  $k_{NaCa}$  assume, observa-se a ocorrência de DADs com uma amplitude bem maior do que no caso sem ISO, compare a Figura (4.2) em que  $k_{NaCa}$  foi aumentada em 25 vezes com a Figura (4.6). Pode-se observar também o aumento da duração do PA. Finalmente para o valor de  $k_{NaCa} = 2,5$  observa-se a formação do PAE.

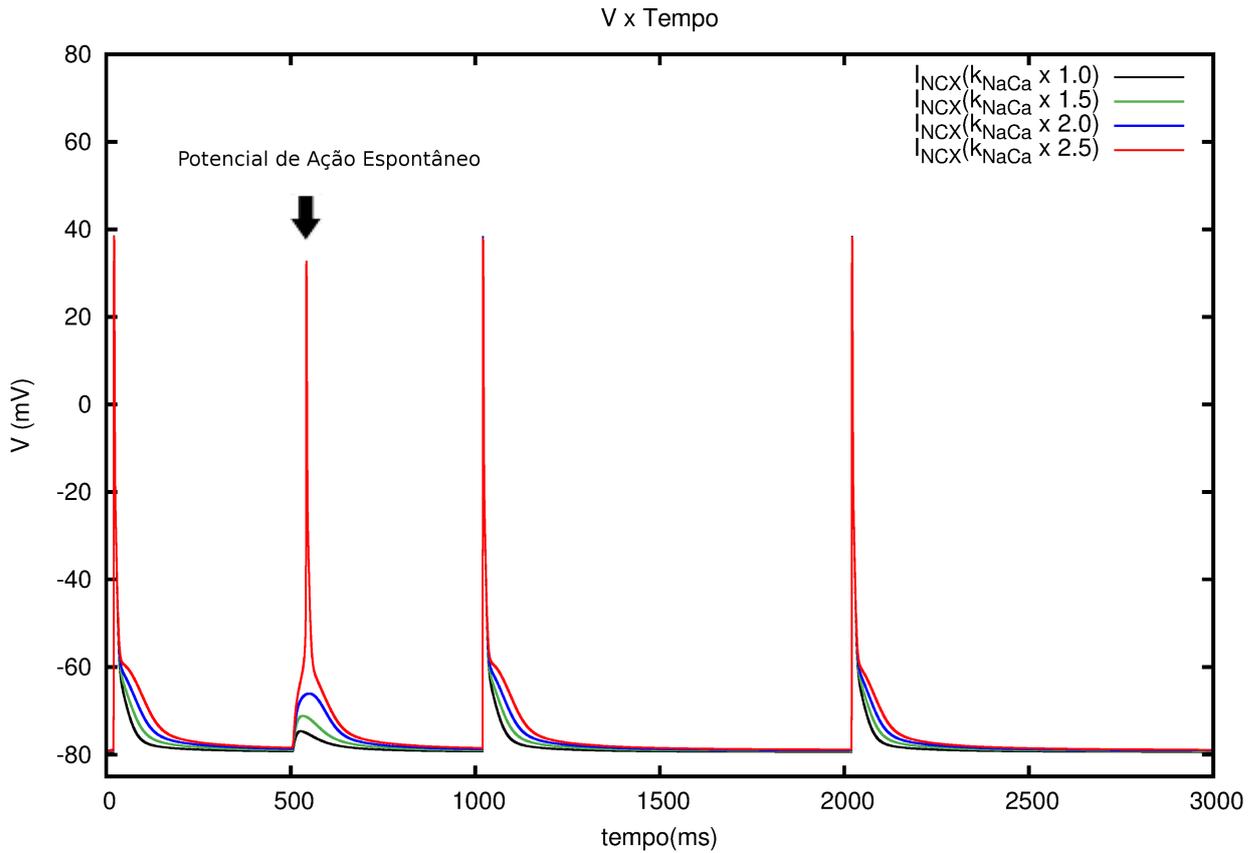


Figura 4.6: ISO + Simulação da mutação  $NCX$ , através do aumento gradativo da expressão da bomba  $NCX$ . Um PAE é observado quando  $k_{NaCa} = 2,5$ , em  $t = 500ms$  foi imposto um TCE

Pela Tabela 4.1 a seguir, pode-se acompanhar a variação da amplitude dos PDAs até a geração do PAE e também a variação da duração dos PAEs - DPA à medida que o parâmetro  $k_{NaCa}$  é aumentado para reproduzir a mutação  $NCX$ .

