

## Tesis de Posgrado

# Calcio, retículo sarcoplásmico y energética cardíaca

Bonazzola, Patricia

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Bonazzola, Patricia. (1989). Calcio, retículo sarcoplásmico y energética cardíaca. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2274\\_Bonazzola.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2274_Bonazzola.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bonazzola, Patricia. "Calcio, retículo sarcoplásmico y energética cardíaca". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2274\\_Bonazzola.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2274_Bonazzola.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

5  
1  
UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES  
FACULTAD de CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

CALCIO, RETICULO SARCOPLASMICO y ENERGETICA CARDIACA

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Patricia Bonazzola

Director: Prof. Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos

Instituto de Investigaciones Cardiológicas  
Facultad de Medicina - UBA

1989

- 2.274 -  
Ej: 2

A mi madre

A mis tías

A mi hermana

A mis amigos

## AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos, quien me alentó en la realización de este estudio desde mi iniciación en la Investigación Científica brindándome todo su apoyo, dedicación y enseñanza.
- Al Prof. Dr. Alberto C. Taquini, por permitirme realizar este trabajo en el Instituto que dirige y por alentarme durante su ejecución y redacción.
- A mis compañeros del Instituto de Investigaciones Cardiológicas, que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de esta tarea, en especial a la Dra. María T. Márquez y a la Lic. Delia Takara.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me permitió, a través del otorgamiento de becas internas, llevar a cabo este trabajo.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados bajo el título:

"Effects of caffeine on energy output of rabbit heart muscle"

Patricia Bonazzola y Jorge E. Ponce-Hornos

Basic Res Cardiol 82: 428-436, 1987.

## INDICE

### INTRODUCCION

A. CALCIO Y CONTRACTILIDAD CARDIACA .....	1
1. Generalidades .....	1
2. Papel del calcio extracelular y del sarcolema .....	3
a. Canales de calcio .....	7
b. Intercambiador Na <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> .....	10
c. Bomba de calcio del sarcolema .....	13
3. Fuentes intracelulares de calcio .....	14
a. Retículo sarcoplásmico .....	15
b. Mitocondrias .....	17
4. Modelos del proceso de excitación-contracción-relajación.....	20
B. ENERGETICA CARDIACA .....	25
1. Generalidades .....	25
2. Componentes energéticos del músculo cardíaco .....	27
a. Metabolismo basal .....	28
b. Metabolismo activo .....	29
3. Antecedentes históricos de los estudios miotérmicos .....	31
4. Métodos miotérmicos .....	33
a. Método de las diferencias de temperatura arterio-venosa ..	33
b. Método de las termopilas .....	35

c. Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos .....	36
C. OBJETIVO DE LOS EXPERIMENTOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS .....	37

## MATERIALES Y METODOS

A. PREPARACIONES BIOLÓGICAS .....	40
1. Tabique interventricular de conejo .....	40
2. Ventrículo de rata .....	42
3. Ventrículo de sapo .....	44
B. MEDICIONES MIOTÉRMICAS Y MECÁNICAS SIMULTÁNEAS .....	45
C. SOLUCIONES .....	50
D. ESTADÍSTICA .....	53

## RESULTADOS

A. TABIQUE INTERVENTRICULAR DE CONEJO .....	54
1. Parámetros contráctiles .....	55
2. Parámetros energéticos .....	60
B. VENTRÍCULO DE RATA .....	69
1. Parámetros contráctiles .....	70
2. Parámetros energéticos .....	76
C. VENTRÍCULO DE SAPO .....	79

1. Parámetros contráctiles .....	83
2. Parámetros energéticos .....	87
 <u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	
1. Introducción .....	95
2. Comportamiento mecánicos .....	97
3. Evaluaciones miotérmicas .....	101
 CONCLUSIONES .....	 111
 <u>RESUMEN</u> .....	 114
 <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	 117

INTRODUCCION

## A. CALCIO Y CONTRACTILIDAD CARDIACA

### 1. Generalidades

Está bien probado que el calcio libre citosólico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) está involucrado en un sinnúmero de fenómenos a nivel celular, ya sea como regulador fisiológico o como gatillo o desencadenante de funciones celulares. El incremento en su concentración citosólica promueve una serie de actividades celulares que incluyen secreción, mitosis, transmisión del impulso nervioso, transporte a nivel de membrana, reacciones de fosforilación, activación o inhibición de sistemas enzimáticos y, en tejidos musculares activación de la contracción (Rasmussen y Barret, 1984).

Es de hacer notar, que el gradiente iónico para calcio (Ca) es cuantitativamente el más importante en los seres vivos. En efecto, como la concentración de Ca en el medio extracelular está en el orden milimolar, la relación entre las concentraciones extra e intracelulares para este ión excede  $10^4$ . En el músculo cardíaco, el elevado gradiente electroquímico para calcio existente, está parcialmente garantizado por la baja permeabilidad de la membrana a este ión en condiciones de reposo. Además, el nivel de Ca citosólico en estas condiciones, extremadamente bajo, es mantenido por sistemas de transporte que directamente o por su asociación con otros sistemas de transporte, utilizan energía química y que están ubicados tanto en la membrana celular o sarcolema (bomba de Ca asociada a sarcolema e intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ ) como a retículo sarcoplásmico (bomba de Ca asociada a este sistema membranoso) o en la mitocondria (Reuter y Seitz, 1968; Caroni y Carafoli, 1980; Tada e Inui, 1983; Scholz, 1984). Durante el evento contráctil, el músculo cardíaco está sometido

do a rápidos cambios en la concentración intracelular de Ca, la cual oscila entre el nivel basal correspondiente al estado de reposo mecánico ( $< 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) hasta aproximadamente  $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  en el pico de activación, en períodos de 50 a 1000 ms dependiendo de la especie y de la temperatura. Por lo tanto, el músculo cardíaco posee mecanismos capaces de regular cíclicamente en forma rápida y precisa los niveles de calcio citoplasmático y así efectuar su función contráctil.

A diferencia del músculo esquelético de mamífero en el que la graduación de la contracción se logra o bien mediante el reclutamiento de fibras motoras (músculo esquelético de tipo rápido) o por variaciones en la despolarización de la membrana celular (músculo esquelético de características tónicas), en el músculo cardíaco toda la masa muscular se contrae en cada latido y la fuerza generada puede variar marcadamente sin que existan alteraciones manifiestas en el potencial de acción. Esta respuesta característica del tipo todo o nada implica que la regulación de la contracción cardíaca debe ser una propiedad de las células miocárdicas y que existiría una modulación de la contracción a nivel de cada una de ellas. Una de las formas por las que el músculo cardíaco es capaz de regular la fuerza generada es a través de la clásica respuesta de Frank-Starling en la cual, las variaciones de la longitud de las fibras en reposo modifican la interacción entre miofilamentos de actina y miosina. Otra forma por la cual el músculo cardíaco puede regular su fuerza contráctil está relacionada con modificaciones en los mecanismos que controlan la oferta de calcio a los miofilamentos (Langer, 1980). En efecto, existen una serie de compartimientos celulares (complejo glicocálix-sarcolema, retículo sarcoplásmico, mitocondrias) con capacidad de acumular calcio en cantidad suficiente como para modificar la oferta de este catión al medio intra-

celular.

## 2. Papel del calcio extracelular y del sarcolema

El músculo cardíaco cesa casi inmediatamente de responder frente a un estímulo cuando se priva de calcio el medio de perfusión. Esto denota la crítica dependencia existente en músculo cardíaco entre la actividad contráctil y la presencia de calcio en el medio extracelular (Ringer, 1883; Philipson y Langer, 1979) lo que lo diferencia del músculo esquelético el cual es capaz de contraerse aún en medios libres de calcio por espacio de horas a temperatura ambiente (Armstrong, Bezanilla y Horowicz, 1972).

No caben dudas que el medio extracelular es un compartimiento que contiene suficiente Ca para activar el aparato contráctil, sin embargo la fuente de Ca responsable del mantenimiento de la contracción cardíaca continúa siendo un problema no resuelto. En efecto, si bien la fuerza generada disminuye rápidamente con la reducción de la concentración de Ca en el medio extracelular (Shine, Serena y Langer, 1971) o por la exposición del músculo a inhibidores de la entrada de Ca desde este medio (Mn, verapamil, nifedipina etc.), se ha encontrado que el Ca que ingresa a la célula desde el medio extracelular sería, al menos en algunas especies, insuficiente para la generación de fuerza. Además, la mayor parte de los estudios electrofisiológicos que estiman la entrada de Ca por la denominada corriente lenta, han generado valores que sólo pueden explicar entre el 10 y 20% del Ca requerido para una activación máxima (Solaro, Wise, Shiner y Briggs, 1974; Fozzard y Beeler, 1975; Chapman, 1979). Del mismo modo, las estimaciones de la entrada de Ca por latido, obtenidas por mediciones de flujos radioisotópicos, también representan aproximadamente el

10% del Ca requerido para la completa activación de los miofilamentos (Chapman, 1979; Bers, 1983). Si bien más recientemente las estimaciones del influjo de Ca se han incrementado hasta los niveles requeridos para la mitad de la activación máxima de los miofilamentos, éstas aún no pueden considerarse como definitivas. De hecho, es de destacar que las estimaciones del influjo de Ca obtenidas por mediciones radioisotópicas, por el método de patch-clamp o por ambos difieren en un orden de magnitud (Bers, 1985).

Cuando se encara el análisis del origen del calcio responsable de la contracción cardíaca, es interesante examinar la respuesta del músculo cardíaco frente a la perfusión con soluciones libres de calcio. En estas condiciones, se ha observado en ventrículo de conejo que la fuerza contráctil declina con un tiempo medio de aproximadamente 0,8 minutos lo que indicaría que la tensión cae tanto como lo hace la concentración de calcio en el espacio intersticial o en regiones celulares que se hallan en rápido equilibrio con el mismo (Shine, Serena y Langer, 1971). Por otra parte, cuando el calcio es reintroducido en el medio de perfusión, la fuerza generada asciende hasta el nivel control con un tiempo medio de aproximadamente 0,2 minutos. Este tiempo medio es muy similar al obtenido para el intercambio de sustancias dentro del espacio vascular (Philipson y Langer, 1979). La explicación para esta asimetría observada para el descenso versus el ascenso de la fuerza contráctil cuando se remueve o readmite al calcio en el medio de perfusión, sería que un componente de calcio importante en la contracción cardíaca estaría unido a algún sitio superficial con afinidad para calcio tal que su readmisión (asociación del ión a estos sitios de unión) se efectuaría en forma más rápida que el lavado del mismo (disociación del calcio de los sitios de unión superficiales). Más recientemente (Rich, Langer y Klassen, 1988) se ha encontrado, en

células aisladas de ventrículo de conejo, que si se asegura un lavado de todo el medio extracelular en pocas décimas de segundo estas células pierden por completo su habilidad para contraerse la que se recupera inmediatamente (tiempo medio 1 s) con la reposición del Ca extracelular. Estudios realizados en vesículas de sarcolema y en tejido muscular cardíaco frente a concentraciones de calcio extracelular que variaron en un amplio rango (0,05 a 9,0 mM), demostraron que el calcio unido al sarcolema estaba en estrecha relación con la fuerza activa generada por las preparaciones musculares. Esto se puso en evidencia en el hecho que el gráfico que relacionaba el Ca unido a sarcolema vs. concentración de calcio extracelular y aquél que relacionaba la máxima velocidad de contracción vs. concentración de calcio extracelular eran totalmente superponibles (Bers, Philipson y Langer, 1981). Mayor soporte para la participación del Ca extracelular y específicamente la fracción de Ca unida al sarcolema, se derivó de estudios en los que se comparó la habilidad de varios cationes ( $Y^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) de desplazar Ca del mismo con su habilidad de desacoplar la excitación de la contracción. La secuencia de selectividades encontradas tanto para cationes divalentes como trivalentes fue la misma que la secuencia relativa de desacoplamiento de la tensión contráctil (Langer, Serena y Nudd, 1974; Bers y Langer, 1979). La potencia de un determinado ión como desacoplante y como agente desplazante del Ca unido a sarcolema, dependía no sólo de su carga (los trivalentes fueron en general más potentes que los divalentes) sino, más distintivamente, de su radio iónico. Es decir, aquellos con radios iónicos similares al radio iónico del Ca ( $0,99 \text{ \AA}$ ), mostraron más habilidad desacoplante y capacidad de desplazamiento del Ca unido al sarcolema.