Tabela 4.1: Variação da amplitude dos PDAs e da duração do PA - DPA

$k_{NaCa}$	Pico do PDA	Geração do PAE ?	DPA
$\times 1$ ( <i>controle</i> )	$\approx -75$ mV	não	$\approx 100$ ms
$\times 1,5$	$\approx -70$ mV	não	$\approx 105$ ms
$\times 2,0$	$\approx -64$ mV	não	$\approx 110$ ms
$\times 2,5$	$\approx 38$ mV	sim	$\approx 115$ ms

### 4.1.3 Simulando LEC estocasticamente

A seguir podemos observar os detalhes da simulação de LEC mais os efeitos da mutação  $NCX$  sob os efeitos da estimulação  $\beta_1$  - AR. Para simular LEC de forma estocástica o modelo de Bondarenko (2014) foi implementado de acordo com os cálculos dos pseudocódigos 2 e 3 que podem ser vistos na seção anterior. A simulação da mutação  $NCX$  foi feita da mesma forma anterior, aumentando o parâmetro  $k_{NaCa}$  em até 2,5 vezes. Na Figura a seguir pode-se acompanhar os detalhes:

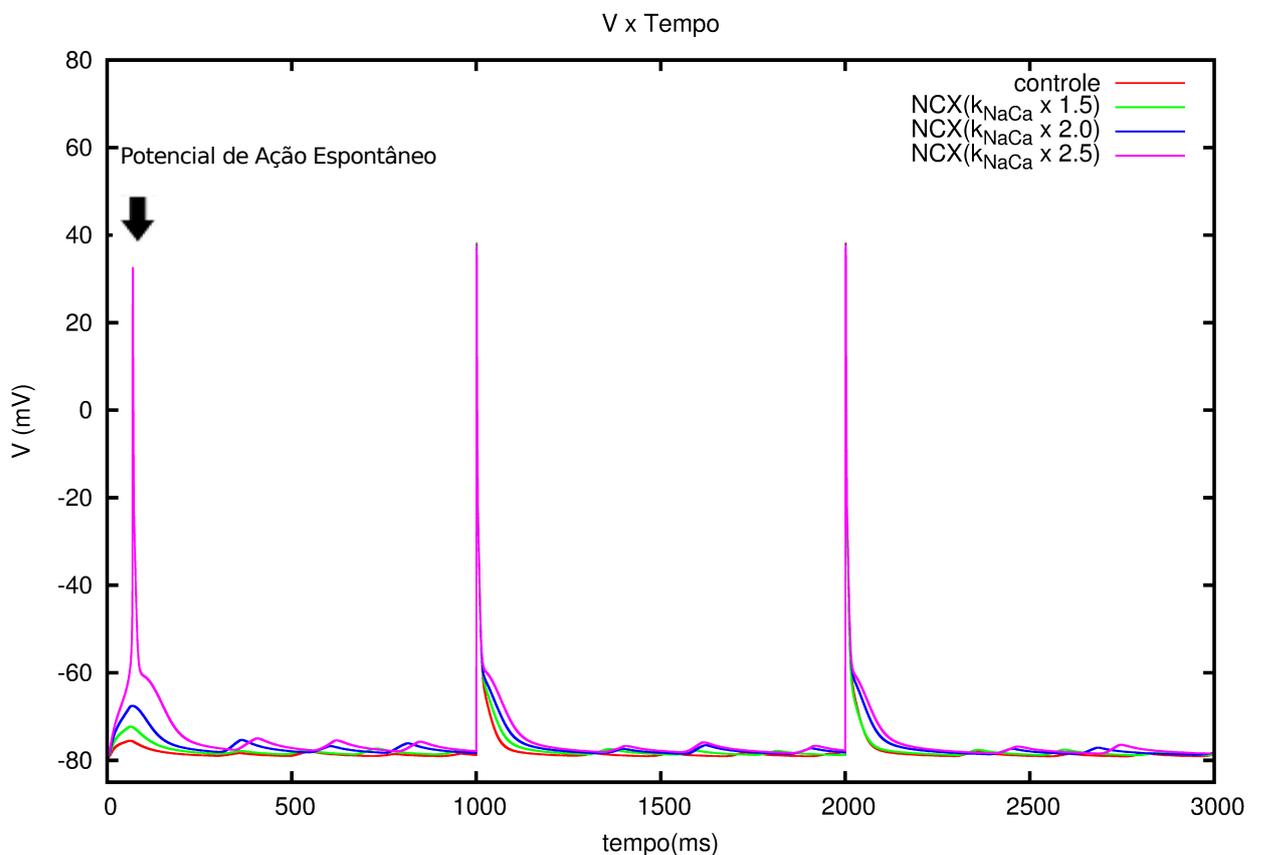


Figura 4.7: estímulo  $\beta_1$  - AR + Simulação da mutação  $NCX$ , através do aumento gradativo da expressão da bomba  $NCX$ . Em  $t \approx 10ms$  foi observada a formação de PDAs e além disso um PAE é observado quando  $k_{NaCa} = 2,5$ .

A seguir podemos visualizar o resultado do transiente de  $Ca^{2+}$ .