En resumen, parecería que el espacio intersticial es la fuente primaria

de calcio para el acople de la despolarización con la contracción, y existirían sitios de unión y almacenamiento del mismo en, o cerca de, la superficie celular, desde los cuales éste sería liberado. Estos sitios parecerían lo calizados en el complejo glicocálix-sarcolema en el cual existen mucopolisacáridos y fosfolípidos cuyas cargas negativas serían capaces de fijar cationes, entre ellos el  $\text{Ca}^{2+}$ . Este complejo sería un importante lugar de almacenamiento superficial de Ca (Langer, 1984). Es de hacer notar que este lugar de almacenamiento contiene, en concentraciones de Ca fisiológicas, una cantidad de Ca unido de aproximadamente  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tejido húmedo (Bers y Langer, 1979). Esta cantidad representa el 20% del contenido total de calcio tisular y es alrededor de diez veces la cantidad de calcio requerida para ge nerar el 50% de la fuerza máxima en ventrículo de mamífero (Pierce, Philipson y Langer, 1985).

Debe destacarse que si el Ca que entra a la célula miocárdica a través de sarcolema estuviera destinado a activar a las proteínas contráctiles, el flujo transmembrana resultante sería de una magnitud tal que, de no mediar compensación por otros movimientos iónicos, generaría corrientes o cambios de po tencial de membrana elevados, y éstos no han sido detectados (Chapman, 1983). Por otra parte, si el Ca ingresara al sarcoplasma en cantidad suficiente para activar la contracción, habría dos consecuencias importantes a considerar: Primero, debería producirse una gran elevación en la concentración de Ca libre en el sarcoplasma en regiones próximas al sarcolema, lo que debería ser detectado mediante el uso de aequorina (proteína fotoluminiscente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ); Segundo, el tiempo necesario para que el  $\text{Ca}^{2+}$  se equilibre en el interior de la célula debería ser mayor cuanto mayor sea el diámetro celular. Tanto las señales obtenidas con aequorina como los tiempos de difusión

calculados para distintos tipos celulares, sugieren que el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular, aunque indispensable, no sería necesariamente la única fuente de Ca activador de la contracción en la célula cardíaca (Allen y Blinks, 1978; Wier, 1980; Chapman, 1983).

Necesariamente, la dependencia del proceso contráctil de la presencia de calcio en el medio extracelular implica la existencia de mecanismos que se hallen involucrados en los movimientos de calcio transarcolemales. Hasta el momento, se han descrito tres de estos mecanismos: a. los canales de calcio, b. el intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  asociado al sarcolema y c. la bomba de calcio del sarcolema.

#### a. Canales de calcio.

Este es uno de los procesos que introducen Ca al citosol durante el potencial de acción cardíaco. La dependencia iónica de la porción positiva del potencial de acción y estudios realizados a potenciales de membrana eléctricamente prefijados (voltage-clamp) permitieron reconocer la existencia de una corriente de entrada adicional a la corriente rápida de sodio (responsable esta última de la espiga o fase cero del potencial de acción). Esta corriente secundaria, que es conducida a través de los llamados canales lentos, es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , posee una cinética más lenta y una dependencia del potencial de membrana que la diferencian de la corriente rápida de sodio (Reuter, 1979).

Se han descrito distintos tipos de canales a través de los cuales el Ca ingresaría a la célula (Schramm y Towart, 1985). Dentro de estos, el llamado "canal operado por receptores" ha sido propuesto para explicar el hecho de

que, en células musculares lisas, muchos neurotransmisores activan la entrada de Ca en ausencia de cambios en el potencial de membrana (Bolton, 1979; Towart, 1981). La existencia de este tipo de canal no ha sido descrito en células cardíacas.

El llamado "canal voltaje-dependiente", por otra parte, ha sido muy estudiado y su existencia es indiscutida. Se encuentra ampliamente distribuido no sólo en el corazón sino también en diferentes tejidos corporales y en todo el reino animal. Este canal, a diferencia del canal rápido de sodio, no es bloqueado por tetrodotoxina pero es sensible a cationes divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) y a los antagonistas cálcicos orgánicos como verapamil, nifedipina y otras dihidropiridinas. El movimiento pasivo transmembrana de Ca a través del canal depende de la diferencia neta del potencial electroquímico para Ca y de la conductancia del mismo. Las cinéticas de apertura y oclusión del canal son el resultado de los cambios en el potencial de membrana que se producen durante el potencial de acción. Evidencias experimentales sugieren la posible existencia de un sensor de voltaje en la membrana. Este sensor podría ser un grupo proteico con propiedades de dipolo que formaría una parte integral del canal iónico y cuyo comportamiento sería sensible al campo eléctrico. Cualquier cambio en el potencial de membrana causaría reorientación del sensor cargado dentro del campo y en consecuencia un cambio en el flujo de iones a través del canal (Reuter, 1983). La corriente lenta comienza cuando el potencial de membrana alcanza los  $-40$  mV y tiene su máximo a  $0$  mV (Schramm y Towart, 1985). La inactivación de los canales se produce por lo menos por dos mecanismos: la inactivación dependiente del voltaje de la membrana y, al menos en algunos tejidos, mediante un proceso de inactivación por Ca que guarda relación directa con el flujo de Ca a través del canal, de tal modo que a mayor flujo más rápi

da sería la inactivación (Hagiwara y Byerly, 1981; Aschcroft y Stanfield, 1982). Sin embargo, este último mecanismo de inactivación no se ha establecido inequívocamente en músculo cardíaco (Reuter, 1983; Kokubun e Irisawa, 1984). Las mediciones de la corriente de un canal de calcio aislado, utilizando técnicas de patch-clamp, han demostrado que la apertura del mismo está distribuida estadísticamente con una duración de aproximadamente 1 ms, e interrumpida por períodos de cierre variables que oscilan entre menos de 1 ms y 100 ms de duración (Cavalie, Ochi, Pelzer y Trautwein, 1983). Finalmente, evidencias experimentales recientes, utilizando técnicas de patch-clamp para células enteras, sugieren que la corriente de entrada de Ca sería acarreada por este ión a través de dos tipos de canales voltaje-dependientes: los llamados canales de Ca de tipo L y los canales de Ca de tipo T (Mittra y Morad, 1986; Hagiwara, Irisawa y Kameyama, 1988). Estos dos tipos de canales poseen características diferenciales que han permitido su separación y parcial caracterización. Entre ellas cabe mencionar los diferentes rangos de potencial de membrana requeridos tanto para la apertura como para la inactivación de los mismos, y la distinta sensibilidad frente a antagonistas (verapamil, flunarizina) y agonistas (BAY K8644) cálcicos (Tytgat, Vereecke y Carmeliet, 1988; Van Skiver, Spires y Cohen, 1988).

Fisiológicamente, la función de los canales lentos es modulada por neurotransmisores. Las catecolaminas aumentan la corriente de Ca sin modificar la conductancia del canal. La probabilidad de que un canal esté en estado abierto aumenta a través de un incremento en los tiempos de apertura y/o por acortamiento en los períodos de cierre. Hasta el momento no está claro si éste incremento en la corriente de Ca es debida a un incremento en el número total de canales disponibles funcionalmente o a un aumento en la probabilidad de a-

apertura de los canales existentes durante la despolarización. Los mismos efectos se observan después de la inyección intracelular de AMPc o de la subunidad catalítica de las proteíno-quinásas dependientes de AMPc, lo cual indica que en la transición del estado inactivo al activo está involucrado un proceso de fosforilación (Schramm y Towart, 1985).

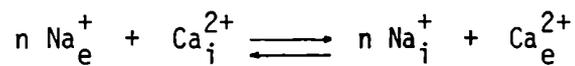
b. Intercambiador NaxCa.

La existencia de un sistema de intercambio de NaxCa ha sido establecida en muchos tejidos incluyendo el tejido cardíaco intacto (Reuter y Seitz, 1968; Horackova y Vassort, 1979) y vesículas de sarcolemma cardíaco (Reeves y Sutko, 1979; Philipson y Nishimoto, 1982). Recientemente, mediante el uso de técnicas de aislamiento y purificación a partir de vesículas de sarcolemma cardíaco y aplicación de anticuerpos monoclonales se ha propuesto que la unidad básica del sistema de intercambio NaxCa sería una proteína monomérica de aproximadamente 33 kDa de masa molar y que el intercambiador funcionalmente activo sería un tetrámero en el cual cuatro subunidades de 33 kDa estarían asociadas por uniones disulfuro (Pierce, Ward y Philipson, 1986; Letarte, Quackenbush, Baumal y Michalak, 1986; Longoni y Carafoli, 1987).

Estudios realizados tanto en vesículas sarcolemales como en células ventriculares, han demostrado la característica electrogénica de este sistema de intercambio, es decir, su operación genera transporte desigual de cargas a través de la membrana y como consecuencia diferencias de potencial transmembrana que producen corrientes de intercambio (Reeves y Hale, 1984; Hume, 1987; Barcena-Ruiz, Bauckelmann y Wier, 1987). En lo referente a la estequiometría del sistema, hasta el momento, los estudios realizados mediante el uso de téc

nicas de flujos radioisotópicos, análisis de curvas de activación y el uso de microelectrodos sensibles a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , permiten establecer que se intercambian más de dos  $\text{Na}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$  contratransportado (Philipson y Nishimoto, 1981; Bers y Ellis, 1982; Bridge y Bassingthwaite, 1983). La estequiometría más probable parecería ser de tres  $\text{Na}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$  contratransportado (Pitts, 1979; Reeves y Hale, 1984; Kimura, Miyamae y Noma, 1987).

La dirección del movimiento neto de calcio a través del intercambiador  $\text{Na}_x\text{Ca}$  está energéticamente determinado. Dependiendo del gradiente electroquímico para ambos iones y del potencial de membrana, el sistema puede, en principio, participar tanto en la entrada como en la remoción de calcio citosólico. Así, para la reacción de intercambio se puede pues plantear:



Donde:  $n$  = relación de acoplamiento para el intercambio

$i$  y  $e$  = compartimientos intra y extracelular respectivamente

El sistema de intercambio  $\text{Na}_x\text{Ca}$  producirá la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol acoplada con la entrada de  $\text{Na}^+$  siempre que se cumpla:

$$\frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{(\text{Na}^+)_i^n}{(\text{Na}^+)_e^n} \cdot \frac{(\text{Ca}^{2+})_e}{(\text{Ca}^{2+})_i} + E_m \cdot (n-2) < 0 \quad (1)$$

Donde:  $R$  = constante universal de los gases

$T$  = temperatura absoluta

$F$  = constante de Faraday

$E_m$  = potencial de membrana

$(\text{Na}^+)_i$  y  $(\text{Na}^+)_e$  = actividades intra y extracelulares de sodio respec-

tivamente

$(Ca^{2+})_i$  y  $(Ca^{2+})_e$  = actividades intra y extracelulares de calcio respectivamente.