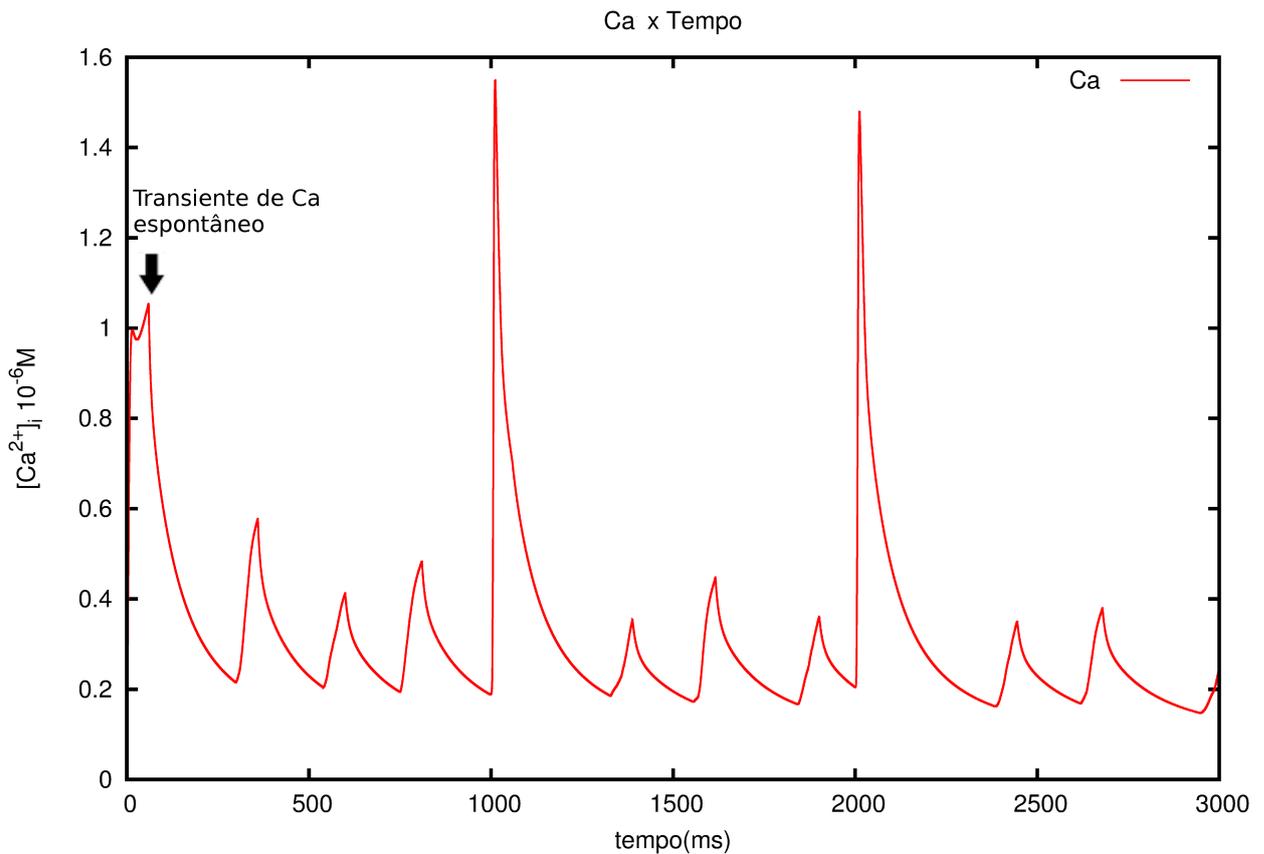


Figura 4.8: estímulo  $\beta_1$  - AR + Simulação da mutação  $NCX$ . Em  $t \approx 10ms$  foi observado um transiente espontâneo de  $Ca^{2+}$ .

O modelo estocástico para LEC reproduz os efeitos correspondentes, como a formação do transiente de  $Ca^{2+}$  espontâneo - TCE. Observou-se que os efeitos de TCEs são reproduzidos com sucesso, inclusive quando combinados com a mutação  $NCX$ . O pico do PDA aumenta à medida que se aumenta o parâmetro  $k_{NaCa}$ , inclusive observa-se a formação do PAE quando  $k_{NaCa}$  é aumentada em 2,5 vezes. Um outro efeito que pode-se observar na Figura (4.7) é o prolongamento do PA, de acordo com o aumento da expressão  $NCX$ . O modelo reproduziu com sucesso os efeitos da LEC. A corrente  $I_{stim}$  foi iniciada após  $t > 1000ms$  para a melhor observação dos efeitos de TCEs.

## 4.2 Trabalhos Futuros

Como já foi apresentado em seções anteriores, para simular a LEC estocasticamente a célula foi particionada em 150 sarcômeros. A ocorrência de TCEs está condicionada