En el músculo ventricular de mamífero en reposo, en el que  $E_m$  es de alrededor de -80 mV, las concentraciones extracelulares fisiológicas de Na y Ca son de 140 y 1,5 mM respectivamente y las concentraciones intracelulares de Na y Ca libre medidas tienen valores de 5-11 mM y 0,1-0,5  $\mu$ M respectivamente (Bers y Ellis, 1982; Chapman, 1986; Desilets y Baumgarten, 1986; duBell y Houser, 1987), se puede calcular la dirección en la que el intercambio procede asumiendo la estequiometría 3 Na<sup>+</sup>:1 Ca<sup>2+</sup> para el intercambio. Tomando valores promedio para las concentraciones intracelulares de Na y Ca de 8 mM y 0,3  $\mu$ M respectivamente, a 37 °C, el valor obtenido para la expresión (1) es de -82 mV, es decir que en condiciones de reposo, el sistema de intercambio de NaCa procede en la dirección de la extrusión de Ca desde el citosol utilizando el gradiente electroquímico transmembrana de Na.

Durante el proceso contráctil, la generación de un potencial de acción hace que el potencial de membrana cambie abruptamente desde su valor de reposo hasta alrededor de +10 mV en un tiempo de 2 ms o menos. A este cambio está asociada la entrada de Na a través de los llamados canales rápidos. El cambio en la concentración intracelular de Ca es posterior a estos eventos (Mullins, 1979). Entonces, aún sin tener en cuenta el cambio en la concentración intracelular de Na en las cercanías de la membrana, tal cambio en el potencial de membrana alcanzaría para revertir la relación dada por la ecuación (1), de tal forma que el intercambiador actuaría en este caso favoreciendo el influjo de Ca desde el espacio extracelular. Ahora bien, cuando la concentración de Ca

intracelular se eleva ya sea por la entrada de Ca desde el espacio extracelular o por liberación de Ca por el sistema retículo sarcoplásmico (RS), hasta concentraciones de 1-2  $\mu\text{M}$ , la relación expresada en la ecuación (1) nuevamente se revierte y el sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  funcionaría en el sentido de retirar el Ca del citosol. Esto puede suceder aún durante la fase plateau del potencial de acción (Philipson y Ward, 1986).

Existe numerosa evidencia respecto de la participación del sistema de contratransporte de  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  como uno de los mecanismos que median la salida de Ca de las células cardíacas. Se trataría de un sistema de alta capacidad pero baja afinidad por lo que estaría adaptado para remover Ca en condiciones en donde la concentración citosólica del mismo se eleva (en el pico de la activación). Por otra parte, su participación como sistema que media la entrada de Ca desde el espacio extracelular, aunque energéticamente posible, no ha sido definitivamente establecida (Carafoli, 1985; Philipson y Ward, 1986) en condiciones fisiológicas, mientras que existe evidencia de su actividad en condiciones de sobrecarga de Na intracelular (Ponce-Hornos y Langer, 1980; Bers y Ellis, 1982).

Fisiológicamente, este sistema sería regulado por otros ligandos distintos del Na y Ca intracelular tales como Mg, Mg-ATP, Pi, K. A este respecto se ha informado que el intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  podría operar en regímenes de alta o baja velocidad dependiendo de las concentraciones intracelulares de estos ligandos (DiPolo y Beaugé, 1984).

### c. Bomba de calcio del sarcolema

Este sistema de transporte activo primario, ha sido identificado en mem-

branas plasmáticas de numerosos tipos celulares entre los que se encuentra el músculo cardíaco (Carafoli, 1984). La enzima ha sido aislada de sarcolema cardíaco, purificada y reconstituida dentro de liposomas, lo que ha permitido su caracterización. Se trata de una proteína de 138 kDa de masa molar y muestra una estequiometría de bombeo de 1 Ca/ATP hidrolizado (Caroni y Carafoli, 1980; Caroni, Zurini, Clark y Carafoli, 1983). Esta ATPasa pertenece al grupo  $E_1-E_2$ , o sea que forma una fosfoenzima durante el ciclo de reacción y es inhibida por bajas concentraciones de vanadato.

Caroni y Carafoli encontraron que el flujo máximo de Ca movilizado por la bomba de Ca en vesículas de sarcolema aisladas de corazón de mamífero, es 1/30 o 1/100 del movilizado por el intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ . La concentración de Ca a la cual la bomba se encuentra a la mitad de su actividad máxima es  $0,3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , mientras que para el intercambiador es  $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Caroni y Carafoli, 1980; Caroni, Reinlib y Carafoli 1980). Aplicar estos hechos a la célula cardíaca intacta implica sugerir que, cuando la bomba de Ca está trabajando a la mitad de su velocidad máxima, es decir, cuando la actividad de Ca intracelular es de  $300 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (concentración promedio medida en reposo), el intercambiador sólo está activado en un 5% (Chapman, 1983). Durante la contracción cardíaca, en cambio, la concentración intracelular de Ca se eleva sustancialmente y es en esta situación en la que un sistema de baja afinidad pero alta capacidad como el de intercambio  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  actuaría en la remoción de Ca citosólico en un grado mayor que la bomba de Ca asociada al sarcolema (Carafoli, 1985).

### 3. Fuentes intracelulares de calcio

En general, en todos los tejidos, la relación entre el calcio iónico intra

celular vs. el calcio total intercambiable es muy baja, hecho que sugiere un importante control de los niveles de calcio en el medio intracelular (Mullins y Requena, 1979; Langer, 1982). Una relación de este tipo parecería existir en el músculo cardíaco donde el Ca total puede llegar a aumentar, en ciertas condiciones, en el orden milimolar mientras que los niveles de Ca libre lo hacen en el orden micromolar. En el músculo esquelético, la parvoalbúmina, el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias funcionan como fuentes intracelulares de Ca. El músculo cardíaco carece de parvoalbúmina (Hamoir, Focart y Disteché, 1966), y los lugares más probable de almacenamiento de Ca intracelulares son el retículo sarcoplásmico y la mitocondria (MIT).

#### a. Retículo sarcoplásmico

Estudios ultraestructurales en músculo cardíaco han revelado la existencia de un RS organizado. En corazón de mamífero, una parte relativamente extensa del RS se acopla a la periferia celular tanto a nivel del túbulo T (cuando existe) como a la superficie de la membrana (Mc Nutt y Fawcett, 1969; Fabiato, 1981a). El músculo cardíaco de anfibio, por otra parte, posee un sistema retículo sarcoplásmico poco desarrollado comparado con los músculos cardíacos de mamífero (Page y Niedergerke, 1972).

Se han desarrollado numerosos estudios con el fin de establecer la capacidad del RS de músculo cardíaco de mamífero para remover el Ca del citoplasma. Los resultados obtenidos a este respecto muestran un amplio margen de variación con una capacidad de captación total que oscila entre 5 y 90 nmol·mg<sup>-1</sup> de proteína y con una velocidad máxima de captación entre 0,3 y 60 nmol·mg<sup>-1</sup> de proteína·s<sup>-1</sup> (Chapman 1983). Estudios realizados en microsomas aisla-

dos de células cardíacas altamente enriquecidos en retículo sarcoplásmico, han mostrado que los mismos son capaces de acumular hasta  $76 \text{ nmoles de Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  de músculo en un segundo, alrededor de la mitad de ellos en los primeros 200 ms (Levitsky, Benevolensky, Levchenko, Smirnov y Chazov, 1981). Esta actividad está en el orden de la necesaria para relajar un latido cardíaco, ya que el nivel de Ca libre y unido en condiciones de activación de la contracción al 90% de la tensión máxima, sería de alrededor de  $35 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo (Solaro, Wise, Shiner y Briggs, 1974).

La captación de Ca por parte de este sistema membranoso es llevada a cabo por una Ca-ATPasa perteneciente al grupo de las  $E_1$ - $E_2$ , cuya estequiometría de bombeo es de 2 Ca/ATP hidrolizado (Tada, Yamamoto y Tonomura, 1978; Carafoli, 1985). La enzima posee alta afinidad ( $K_m = 0,3 \mu\text{M}$ ) y alta velocidad ( $V_{\text{máx}} = 30 \text{ nmoles de Ca} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de proteína} \cdot \text{s}^{-1}$ ) por lo que estaría capacitada para actuar tanto durante el ciclo contracción-relajación como en la homeostasis de Ca durante el reposo mecánico (Carafoli, 1985).

Conjuntamente con su capacidad de captar Ca, el RS está capacitado para liberarlo hacia el citosol. En fibras musculares cardíacas de mamífero a las que por medios mecánicos o químicos se les ha eliminado el sarcolema (células peladas), se encontró que la máxima liberación de Ca desde el RS (inducida por Ca o cafeína) aumenta la tensión contráctil hasta alrededor del 60% de la máxima fuerza alcanzada por aumento en la concentración de Ca libre en el fluido a que fueron expuestas (Fabiato, 1981a). Esto sugiere que el RS en estas preparaciones, contiene menos Ca que la cantidad requerida para saturar a los miofilamentos. Para la liberación de Ca por parte del RS, ya sea inducida por Ca (hipótesis sostenida por Fabiato), por despolarización a nivel de la cisterna terminal del RS (muy probable en músculo esquelético pero impro-

bable en músculo cardíaco) (Fabiato, 1986), o via la ruta del Inositol-1,4,5-trifosfato (Volpe, Salviati, Di Virgilio y Pozzan, 1985; Movsesian, Thomas, Selak y Williamson, 1985), existen evidencias recientes que indican la presencia de canales de Ca activables por Ca que serían los responsables de la liberación del mismo desde esta organela (Rousseau, Smith, Henderson y Meissner, 1987).

En resumen, el RS parecería ser capaz de proveer Ca para la activación de la contracción del músculo cardíaco y también participar en la relajación del latido cardíaco.

#### b. Mitocondrias

Las mitocondrias tienen una considerable potencialidad como sistema secuestrador de Ca (Bygrave, 1978), pero su importancia en la homeostasis del Ca en las células cardíacas está relacionada directamente con la cantidad de Ca que pueden contener in vivo, expuestas a las relativamente elevadas concentraciones de Na y Mg existentes en el citoplasma (Kitazawa, 1976; Chapman, 1979).

Experimentos realizados en mitocondrias cardíacas aisladas demostraron que estas organelas podrían acumular entre 600-900 nmoles de  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, en ausencia de Na y presencia de fosfato en el medio de incubación (Palmer, Tandler y Hoppe, 1986). El corazón posee aproximadamente 100 mg de proteína mitocondrial  $\cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo (Scarpa y Graziotti, 1973), por lo que el límite superior para la capacidad de acumular Ca por las mitocondrias dentro de la célula sería entre 60 y 90  $\mu\text{moles de Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo.

Sin embargo, estudios realizados tanto en tejido cardíaco como en otros tejidos, utilizando microanálisis por difracción de rayos X, han disminuído el contenido de Ca de las mitocondrias a alrededor de 1-2 nmoles de  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial o 0,1-0,2  $\mu\text{moles de Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo (Wendt-Gallitelli y Jacob, 1982; Somlyo, Somlyo, Schumann y Endo, 1982; Wheeler-Clark y Tormey, 1987). Como estas cifras representan la cantidad total de Ca mitocondrial, la fracción libre del mismo, o sea, la fracción disponible para un intercambio rápido con el citosol, sería considerablemente menor. Este hecho es importante porque indicaría que las mitocondrias, dentro de las células normales, no serían capaces de almacenar grandes cantidades de Ca rápidamente intercambiable y, por lo tanto, no podrían contribuir con Ca durante el evento contráctil.

El balance dinámico de Ca entre la mitocondria y el citosol es el resultado de dos mecanismos opuestos: la vía electroforética que se utiliza exclusivamente para la captación del catión y el intercambio Na-dependiente a través del cual el Ca es liberado hacia el citosol.