à ativação dos sarcômeros de forma estocástica. A ativação corresponde ao instante em que LEC ocorre e depende da taxa calculada pela Equação (3.26).  $J_{liberacao_2}$  é calculado de acordo com a ativação e inativação dos sarcômeros. Como as taxas de ativação dos sarcômeros dependem da concentração de  $Ca^{2+}$  no RS, e agora existem dois fluxos que liberam o  $Ca^{2+}$  do retículo, a concentração de  $Ca^{2+}$  no RS reduz muito após  $t > 1000ms$ , fazendo a probabilidade da ativação de todos os 150 sarcômeros reduzir. A probabilidade de ativação de todos os sarcômeros concentra-se no início da simulação quando  $t \leq 1000ms$ , o que justifica o teste realizado com a corrente  $I_{stim}$  a partir de  $t > 1000ms$  para possibilitar a observação dos efeitos da LEC. Os parâmetros do modelo ainda não estão devidamente ajustados, há muitas oscilações de  $Ca^{2+}$  e a frequência dos eventos de TCEs observados deveria ser de 5% em miócitos de camundongos normais sob o estímulo  $\beta_1$  - AR (de acordo com Brunello *et al.* (2013)). Esta frequência de 5% ainda não foi observada em nossos modelos e depende de ajustes finos do modelo estocástico.

De acordo com o último resultado Figuras (4.7) e (4.8), vê-se a necessidade de ajustar melhor os parâmetros do modelo afim de reproduzir os dados experimentais de Brunello *et al.* (2013). Desta forma, este ajuste fica como sugestão de trabalhos futuros.

Existem canais iônicos sensíveis ao alongamento do miócito, processo conhecido como SAC do inglês *Stretch activated channels* W. Sigurdson (1992). Este processo ocorre quando um cardiomiócito é estimulado, gerando um PA e esticando o cardiomiócito vizinho. Como resposta a este alongamento o cardiomiócito que foi esticado abre seus canais iônicos e rapidamente se contrai, até mesmo como uma forma de proteção da célula. Em maiores proporções, se o SAC ocorrer em um conjunto de cardiomiócitos de uma determinada região, um novo estímulo pode ser gerado, ocasionando a propagação desordenada do PA. O motivo de uma célula ser estimulada no período de diástole pode ser devido a LEC, portanto fica como sugestão de trabalho futuro o desenvolvimento de modelos eletromecânicos para o tecido cardíaco utilizando o modelo desenvolvido Bondarenko (2014) juntamente com as atualizações deste atual trabalho que envolve a geração estocástica de TCEs e PAEs.

## 5 Conclusão

Simular ambos os modelos (Bondarenko *et al.* (2004) e Bondarenko (2014)) permite a conclusão ainda maior a respeito da importância de incluir a modelagem que representa a estimulação  $\beta_1$ -AR. O modelo de Bondarenko *et al.* (2004) não aborda o estímulo  $\beta_1$ -AR e de acordo com os resultados pode-se concluir com toda certeza que ele não reproduz PAEs.

Utilizar o modelo de Bondarenko (2014), que reproduz os efeitos da estimulação  $\beta_1$ -Adrenérgica ( $\beta_1$ -AR), na eletrofisiologia do cardiomiócito isolado, tornou possível o desenvolvimento de um modelo estocástico que reproduz os dados experimentais recentes que descrevem a presença de PAEs em camundongos geneticamente modificados com a mutação *NCX*.

O modelo estocástico desenvolvido no presente trabalho ainda está em fase de ajustes com a finalidade de corresponder ainda mais com os dados experimentais presentes na literatura, mas já pode-se concluir que reproduz com sucesso os efeitos a mutação *NCX*.

As simulações fornecem uma abordagem mecanicista que permite a melhor compreensão das relações entre LEC, TCEs, PDAs, PAEs e as diferentes correntes iônicas. Estas relações são extremamente relevantes para o estudo de arritmias e de como as batidas ectópicas são geradas no coração. Inclusive, existem poucos dados sobre a geração de PAs espontâneos em miócitos ventriculares de camundongos na literatura, o que enfatiza ainda mais a importância deste trabalho.

## Referências Bibliográficas

- AIRES, M. d. M., 2007. Fisiologia. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2003. Essential cell biology. Garland Science.
- Anderson, J. L., 1990. Clinical implications of new studies in the treatment of benign, potentially malignant and malignant ventricular arrhythmias. *The American journal of cardiology* 65 (4), 36–42.
- Bers, D. M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415 (6868), 198–205.
- Bers, D. M., 2008. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23–49.
- Bondarenko, V. E., 2014. A Compartmentalized Mathematical Model of the  $\beta_1$ -Adrenergic Signaling System in Mouse Ventricular Myocytes. *PLOS ONE* 9 (e89113), 01–35.
- Bondarenko, V. E., Szigeti, G. P., Bett, G. C., Kim, S.-J., Rasmusson, R. L., 2004. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287 (3), H1378–H1403.
- Brunello, L., Slabaugh, J. L., Radwański, P. B., Ho, H.-T., Belevych, A. E., Lou, Q., Chen, H., Napolitano, C., Lodola, F., Priori, S. G., *et al.*, 2013. Decreased RyR2 refractoriness determines myocardial synchronization of aberrant  $\text{Ca}^{2+}$  release in a genetic model of arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (25), 10312.