La fuerza impulsora para la captación de Ca por la mitocondria es la diferencia de potencial en la membrana interna mitocondrial establecida por la respiración. La velocidad de la captación electroforética puede fluctuar dependiendo esencialmente de la concentración de Ca y Mg citosólico (Carafoli, 1985). El Mg inhibe la captación activa de Ca por las mitocondrias aisladas. Este ión, en concentraciones de 5 mM, es capaz de bloquear totalmente la captación de Ca por mitocondrias suspendidas en una solución que contiene  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  de Ca (Sordahl, 1974). Por lo tanto, la velocidad máxima de esta ruta estaría sensiblemente inhibida a las concentraciones fisiológicas de Mg intracelular (1-4 mM), de lo que resulta que en condiciones semejantes a las intracelulares la contribución de este sistema sería de aproximadamente 0,5

nmoles de  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\cdot \text{s}^{-1}$ . Además, este sistema de captación muestra baja afinidad por Ca ( $K_m = 15-30 \mu\text{M}$ ) por lo que para condiciones de concentración de Ca y Mg similares a las existentes in situ, la velocidad de captación oscilaría entre 0,3 y 3 nmoles de  $\text{Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo  $\cdot \text{s}^{-1}$  lo que haría improbable su participación en la regulación del Ca citoplasmático durante el ciclo de excitación-contracción-relajación normal (Crompton, Sigel, Salzmann y Carafoli, 1976; Carafoli, 1985).

Como se mencionara anteriormente el Ca mitocondrial es movilizable por medio de un intercambio Na-dependiente. En mitocondrias cardíacas aisladas se ha demostrado que una gran parte del Ca acumulado es liberado aumentando la concentración de Na del medio de incubación a  $15 \text{ mmoles} \cdot \text{l}^{-1}$ . Esto se debe a la existencia de un mecanismo de salida de Ca activado por Na cuyo  $K_m$  está alrededor de  $7 \text{ mmoles} \cdot \text{l}^{-1}$  de Na (Crompton, Capano y Carafoli, 1976). La estequiometría de este contratransporte es de 2 Na por cada Ca, por lo que sería electroneutro (Affolter y Carafoli, 1980; Fiskum y Lehninger, 1980). El mecanismo descrito no se encuentra presente en mitocondrias hepáticas.

Los niveles de la concentración de Na intracelular en músculo cardíaco en reposo oscilan entre 5,7 y  $11 \text{ mmoles} \cdot \text{l}^{-1}$  (Lee, 1981), lo cual significa que el flujo de salida de Ca de la mitocondria debido al intercambio  $\text{Na} \cdot \text{Ca}$  debería estar parcialmente activado (Chapman, 1983) y en consecuencia aunque, en las células intactas, la captación activa de Ca por la mitocondria estuviera estimulada el Ca podría salir de la organela en intercambio con Na intracelular. El balance entre ambos procesos determinará cuanto Ca se acumula dentro de esta organela.

Las mitocondrias podrían, por lo tanto, influir en el destino del Ca celular y en la respuesta contráctil del músculo cardíaco cuando cambian los ni

veles de Na intracelular como por ejemplo durante las contracturas por ausencia de Na o durante la inhibición de la bomba de Na-K.

Dos aspectos adicionales de la función mitocondrial en el transporte de Ca deben ser considerados para completar la discusión de la función de estas organelas en la homeostasis del Ca intracelular en el músculo cardíaco. Uno de ellos es la capacidad mitocondrial de acumular grandes cantidades de Ca, en un proceso relativamente lento, que se ha observado cuando causas patológicas alteran la permeabilidad del sarcolema (Schanne, Kane, Young y Farber, 1979). Esta capacidad mitocondrial, está relacionada con la existencia de un sistema de captación simultánea de fosfato inorgánico (Ponce-Hornos y Langer, 1982; Ponce-Hornos, Langer y Nudd, 1982) que precipita con Ca en la matriz mitocondrial en forma de hidroxapatita. Este hecho es de gran importancia porque permite a la mitocondria almacenar importantes cantidades de Ca sin que varíe la actividad iónica de su matriz. El otro aspecto es la regulación por el Ca de la actividad enzimática de la matriz mitocondrial. Esta regulación enzimática sería la razón fundamental de la existencia de sistemas transportadores de Ca que tienden a una regulación fina de los niveles de Ca intramitocondrial (Carafoli, 1985).

#### 4. Modelos del proceso de excitación-contracción-relajación

Como ya se expresara, el músculo cardíaco es altamente dependiente del Ca presente en el medio extracelular para desarrollar su función contráctil. Además, existen otras fuentes de Ca capaces de participar en el fenómeno contráctil, por lo que los modelos corrientes del acoplamiento excitación-contracción, a pesar de que le asignan un papel preponderante a la entrada de Ca

desde el medio extracelular, disienten en el grado de participación y función que le asignan a este proceso.

Uno de ellos, propuesto y extensamente estudiado por Fabiato y Fabiato (1977), llamado "Ca- induce la liberación de Ca", postula que la entrada de Ca desde el espacio extracelular es insuficiente para activar a los miofilamentos en forma directa. Una entrada relativamente pequeña de Ca (via los canales lentos y posiblemente el intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ ) induciría la liberación subsecuente de mayor cantidad de este ión por el RS. Este Ca así liberado sería el responsable de la activación de los miofilamentos (Figura 1). De este modo, el mecanismo de "Ca-induce la liberación de Ca" coloca al RS en la posición de un sistema amplificador y la magnitud del Ca liberado dependería del Ca que entra a través del sarcolema.

En ninguno de los trabajos de Fabiato se expone la necesidad de un nivel determinado de Ca para estimular la liberación de Ca por parte del RS. El estímulo para esta liberación no consistiría en la producción de un determinado nivel de Ca libre citoplasmático sino que dependería del cambio en su concentración durante un tiempo dado (Fabiato, 1983). Así, el mismo cambio en la concentración de Ca libre puede o bien cargar de Ca al RS si fué aplicado lentamente (5 s) o inducir la liberación de Ca si lo fué rápidamente (0,2 s). De estos estudios infieren los autores que la simple entrada de Ca transarcolema no podría activar a los miofilamentos sin estimular previamente la liberación de Ca por el RS (Fabiato, 1981a;Fabiato, 1985).

El modelo extremo opuesto propuesto por Langer (1971), sugiere que la cantidad de Ca que ingresa a la célula en cada latido sería suficiente para activar a los miofilamentos y no se requeriría Ca adicional liberado por el RS (Figura 2). Este Ca provendría del medio extracelular libre y de la misma

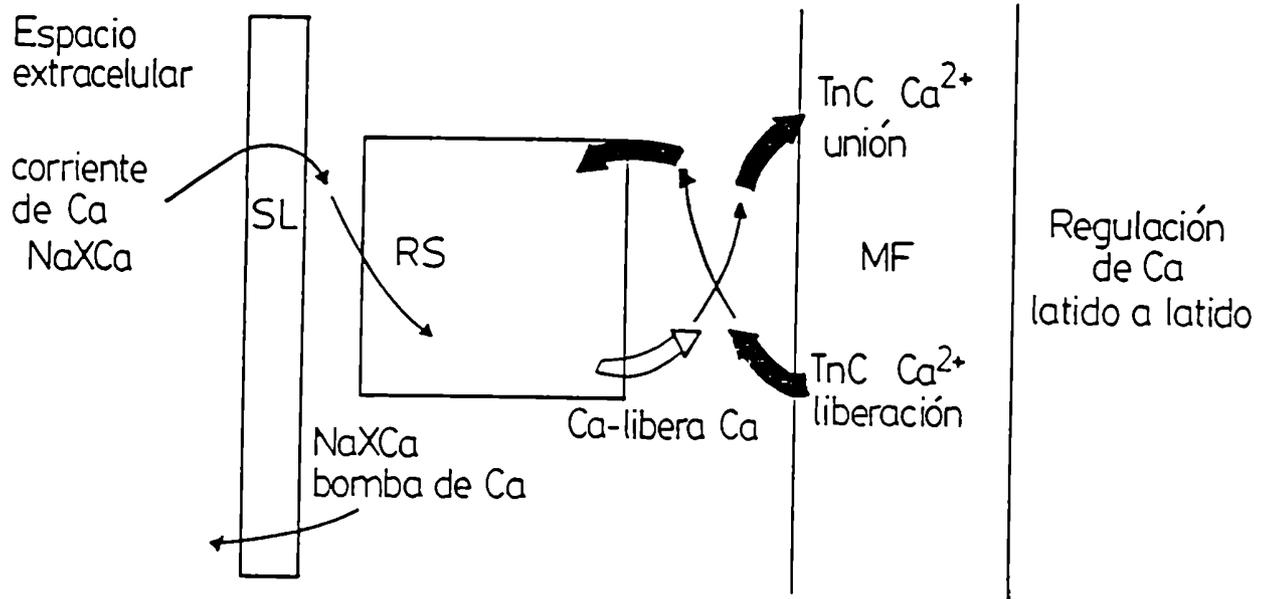


Figura 1. Participación del retículo sarcoplásmico (RS) en el proceso contractil según el modelo Ca-induce liberación de Ca.  
SL, sarcolema; TnC, troponina C; MF, miofilamento.

membrana plasmática, más específicamente, del complejo glicocalix-sarcolema (Langer, 1982). Como ya se expusiera, este complejo es capaz de unir Ca con alta afinidad. La cantidad de Ca unida a estos sitios está afectada por un gran número de factores, entre otros la concentración de Na, ión que compite con el Ca por los sitios de unión sobre este complejo. A partir de estos sitios el Ca sería liberado hacia los miofilamentos. Una parte de este Ca puede volverse a unir a los sitios superficiales durante la relajación y parte ser captado por el RS. Según este modelo, la fracción de Ca que recicla hacia los miofilamentos desde las organelas intracelulares es considerada despreciable en el músculo cardíaco, lo cual está indicado en la Figura 2 por una flecha unidireccional entre los miofilamentos y el RS o las mitocondrias. El mantenimiento del estado estacionario implica que el Ca almacenado intracelularmente debe retornar al intersticio, probablemente por medio de una ruta específica (Langer, 1974).

La tendencia actual parecería aceptar como modelo de la cupla excitación-contracción-relajación en músculo cardíaco, una combinación de ambos modelos tal que: 1. el Ca entraría durante el potencial de acción a través de los canales de Ca y posiblemente el intercambiador  $\text{NaCa}$ ; 2. esta entrada de Ca estimularía la liberación de Ca adicional por el RS; 3. la combinación del Ca liberado por el RS y del que entra desde el extracelular activaría a los miofilamentos; 4. la relajación se produciría por secuestro de Ca por la bomba de Ca del RS y por transporte directo de Ca hacia el extracelular a través de la bomba de Ca asociada a sarcolema y por el intercambiador  $\text{NaCa}$ . La participación relativa de una u otra fuente de Ca en la activación de la contracción miocárdica sería distinta dependiendo de la especie de que se trate (Bers, 1985; Langer, 1987).