- Campos, F. O., 2008. Modelagem computacional da eletrofisiologia cardíaca: o desenvolvimento de um novo modelo para células de camundongos ea avaliação de novos esquemas numéricos. Dissertação de mestrado, PPGMC/UFJF, Juiz de Fora, JF, Brasil.
- Campos, J. d. O., 2013. Simulações computacionais de escoamento de fluidos e problemas de reação-difusão através do método de Lattice Boltzmann. Monografia.
- Capogrossi, M. C., Kort, A. A., Spurgeon, H. A., Lakatta, E. G., 1986. Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the  $\text{Ca}^{2+}$ -and species-dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle. *The Journal of general physiology* 88 (5), 589–613.
- Caroni, P., Zurini, M., Clark, A., 1982. THE CALCIUM-PUMPING ATPase OF HEART SARCOLEMMMA\*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 402 (1), 402–421.
- Chen, W., Aistrup, G., Wasserstrom, J. A., Shiferaw, Y., 2011. A mathematical model of spontaneous calcium release in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 300 (5), H1794.
- Chen, W., Asfaw, M., Shiferaw, Y., 2012. The statistics of calcium-mediated focal excitations on a one-dimensional cable. *Biophysical journal* 102 (3), 461–471.
- Cheng, H., Lederer, W., Cannell, M. B., 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262 (5134), 740–744.
- Clark, R., Bouchard, R., Giles, W., 1996. Action Potential Duration Modulates Calcium Influx,  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  Exchange, and Intracellular Calcium Release in Rat Ventricular Myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 779 (1), 417–429.
- Cohen, P. T., 2002. Protein phosphatase 1–targeted in many directions. *Journal of Cell Science* 115 (2), 241–256.

- Cohen, S. D., Hindmarsh, A. C., 1996. CVODE, a stiff/nonstiff ODE solver in C. *Computers in physics* 10 (2), 138–143.
- Cooper, G. M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Boston University.
- Daisy, S., 2014. Lucy - ECG Investigation of Heart Disorder. Publicação Eletrônica - <http://vet-healthcentre.co.uk/services/animals/dogs/recent-cases/lucy-ecg-investigation-of-heart.html>. Último acesso em 01 de agosto de 2014.
- Davini, R., Ribeiro, L., Prado, J., Martins, L., Golfetti, R., Gallo Junior, L., 2004. Frequencia Cardíaca de Repouso e modulação Parassimpática Cardíaca em Atletas Idosos e Idosos Fisicamente Ativos. *Rev. Ciênc. Med. Campinas* 13 (4), 307–15.
- de Barros, B. G., 2013. Simulações computacionais de arritmias cardíacas em ambientes de computação de alto desempenho do tipo Multi-GPU. Dissertação de mestrado, Juiz de Fora, JF, Brasil.
- Despa, S., Bossuyt, J., Han, F., Ginsburg, K. S., Jia, L.-G., Kutchai, H., Tucker, A. L., Bers, D. M., 2005. Phospholemman-phosphorylation mediates the  $\beta$ -adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circulation research* 97 (3), 252–259.
- Dodge-Kafka, K. L., Langeberg, L., Scott, J. D., 2006. Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart The Role of A-Kinase Anchoring Proteins. *Circulation research* 98 (8), 993–1001.
- Endo, M., Tanaka, M., Ogawa, Y., 1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228, 34–36.
- Faber, G. M., Rudy, Y., 2007. Calsequestrin mutation and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: a simulation study of cellular mechanism. *Cardiovascular research* 75 (1), 79–88.
- Fabiato, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 245 (1), C1–C14.

- Fawcett, D. W., McNutt, N. S., 1969. The ultrastructure of the cat myocardium I. Ventricular papillary muscle. *The Journal of cell biology* 42 (1), 1–45.
- Ferrier, G. R., SOUNDERS, J. H., Mendez, C., 1973. A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetylcholinesterase inhibitors. *Circulation research* 32 (5), 600–609.
- Foss, M. L., Keteyian, S. J., Taranto, G., 2000. *Fox: bases fisiológicas do exercício e do esporte*. Guanabara Koogan.
- Guo, W., Campbell, K. P., 1995. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 270 (16), 9027–9030.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2002. *Fundamentos de Guyton: tratado de fisiologia médica*. Guanabara koogan.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117 (4), 500.
- Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M. H., Terracciano, C. M., 2011. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1719), 2714–2723.
- Jones, L. R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A. O., Kelley, J., 1995. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 270 (51), 30787–30796.
- Kargacin, G. J., 1994. Calcium signaling in restricted diffusion spaces. *Biophysical journal* 67 (1), 262–272.
- Keener, J. P., Sneyd, J., 1998. *Mathematical physiology*. Vol. 8. Springer.

- Keizer, J., Levine, L., 1996. Ryanodine receptor adaptation and  $\text{Ca}^{2+}$  (-) induced  $\text{Ca}^{2+}$  release-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biophysical journal* 71 (6), 3477–3487.
- Kjekshus, J., 1990. Arrhythmias and mortality in congestive heart failure. *The American journal of cardiology* 65 (19), 42–48.
- Knollmann, B. C., 2009. New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. *The Journal of physiology* 587 (13), 3081–3087.
- Kobayashi, T., Solaro, R. J., 2005. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 39–67.
- Kochetkov, K., Kazachenko, V., Aslanidi, O., Chemeris, N., Gapeyev, A., 1999. Non-Markovian gating of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in cultured kidney cells *vero*. Rescaled range analysis. *Journal of biological physics* 25 (2-3), 211–222.
- Larbig, R., Torres, N., Bridge, J. H., Goldhaber, J. I., Philipson, K. D., 2010. Activation of reverse  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange by the  $\text{Na}^{+}$  current augments the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  transient: evidence from NCX knockout mice. *The Journal of physiology* 588 (17), 3267–3276.
- Larry, H. B., 2014. Heart, Vascular Smooth Muscle, Excitation-Contraction Coupling (E-CC), Cytoskeleton, Cellular Dynamics and  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling. *Publicação Eletrônica* - <http://pharmaceuticalintelligence.com/tag/cardiovascular/>. Último acesso em 25 de julho de 2014.
- Leskova, G., Kryzhanovsky, G., 2011. Changes in phospholipid composition of cardiomyocyte plasma membranes during hemorrhagic shock. *Bulletin of experimental biology and medicine* 151 (3), 284–287.
- Lines, G. T., Sande, J. B., Louch, W. E., Mørk, H. K., Grøttum, P., Sejersted, O. M., 2006. Contribution of the  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger to Rapid  $\text{Ca}^{2+}$  Release in Cardiomyocytes. *Biophysical journal* 91 (3), 779–792.
- Lüss, H., Klein-Wiele, O., Peter, B., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Müller, F. U., Scheld, H. H., Schmid, C., Schmitz, W., *et al.*, 2000. Regional expression of protein

- phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32 (12), 2349–2359.
- MacLennan, D. H., Kranias, E. G., 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews Molecular cell biology* 4 (7), 566–577.
- Mahajan, A., Shiferaw, Y., Sato, D., Baher, A., Olcese, R., Xie, L.-H., Yang, M.-J., Chen, P.-S., Restrepo, J. G., Karma, A., *et al.*, 2008. A rabbit ventricular action potential model replicating cardiac dynamics at rapid heart rates. *Biophysical journal* 94 (2), 392–410.
- Mansuy, I. M., Shenolikar, S., 2006. Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends in neurosciences* 29 (12), 679–686.
- Marchand, A., Abi-Gerges, A., Saliba, Y., Merlet, E., Lompré, A.-M., 2012. Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: from physiology to pathology. In: *Calcium Signaling*. Springer, pp. 795–810.
- MCARDLE, W. D., KATCH, F. I., KATCH, V. L., 1998. *Fisiologia do exercício: Energia. Nutrição e Desempenho Humano* 5.
- Mechmann, S., Pott, L., 1986. Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes.
- Mullins, L., 1979. The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 236 (3), C103–C110.
- Neher, E., Sakmann, B., 1995. *Single-channel recording*. Plenum Press.
- Neumann, J., Gupta, R. C., Schmitz, W., Scholz, H., Nairn, A. C., Watanabe, A. M., 1991. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circulation research* 69 (6), 1450–1457.
- Orchard, C., Eisner, D., Allen, D., 1983. Oscillations of intracellular  $Ca^{2+}$  in mammalian cardiac muscle.