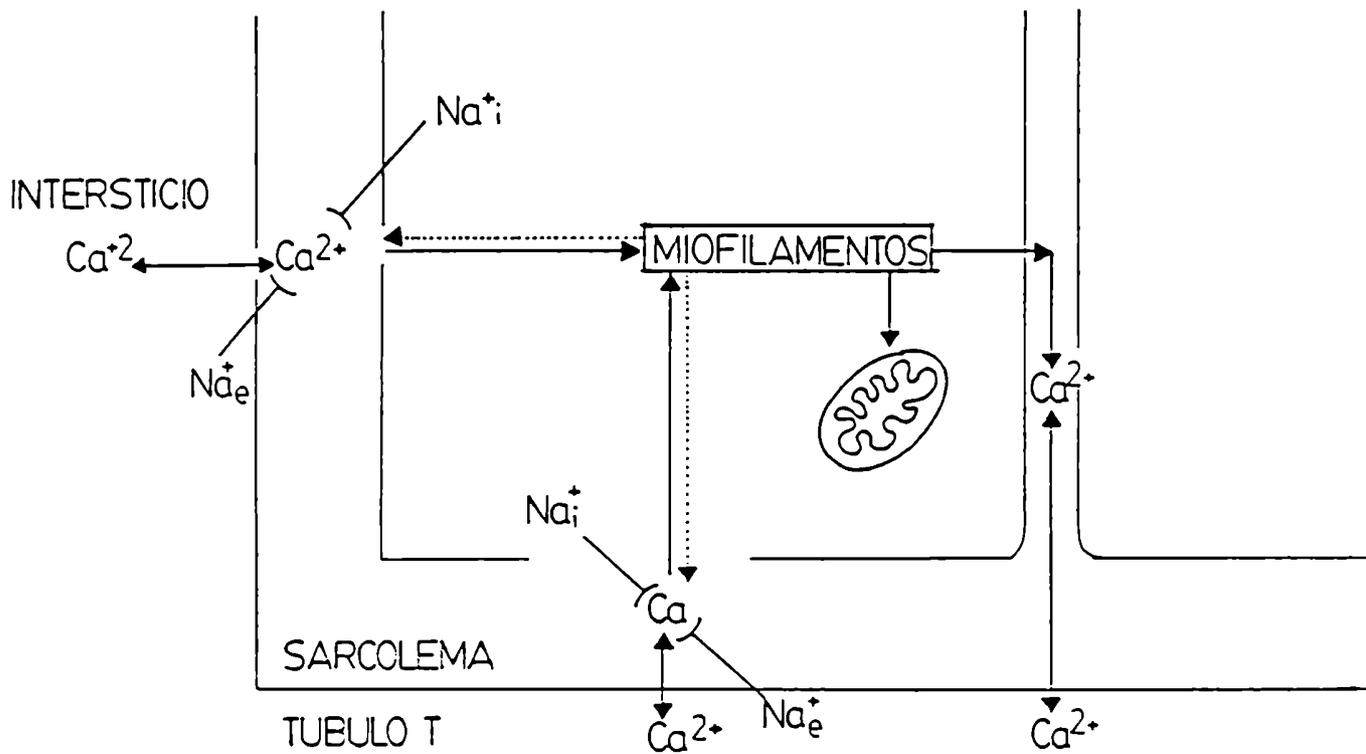


Figura 2. Representación esquemática, según Langer (1977), de un modelo de los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el miocardio de mamífero. La representación de  $\text{Na}_e^+ - \text{Na}_i^+$  a través del sarcolema indica la importancia de la distribución del Na tisular para determinar el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## B. ENERGETICA CARDIACA

### 1. Generalidades

El tejido muscular posee componentes subcelulares que están específicamente organizados para convertir grandes cantidades de energía química en trabajo y calor. No caben dudas que las fuentes inmediatas de energía química en el metabolismo muscular son la hidrólisis de ATP y Creatina fosfato y que la oxidación de sustratos como hidratos de carbono, ácidos grasos y lactato es la encargada de mantener, en estado estacionario, los niveles de estos compuestos con enlaces fosfato de alta energía. Debido a que el músculo cardíaco debe desarrollar una actividad ininterrumpida, la energía química utilizada durante el evento contráctil no puede ser recuperada aeróbicamente una vez finalizado el mismo. Como consecuencia, la restauración de los niveles de ATP y de Creatina fosfato consumidos debe realizarse rápidamente y en gran medida durante la misma contracción. Es decir, en el corazón existe una superposición temporal entre el consumo y la restauración de los niveles de energía química. Esta es una característica diferencial respecto del comportamiento observado en músculo esquelético en el cual es posible demostrar una clara separación temporal entre los eventos ligados a la utilización y aquellos ligados a la recuperación de la energía química consumida, hecho que se hace más evidente a temperaturas inferiores a 20 °C (Hill, 1928; Gibbs y Gibson, 1972; Chapman y Gibbs, 1974).

El comportamiento del músculo cardíaco como transductor de energía puede ser analizado experimentalmente por medio de: a) Mediciones mecánicas (fuerza o tensión desarrollada, velocidades de contracción y de relajación, velocidad

de acortamiento, etc) (Brady, 1964; Brutsaert, 1979; Roos y Brady, 1982); b) Mediciones químicas (consumo de moléculas con enlace fosfato de alta energía como ATP y Creatina fosfato, consumo de glucosa, producción de ácido láctico, consumo de oxígeno ) (Rich y Brady, 1974; Coulson, 1976; Ponce-Hornos y Langer, 1982; Dominguez-Mon, Ponce-Hornos, Gómez, Cannata y Taquini; 1984); c) Mediciones biofísicas (seguimiento fluorométrico de cambios redox, cinética de intercambio iónico, métodos miotérmicos) (Mulieri, Luhr, Trefry y Alpert, 1977; Gibbs y Chapman, 1979a; Chapman, Gibbs y Loiselle, 1982; Ponce-Hornos, Bonazzola y Taquini, 1987). Cualquiera sea el método utilizado es esencial que las conclusiones obtenidas a partir de mediciones químicas y/o mecánicas sean compatibles con aquellas obtenidas a partir de mediciones termodinámicas. En la presente tesis, para el estudio del comportamiento energético y mecánico del músculo cardíaco se ha utilizado un método miotérmico que se describe en detalle en la sección Métodos.

Estrictamente, el músculo cardíaco es un sistema termodinámico abierto ya que intercambia tanto energía (en forma de calor y trabajo) como materia con sus alrededores. Una preparación muscular aislada y perfundida, responde a la estimulación eléctrica con una respuesta contráctil que involucra el desarrollo de fuerza, la posible realización de trabajo mecánico externo y la generación de calor por las reacciones químicas que acompañan al evento mecánico. Este intercambio inicial de energía es seguido por procesos metabólicos de recuperación que involucran el consumo de oxígeno con generación de dióxido de carbono acompañados de generación de calor. En consecuencia, durante los procesos de recuperación el músculo intercambia materia y energía (en forma de calor) con sus alrededores. Debido a que los cambios térmicos que acompañan al intercambio de gases respiratorios son despreciables, tanto respecto de a-

quello que provenientes de las reacciones químicas que se producen durante el evento mecánico como de los asociados con el metabolismo de recuperación, el músculo puede ser tratado como un sistema termodinámico cerrado (Gibbs y Chapman, 1979a). Además, todas las reacciones químicas tienen lugar en solución (fases condensadas) por lo cual se puede considerar que el sistema se encuentra en condiciones de presión y volumen constante y en consecuencia las diferencias entre energía interna y entalpía pueden, en la práctica, ser obviadas (Wilkie, 1960). Finalmente, gradientes de temperatura ocurren naturalmente en el músculo, como sucede en cualquier sistema que produce calor, pero el calor producido en el músculo es casi inmediatamente perdido hacia el medio y por lo tanto la temperatura en el mismo, a los fines prácticos, permanece constante (Wilkie, 1960; Gibbs y Chapman 1979a). En consecuencia, una preparación muscular aislada puede ser tratada como un sistema termodinámico cerrado a presión y volumen constante en donde los términos energía interna y entalpía serían intercambiables.

## 2. Componentes energéticos del músculo cardíaco

Una forma de analizar el comportamiento energético del corazón es dividir el intercambio energético en una fracción relacionada fundamentalmente con el estado de reposo mecánico (que se denomina metabolismo basal) y otra que está asociada con la actividad mecánica (fase activa). La evaluación de ambos componentes se realiza estudiando energéticamente al músculo en actividad y en estado de reposo, tal que la diferencia entre el intercambio de energía total y aquella que se obtiene durante el reposo nos da el recambio del estado activo.

#### a. Metabolismo basal

Aún cuando no se lo estimule, un músculo aislado debe conservar la integridad de su composición intracelular en contra de gradientes eléctricos y químicos. La producción de calor asociada a este metabolismo basal o de mantenimiento es una medida de la utilización y recuperación de la energía involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular. Si bien hasta el presente no se han podido establecer las bases fisiológicas de este calor de reposo, se ha postulado al transporte activo de Na y K como uno de los responsables del consumo basal de ATP en estas condiciones. De la aplicación de técnicas miotérmicas conjuntamente con métodos radioisotópicos se puede estimar que el transporte activo de Na y K participaría con aproximadamente 10-25% del calor producido durante el reposo mecánico (Gibbs y Chapman, 1979b; Gibbs, 1983; Ponce-Hornos, Bonazzola y Taquini, 1987). La reducción en el consumo de oxígeno cuando se reduce la concentración de Na extracelular (Lochner y Dudziak, 1965), la disminución de la producción de calor de reposo con simultánea reducción en el influjo de K sin alteración de la salida del mismo cuando disminuye la concentración de Na en el medio de perfusión (Ponce-Hornos, Bonazzola y Taquini, 1987) y la elevación del consumo de oxígeno o de la producción de calor asociada al reposo mecánico por aumento en la concentración extracelular de K (Ponce-Hornos y Márquez, 1986; Loiselle, 1987; Ponce-Hornos, Márquez Bonazzola, 1987) son consistentes con la postulada contribución del transporte activo de Na y K al metabolismo basal en el músculo cardíaco. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que hasta el 30% de los valores medidos de producción de calor en reposo estarían relacionados con el costo energético del recambio de proteínas (Gibbs y Chapman, 1979b; Schreiber, Evans, Oratz

y Rothchild, 1986). El músculo cardíaco posee un metabolismo basal particularmente elevado cuando se lo compara con el músculo esquelético. Dependiendo de la especie, esta diferencia entre ambos tipos musculares es tal que el músculo cardíaco puede tener un metabolismo basal entre cinco y ocho veces más elevado que el correspondiente al músculo esquelético. Hasta el presente no se ha podido explicar esta diferencia y se ha especulado que un componente significativo del mismo podría reflejar una respuesta mitocondrial al continuo influjo pasivo de  $H^+$  hacia su matriz. La evidencia es fundamentalmente circunstancial. Por ejemplo, se relacionaría con la diferencia en el contenido mitocondrial en ambos tipos musculares (músculo esquelético y cardíaco). Por otra parte, las diferencias observadas en el calor de reposo entre distintas especies se correlaciona con el volumen mitocondrial de sus corazones (Loiselle, 1987).

En resumen, si bien hasta el presente existen evidencias experimentales que sugieren la contribución de distintos procesos al metabolismo basal del músculo cardíaco, el total esclarecimiento de su origen es aún materia de especulación.

#### b. Metabolismo activo

Como ya se puntualizara, el músculo cardíaco aislado y perfundido responde a la estimulación eléctrica con una respuesta que, como consecuencia de la interacción entre las proteínas contráctiles, se manifiesta como desarrollo de fuerza. Cuando se permite que el músculo se acorte contra una carga, el desarrollo de fuerza hace posible la realización de trabajo mecánico externo. Ha sido establecido, desde los clásicos experimentos de Fenn (Fenn, 1923

y 1924) posteriormente confirmados por Hill (Hill, 1938) en músculo esquelético, que la energía total liberada en una contracción ( en forma de calor y/ o trabajo) no es contante y depende de la carga contra la cual el músculo realiza trabajo externo. Asimismo, en el músculo cardíaco se ha observado una dependencia de la energía total liberada con la carga contra la cual el músculo realiza trabajo (contracciones isotónicas) (Gibbs y Chapman, 1979a) pero, a diferencia del músculo esquelético en el que la energía total liberada es mayor cuando el músculo se acorta contra una carga (realiza trabajo externo), en el músculo cardíaco la misma es máxima en condiciones en las que el músculo desarrolla fuerza pero no realiza trabajo externo (contracciones isométricas). En este último caso, la energía total durante el evento contráctil es liberada en forma de calor (Gibbs y Chapman, 1979b; Gibbs, 1987).

La liberación de calor que acompaña al ciclo contracción-relajación, al que se ha llamado calor activo, es la manifestación térmica de los cambios químicos que ocurren durante el evento contráctil. Estos cambios involucran tanto la utilización como la recuperación (principalmente aeróbica) de la energía contenida en enlaces químicos. La separación de los componentes energéticos relacionados con el el proceso de excitación-contracción-relajación en el músculo cardíaco puede realizarse según la actividad de los varios componentes enzimáticos involucrados en el ciclo cardíaco. Con este criterio, el proceso de excitación-contracción-relajación puede ser dividido en un componente contráctil y un componente no contráctil. El primero de ellos, está relacionado con la utilización de energía química (en forma de ATP) a nivel de las proteínas contráctiles a través de las ATPasas de los miofilamentos. El componente no contráctil está asociado con la despolarización y activación de la fibra. Entre estos procesos se cuentan la liberación de calcio dentro

del sarcoplasma, su movimiento desde y hacia los sitios de unión miofibrilares y su retorno a los sitios de almacenamiento por los sistemas de transporte dependientes de ATP (bombas de Ca tanto de sarcolema como de retículo sarcoplásmico) conjuntamente con la recuperación del gradiente electroquímico para Na y K llevada a cabo por la Na-K ATPasa asociada a sarcolema (Chapman, Gibbs y Gibson, 1970). La energía química utilizada por ambos componentes energéticos es recuperada aeróbicamente durante la misma contracción. Para la evaluación del componente no contráctil, cuya manifestación térmica es el denominado calor de activación o calor independiente de tensión, debe eliminarse del proceso de excitación-contracción-relajación toda interacción entre miofilamentos. Esto puede lograrse minimizando la generación de fuerza por disminución de la tensión de reposo, en músculos papilares, hasta que no se registre desarrollo de fuerza. Un método alternativo ha sido la utilización de medios hipertónicos en los que la interacción entre miofilamentos es mínima (Gibbs y Vaughan, 1968; Alpert y Mulieri, 1982; Gibbs, Loiselle y Wendt 1988). En concentraciones de calcio fisiológicas, los valores obtenidos por ambos métodos son concordantes y varían, según la especie bajo estudio, entre 1,5 y 4  $\text{mJ} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo (Loiselle y Gibbs, 1979; Loiselle, 1987). Su magnitud es afectada por cambios en la concentración extracelular de calcio y por agentes que alteran la contractilidad (Gibbs y Vaughan, 1968; Gibbs, 1982).

En resumen, actualmente existen numerosas evidencias experimentales que permiten sugerir la contribución de distintos procesos al metabolismo activo del músculo cardíaco.

### 3. Antecedentes históricos de los estudios miotérmicos

El desarrollo de las técnicas miotérmicas para el estudio energético de preparaciones biológicas datan de más de un siglo. Fué en 1848 que Hermann Helmholtz usando tres termocuplas en serie con un galvanómetro publicó los primeros experimentos relacionados con la producción de calor en músculo esquelético (Helmholtz, 1848). Luego de esta publicación inicial, transcurrieron quince años hasta que en 1860 Adolf Fick retoma estos experimentos. Pero no fue hasta 1909 en que A.V. Hill comienza un estudio sistemático e integrado de la termodinámica de la contracción muscular esquelética. Este autor inicia sus investigaciones utilizando unas termopilas (gran número de termocuplas en serie) diseñadas por Blinx y que el mismo Hill mejoraría progresivamente tanto en rapidez de respuesta como en sensibilidad. Esta metodología, con diferentes variantes continúa siendo aplicada en nuestros días en el estudio energético del músculo esquelético (Hill, 1965).

A pesar del éxito que la aplicación de la metodología miotérmica desarrollada por A.V. Hill tuvo en el estudio energético del músculo esquelético, los inconvenientes relacionados con la aplicación de la misma al músculo cardíaco fueron tales que hasta 1961 no se encuentra literatura miotérmica referida a ésta preparación (Neill, Wagner, Messner, Krasnow y Gorlin, 1961). Posteriormente, en 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguen aplicar por primera vez el método de las termopilas desarrollado por A.V. Hill en el músculo cardíaco, más específicamente al músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo (Ricchiuti y Gibbs, 1965; Gibbs, Mommaerts y Ricchiuti, 1967). Si bien con estas termopilas podían realizarse estudios miotérmicos simultáneos con estudios mecánicos, el pequeño tamaño de la preparación que debía utilizarse impidió que se pudiesen realizar estudios iónico-cinéticos y/o metabólicos en forma simultánea. De hecho estos estudios fueron realizados por muchos años

por otros grupos de investigadores haciendo más dificultosa la correlación entre resultados. Mientras que las termopilas desarrolladas por Gibbs y col. fueron mejoradas tanto en velocidad de respuesta como en sensibilidad por el grupo de N.R. Alpert (Mulieri, Luhr, Trefry y Alpert, 1977), las metodologías que intentaron el uso de preparaciones musculares mas grandes, para poder realizar estudios metabólicos e iónico cinéticos simultáneos, fueron en general de baja sensibilidad y lenta respuesta. Más recientemente, se ha desarrollado un método calorimétrico con una sensibilidad comparable al método de las termopilas, con suficiente velocidad de respuesta y que permite el estudio simultáneo de parámetros energéticos, contráctiles, iónico-cinéticos y metabólicos (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982). Este último método es el que se ha aplicado en la presente tesis para el estudio mecánico-energético del músculo cardíaco (ver Métodos).

#### 4. Métodos miotérmicos

Hasta el presente, en el estudio energético del músculo cardíaco se han utilizado fundamentalmente tres métodos miotérmicos: a. Método de las diferencias de temperatura arterio-venosa; b. Método de las termopilas y c. Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos y se expondrán las ventajas, desventajas y aplicabilidad de los mismos.

##### a. Método de las diferencias de temperatura arterio-venosa.

Este método utiliza la medición del flujo coronario y el gradiente térmico ( $\Delta T$ ) entre los flúidos arteriales y venosos (Neill, Wagner, Messner, Kras

now y Gorlin, 1961; McDonald, 1971; Coulson y Rusy, 1973; Theisohn, Friedrich, Justus, Guttler y Klaus, 1977). El método se basa en que el calor producido por el músculo cardíaco es proporcional a la diferencia de temperatura arterio-venosa (evaluada con termistores o termocuplas), tal que:

$$Q = \Delta T \cdot J_{a-v} \cdot c$$

Donde:  $Q$  = flujo calórico

$\Delta T$  = diferencia de temperatura arterio-venosa

$J_{a-v}$  = flujo arterio-venoso

$c$  = calor específico de la solución de perfusión

Debido a que este método requiere una cantidad finita de flujo para obtener una medición, el calor producido en condiciones isquémicas (ausencia de flujo) no puede ser determinado. Por otra parte, en general esta metodología es de respuesta relativamente lenta con constantes de tiempo superiores a los 2,7 minutos y de sensibilidad relativamente baja. La ventaja más notable es que al utilizar preparaciones musculares relativamente grandes (en general co razón entero) permite realizar estudios metabólicos simultáneos con métodos bioquímicos como por ejemplo medición de flujo glucolítico, producción de ácido láctico etc. Además, debido a que la perfusión se realiza por vía fisiológica se evitan los problemas asociados con una limitada difusión de oxígeno hacia el tejido. Finalmente, en algunos casos las mediciones miotérmicas han podido realizarse simultáneamente con mediciones de consumo de oxígeno (por el método polarográfico) con lo que se han podido obtener índices del equivalente calórico del consumo de oxígeno en músculo cardíaco (Rusy y Coulson, 1973; Theison, Friedrich, Justus, Guttler y Klaus, 1977).

## b. Método de las termopilas

Este método termoeléctrico fue desarrollado y aplicado extensamente por A.V. Hill en el estudio energético del músculo esquelético (Hill, 1965). Hacia 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguieron desarrollar un sistema (posteriormente mejorado por Mulieri y colaboradores, 1977) de termopilas diseñadas para medir producción de calor en preparaciones musculares con características especiales (Ricchiuti y Gibbs, 1965; Gibbs, Mommaerts y Ricchiuti, 1967). Por ejemplo, la preparación muscular a utilizar debe ser suficientemente delgada para permitir la adecuada difusión de oxígeno en el tejido y su forma debe ser tal que permita que la mayor parte de su superficie esté en contacto con las uniones termosensibles (termocuplas ubicadas a lo largo del músculo y conectadas en serie). La preparación muscular más utilizada que cumple estas condiciones ha sido el músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo o el papilar de ventrículo izquierdo de corazón de rata. El calor producido por el músculo es medido como el producto entre la variación de temperatura, registrada por las termopilas, y el calor específico del músculo. Los inconvenientes técnicos están relacionados, por un lado, con la elevada pérdida de calor que se produce, de aproximadamente 14% por segundo (constantes de tiempo del orden de 10 segundos) y consiguiente inestabilidad de la línea de base y, por otro lado, con los inconvenientes derivados del pequeño tamaño de las preparaciones utilizadas (masa promedio de 5 mg) como, por ejemplo, el error asociado a la cantidad de solución adherida a la preparación lo que puede inducir una incertidumbre en la masa tisular a utilizar en los cálculos de hasta un 30%. A esto debe agregarse que el pequeño tamaño de la preparación hace extremadamente difícil realizar mediciones simultáneas de paráme-

tros metabólicos o estudios de cinética iónica como en el método antes mencionado. Las ventajas más relevantes de esta metodología son su alta sensibilidad y rápida respuesta (constantes de tiempo de alrededor de 6 segundos), características considerablemente superiores al método basado en diferencias de temperatura arterio-venosas.

### c. Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos

Una alternativa al método de las termopilas rápidas descrito en b., particularmente por su sensibilidad y capacidad de evaluar simultáneamente parámetros mecánicos, bioquímicos e iónico-cinéticos, es un método desarrollado hacia 1982 (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982). El mismo se basa en la medición del flujo de calor desde la cámara interna del microcalorímetro en donde se encuentra la pieza muscular en estudio y las paredes externas del mismo en contacto con un baño mantenido a temperatura constante. La medición se lleva a cabo mediante el uso de dos juegos de 71 unidades termosensibles cada uno, conectadas en serie y hubicadas entre la cámara interna, en contacto con el músculo, y la pared externa del sistema, en contacto con el baño. Este método, al igual que aquel basado en la medición de diferencias de temperatura arterio-venosas, permite la utilización de una gran variedad de preparaciones miocárdicas de tamaños diversos, perfundidas por vía fisiológica, lo cual resuelve el inconveniente del espesor tisular como factor limitante de la difusión de oxígeno hacia el tejido. En cuanto a la velocidad de respuesta, es mayor (constante de tiempo de 0,9 min) que el método basado en la medición de diferencias de temperatura arterio-venosas (constante de tiempo de 2,7 min) pero menor que el método de termopilas descrito en b.. Su sensibi-

lidad es comparable con este último y, además, permite la evaluación continua de actividad contráctil, parámetros metabólicos (mediante métodos bioquímicos), flujos iónicos, simultáneamente con las mediciones de producción de calor (Dominguez-Mon, Ponce-Hornos, Gómez, Cannata y Taquini, 1984; Ponce-Hornos, Bonazzola y Taquini, 1987). Por otra parte, estas mediciones son técnicamente independientes de la temperatura de trabajo y, al ser este método independiente de la existencia de perfusato, es utilizable en condiciones isquémicas (ausencia de perfusión). Cabe destacar que por su versatilidad, capacidad de respuesta y sensibilidad este método es el que se ha utilizado en la presente tesis, encontrándose detallado en la sección Materiales y Métodos.