- Palmer, C. J., Scott, B., Jones, L., 1991. Purification and complete sequence determination of the major plasma membrane substrate for cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in myocardium. *Journal of Biological Chemistry* 266 (17), 11126–11130.
- Periasamy, M., Bhupathy, P., Babu, G. J., 2008. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular research* 77 (2), 265–273.
- Pott, C., Muszynski, A., Ruhe, M., Bögeholz, N., Schulte, J. S., Milberg, P., Mönnig, G., Fabritz, L., Goldhaber, J. I., Breithardt, G., *et al.*, 2012. Proarrhythmia in a non-failing murine model of cardiac-specific Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger overexpression: whole heart and cellular mechanisms. *Basic research in cardiology* 107 (2), 1–13.
- Powers, S. K., Howley, E. T., Ikeda, M., Navarro, F., Bacurau, R. F. P., 2000. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.*
- Rapundalo, S. T., 1998. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovascular research* 38 (3), 559–588.
- Rothberg, B. S., Magleby, K. L., 1999. Gating Kinetics of Single Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in High Ca<sup>2+</sup> Suggest a Two-Tiered Allosteric Gating Mechanism. *The Journal of general physiology* 114 (1), 93–124.
- Sachse, F. B., 2004. *Computational Cardiology. Lecture Notes in Computer Science* 2966.
- Satoh, H., Mukai, M., Urushida, T., Katoh, H., Terada, H., Hayashi, H., 2003. Importance of Ca<sup>2+</sup> influx by Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange under normal and sodium-loaded conditions in mammalian ventricles. *Molecular and cellular biochemistry* 242 (1-2), 11–17.
- Sham, J., Cleemann, L., Morad, M., 1992. Gating of the cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel: the role of Na<sup>+</sup> current and Na (+)-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Science* 255 (5046), 850–853.
- Simmerman, H. K., Jones, L. R., 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* 78 (4), 921–947.

- Sommer, J. R., Waugh, R. A., 1976. The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell—with special emphasis on the tubular membrane systems. A review. *The American journal of pathology* 82 (1), 192.
- Stern, M. D., 1992. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophysical journal* 63 (2), 497–517.
- Stern, M. D., Pizarro, G., Ríos, E., 1997. Local control model of excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *The Journal of general physiology* 110 (4), 415–440.
- W. Sigurdson, A. Ruknudin, F. S., 1992. Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels.
- Wasserstrom, J. A., Shiferaw, Y., Chen, W., Ramakrishna, S., Patel, H., Kelly, J. E., O’Toole, M. J., Pappas, A., Chirayil, N., Bassi, N., *et al.*, 2010. Variability in timing of spontaneous calcium release in the intact rat heart is determined by the time course of sarcoplasmic reticulum calcium load. *Circulation research* 107 (9), 1117–1126.
- Weber, C. R., Piacentino, V., Ginsburg, K. S., Houser, S. R., Bers, D. M., 2002. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current and submembrane [Ca<sup>2+</sup>] during the cardiac action potential. *Circulation research* 90 (2), 182–189.
- Wier, W., Cannell, M., Marban, E., Lederer, W., *et al.*, 1987. Cellular and subcellular heterogeneity of [Ca<sup>2+</sup>] i in single heart cells revealed by fura-2. *Science* 235 (4786), 325–328.