### C. OBJETIVO DE LOS EXPERIMENTOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS

Numerosos estudios han sido realizados con el objeto de dilucidar la participación de las distintas fuentes de calcio en el proceso de excitación-contracción-relajación en músculo cardíaco. Sin embargo, si bien se está de acuerdo que el calcio proveniente del medio extracelular juega un papel fundamental en la contracción muscular cardíaca, aún no ha sido posible determinar el grado de participación de los distintos compartimientos potencialmente capaces de acumular y liberar calcio que existen en la célula miocárdica. Como ya se expusiera, la membrana plasmática representa en si misma un compartimiento con capacidad de almacenar y movilizar calcio distinguible del compartimiento extracelular libre. Esta diferenciación entre Ca extracelular libre y Ca asociado a la membrana, se basa principalmente en la cinética de cambio en el comportamiento mecánico frente a variaciones en la concentración de Ca en el medio extracelular. Por ejemplo, mientras que la reducción de la

concentración extracelular de Ca induce una caída de la fuerza con un tiempo medio de 82 segundos, el aumento de la misma llega a un estado estacionario en menos de 0,2 minutos. Esto es compatible con un sistema de adsorción-desorción de Ca en el que el complejo glicocáliz-sarcolema sería el sistema implicado. Por otra parte, esta compartimentalización de Ca en la membrana plasmática recibe soporte adicional en la existencia de agentes químicos y farmacológicos capaces de modificar selectivamente la disponibilidad de Ca extracelular libre, del Ca asociado al sarcolema o la translocación de Ca desde el medio extracelular al medio intracelular. Entre estos agentes pueden mencionarse la alteración de la concentración de Ca en el medio de perfusión, la presencia de dimetionio, polimixina B, fosfolipasa D, lantano o el agregado de los llamados bloqueantes cálcicos como nifedipina, verapamil y D-600 (Langer, Serena, Nudd, 1975; Burt, Duenas y Langer, 1983; Langer y Rich, 1985, Ponce-Hornos y Taquini, 1986; Langer, 1987).

Otro compartimiento con capacidad de almacenar Ca y liberarlo hacia el citosol es el retículo sarcoplásmico que puede, en consecuencia participar en la regulación del Ca citoplasmático durante la contracción. La participación de esta organela en el evento contráctil a través del mecanismo "Ca induce la liberación de Ca por el retículo sarcoplásmico" ha sido sostenida principalmente por Fabiato y colaboradores (Fabiato y Fabiato, 1977; Fabiato, 1985), aunque el grado de participación relativa de este compartimiento en la activación de los miofilamentos no está aún establecida.

Los experimentos presentados en esta tesis fueron diseñados con el objeto de evaluar la participación relativa del sistema retículo sarcoplásmico tanto en el proceso de excitación-contracción-relajación como en el mantenimiento del estado de reposo mecánico en el músculo cardíaco. Con este propósito

se evaluaron características mecánicas simultáneamente con características miotérmicas de preparaciones musculares cardíacas de distintas especies, que fueron elegidas en base a su distinto grado de desarrollo de retículo sarcoplásmico (rata> conejo> sapo). Las diferentes preparaciones cardíacas fueron sometidas a condiciones que alteran el estado inotrópico de las mismas, como la variación en la frecuencia de estimulación, y a la presencia de cafeína (droga que afecta la actividad del retículo sarcoplásmico). El costo energético de la movilización de calcio y, en consecuencia su expresión miotérmica, varía según el mecanismo y/o compartimiento involucrado. En consecuencia, determinar la participación relativa de los distintos sistemas encargados de dicha movilización es de obvia relevancia ya que está relacionada estrechamente con la eficiencia con la cual el músculo cardíaco desarrolla su actividad.

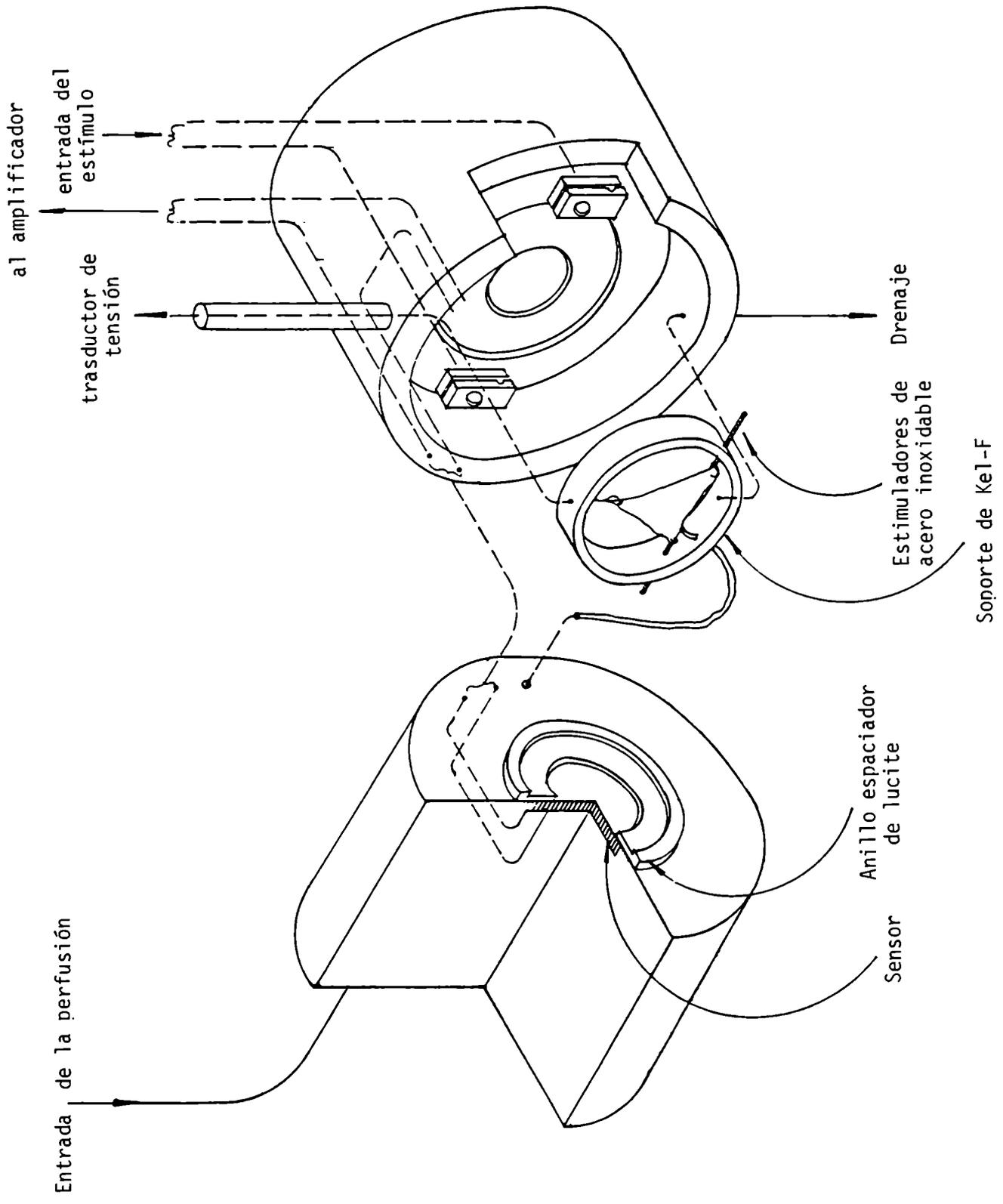
MATERIALES Y METODOS

## A. PREPARACIONES BIOLÓGICAS

### 1. Tabique interventricular de conejo

Se utilizaron conejos blancos (Nueva Zelanda), machos, de peso que osciló entre los 2,5 y 3 kg. Los animales fueron heparinizados por vía endovenosa (1250 USP) y sacrificados con una sobredosis de pentobarbital endovenoso ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). El corazón fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución de Krebs-bicarbonato, a  $30^\circ \text{C}$ , oxigenada con una mezcla gaseosa de 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ . Las aurículas y la pared ventricular derecha fueron removidas e inmediatamente se canalizó la rama septal de la coronaria izquierda con una cánula de polietileno PE 50. De éste modo, se logra la perfusión de la masa muscular, vía arterial, a flujo ( $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y temperatura ( $25^\circ \text{C}$ ) regulados. En todos los casos el período transcurrido desde la toracotomía hasta la introducción del catéter en la arteria septal fue inferior a tres minutos. La pared septal, de forma triangular, con una masa de aproximadamente 1 g fue cuidadosamente disecada del resto del músculo cardíaco no perfundido y montada en un soporte de Kel-F como se muestra en la Figura 3. La base del músculo se fijó a dos finos alambres de acero inoxidable que a su vez son utilizados como electrodos de estimulación (ver Figura 3). Asimismo, el músculo fue fijado por su ápex a un transductor de fuerza isométrica sensible al vector de tensión desarrollada a lo largo de su eje.

La frecuencia de estimulación fue variable, entre 0.167 y 0.833 Hz y controlada mediante un estimulador Grass SD9, utilizando ondas cuadradas de 2 V y 5 ms de duración. El rango de fuerza diastólica a que se sometió a los distintos músculos osciló entre 45 y 80 mN y se mantuvo constante a lo largo de



cada experimento.

Sólo fueron aceptados para su estudio aquellos músculos que durante el período de equilibración mantenían constante y mayor que dos la relación fuerza generada/fuerza diastólica cuando eran estimulados a 0,5 Hz. También se descartaron aquellas preparaciones que en ausencia de estimulación no permanecieron en reposo.

Al finalizar cada experimento, el tejido fué removido del calorímetro, pesado en un recipiente previamente tarado (peso húmedo =  $1,171 \pm 0,133$  g) y secado a 110 °C hasta peso constante (usualmente 48 hs). El porcentaje de agua tisular promedio fue de  $86,1 \pm 0,2$  %.

Con respecto al porcentaje de agua de las preparaciones arterialmente perfundidas "in vitro", debe mencionarse que durante la primera hora a hora y media que le sigue a la canulación septal y perfusión con solución de Krebs, existe un incremento en el contenido de agua de aproximadamente un 5% (Tillich, Fung, Hom y Langer, 1979; Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982; Ponce-Hornos y Taquini, 1986).

Debe hacerse notar que el proceso de disección, montaje de la preparación y equilibración del calorímetro requiere aproximadamente dos horas, período que incluye con suficiente amplitud al período inicial de ganancia de agua. De este modo, se asegura que las mediciones mecánicas y calorimétricas se realicen en condiciones estacionarias de contenido hidroelectrolítico.

## 2. Ventrículo de rata

Se utilizaron ratas hembra, de la cepa Wistar, de peso variable entre 200 y 230 g. Los animales fueron heparinizados y sacrificados con una sobredosis

de pentobarbital intraperitoneal ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Al igual que en el caso ya descrito del tabique interventricular de conejo arterialmente perfundido, el corazón de estos animales fue rápidamente removido por toracotomía y sumergido en solución de Krebs con baja concentración de Ca ( $0,5 \text{ mM}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . La perfusión se comenzó inmediatamente por vía aorta en forma retrógrada según la técnica de Langendorff. En todos los casos se removió la aurícula derecha y se practicó una pequeña incisión en la base del tabique interventricular con lo que, a esta temperatura se logra eliminar la actividad espontánea. También en este caso el tiempo transcurrido desde la toracotomía hasta el comienzo de la perfusión fue siempre inferior a los tres minutos. La fijación del músculo al soporte del Kel-F fue similar a la practicada en el caso del tabique interventricular de conejo, fijándose el ápex a un transductor de fuerza isométrica. La frecuencia de estimulación fue externamente controlada con un estimulador Grass SD 9, utilizándose ondas cuadradas de  $2 \text{ V}$  y  $3 \text{ ms}$  de duración. La fuerza diastólica o tensión de reposo a la que se sometieron los músculos se mantuvo constante en cada experimento y entre experimentos osciló entre  $40$  y  $80 \text{ mN}$ . Sólo fueron aceptados para su estudio aquellos músculos que durante el período de equilibración en condiciones de  $1,2 \text{ mM}$  Ca mantuvieron una relación fuerza generada/fuerza diastólica superior a dos en forma estable. También se descartaron aquellas preparaciones que en ausencia de estimulación no permanecieron en reposo.

En experimentos preliminares (no presentados en esta tesis), pudo establecerse que a la temperatura de trabajo y en el rango de frecuencia utilizado, los músculos perfundidos a  $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  con solución de Krebs en condiciones fisiológicas de Ca ( $1,2 \text{ mM}$ ) mantenían su actividad contráctil, evaluada mediante la fuerza desarrollada, la máxima velocidad de desarrollo de la fuer

za y la máxima velocidad de relajación, constante por períodos superiores a las seis horas.

Al igual que en las preparaciones de conejo, al finalizar cada experimento el tejido fue removido del calorímetro, pesado en un recipiente previamente tarado (peso húmedo =  $0,599 \pm 0,055$  g) y secado a  $110$  °C hasta peso constante. El porcentaje de agua tisular promedio fue de  $83,0 \pm 0,7$  %.

### 3. Ventrículo de sapo

Se utilizaron sapos (bufo paracnemis) que fueron sacrificados por desmedulación a nivel cervical mediante la introducción de un trócar entre 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> vértebra cervical. El corazón fue rápidamente removido y recogido en solución de Krebs a  $22$  °C. Todo el atrio y el seno venoso fueron extirpados, colocándose una cánula en la cavidad ventricular que se fija a la pared correspondiente. Cabe mencionar que estos ventrículos poseen una circulación coronaria muy rudimentaria. En consecuencia, estos deben perfundirse intracavitariamente como fuera descrito para corazón de rana catesbiana (Sopis y Langer, 1970). El tejido fue montado de modo que el ápex del mismo pudiese conectarse a un transductor de fuerza isométrica. Por otra parte, la base del músculo queda fijada por los dos pequeños electrodos de acero inoxidable que se muestran en la Figura 3, uno colocado en el ventrículo mismo y el segundo en el bulbus cordis del ventrículo. La fuerza diastólica a la que se sometieron los músculos se mantuvo constante en cada experimento oscilando, entre experimentos, en un rango de 10 a 30 mN. En esta especie muscular, la relación entre fuerza generada/fuerza diastólica fue siempre mayor que 8. Los músculos se perfundieron a  $3\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , a  $22$  °C y fueron eléctricamente estimula

dos con ondas cuadradas de 2 V y 3 ms de duración.

Pudo establecerse que en estas condiciones los músculos ventriculares de esta especie son capaces de mantener su actividad contráctil (fuerza generada, máxima velocidad de generación de fuerza, máxima velocidad de relajación) constantes por períodos superiores a las doce horas.

Al finalizar cada experimento el tejido fue removido del calorímetro, pesado en un recipiente previamente tarado (peso húmedo =  $1,090 \pm 0,069$  g) y secado a  $110^\circ\text{C}$  hasta peso constante. El porcentaje de agua tisular promedio fue de  $81,7 \pm 0,2$  %.

#### B. MEDICIONES MIOTÉRMICAS Y MECANICAS SIMULTANEAS

Las mediciones miotérmicas se realizaron utilizando el sistema calorimétrico mostrado en la Figura 3. Si bien los detalles de la construcción y métodos de calibración del sistema calorimétrico han sido publicados "in extenso", estos se presentarán a continuación en forma resumida (Ponce-Hornos, Riccati y Langer, 1982; Dominguez-Mon, Ponce-Hornos, Gómez, Cannata y Taquini, 1983; Ponce-Hornos, Bonazzola y Taquini, 1987).

El calorímetro que se muestra en la Figura 3 está confeccionado en cobre. La superficie interna posee un baño de platino para evitar reacciones con el tejido. Utiliza dos juegos de unidades termosensibles (Cambion-Cambridge Monoionic) cada una con 71 unidades conectadas en serie y ubicadas entre la cámara interna y la gran masa de cobre. El calorímetro se sumerge en un baño termostático que es controlado por un baño de agua (frío-calor) que regula  $\pm 0,003^\circ\text{C}$ , en el cual la solución de perfusión se mantiene en equilibrio térmico. El músculo, perfundido con la solución térmicamente equilibrada y

montado en un soporte de Kel-F, se coloca en la cámara interna del calorímetro. La producción de calor se evalúa entonces por la diferencia de temperatura entre las paredes internas (en contacto con el músculo) y externas (en contacto con el baño termostatzado) del calorímetro. La señal de las unidades termosensibles fue amplificada convenientemente y registrada sobre un polígrafo Grass 5D. El hecho de que las mediciones de flujo de calor entre el baño y la cámara interna sean diferenciales hace que la respuesta calorimétrica para una cantidad fija de calor, sea independiente de la temperatura a la que se realizan las mediciones.

Cuando conocidas cantidades de calor son aplicadas a la cámara interna del calorímetro, las unidades termosensibles responden en proporción a la potencia aplicada. Si la adición de energía es mantenida, el flujo de calor alcanza un nuevo estado estacionario visualizado como un plateau en el registro (Figura 4). En el rango de velocidades de perfusión utilizadas para las distintas preparaciones, la respuesta calorimétrica alcanzó un plateau dentro de los cuatro minutos con una constante de tiempo de alrededor de 1 minuto.

La calibración del calorímetro se llevó a cabo por dos métodos. Por pasaje de una onda de 2,1 kHz a través del músculo por medio de los electrodos de estimulación (ver Figura 3) según el método descrito por Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer (1982) y por pasaje de una corriente a través de una resistencia de valor conocido y calculando la potencia por la relación  $I^2R$ , donde  $I$  es la corriente y  $R$  la resistencia. Los valores obtenidos por ambos métodos fueron coincidentes. Se utilizó rutinariamente el primero de ellos porque permite realizar calibraciones en cualquier momento durante el experimento, aún teniendo al músculo bajo estimulación (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982).

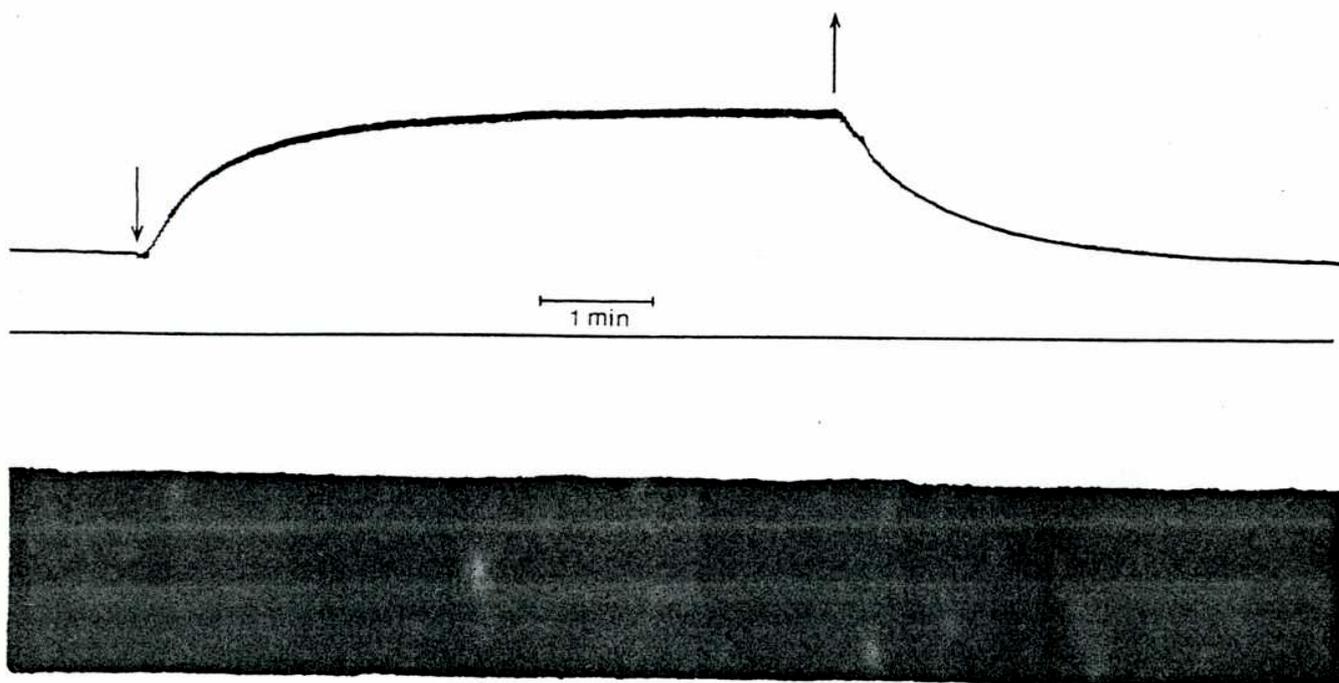


Figura 4. Registro original que muestra la respuesta calorimétrica (panel superior) obtenida por adición de conocidas cantidades de calor ( $0,9 \text{ mW}$ ) a la cámara interna del calorímetro durante el curso de un experimento. Las flechas indican el comienzo y la interrupción de la misma. En el panel inferior se muestra el registro simultáneo de la tensión desarrollada por el músculo en estado estacionario ( $0,5 \text{ Hz}$ ).

Por otra parte, la perfusión entra al calorímetro con una cantidad finita de energía dada por el producto entre la presión de perfusión (PP) y el flujo (V). Esta energía es disipada como calor en la cámara interna del calorímetro por lo que esta contribución debe sustraerse a las mediciones calorimétricas. La misma se evaluó como (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982):

$$Y = 0,0022 \cdot PP \cdot V + 0,009$$

donde: Y = cantidad de calor medido dependiente de la presión y del flujo (mW)

PP = presión de perfusión (mm de Hg)

V = flujo ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ )

La presión de perfusión a la entrada del calorímetro (justo antes de la cámara de perfusión) fué registrada durante todo el experimento utilizando un transductor de presión Statham P23 Db cuya señal fue recogida en uno de los cuatro canales del polígrafo Grass 5D. El flujo se mantuvo constante a lo largo de cada experimento mediante una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2.

La generación de calor asociada a cada contracción o calor activo ( $H'_a$ ) se evaluó como diferencia entre la producción de calor durante la estimulación una vez alcanzado el estado estacionario ( $H_t$ ) y la producción de calor en ausencia de estimulación ( $H_r$ ), dividiendo por la frecuencia (f) a la que el músculo fue estimulado (ver Figura 5):

$$(H_t - H_r) / f = H_a / f = H'_a$$

En resumen, este método permite un completo control de un importante número de parámetros como frecuencia de estimulación, temperatura de trabajo, composición del líquido de perfusión. Por otra parte, es posible registrar con

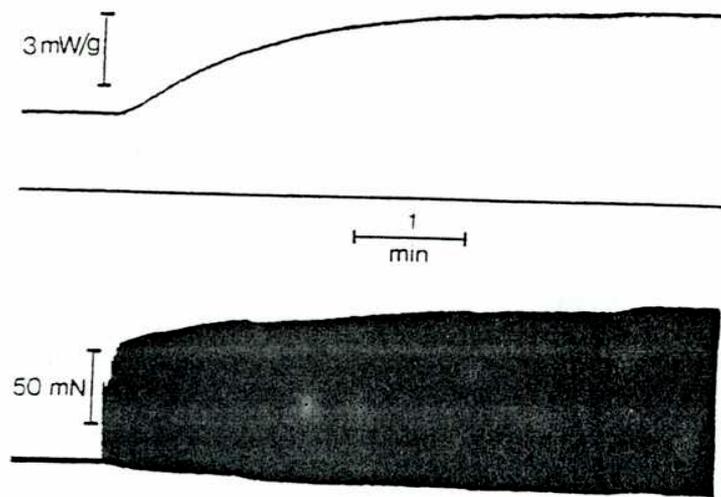


Figura 5. Registro original de los cambios en tensión y producción de calor desde la condición de reposo mecánico a la estimulación (0,5 Hz) en ventrículo de conejo. Tanto la tensión desarrollada como la producción de calor se incrementaron por alrededor de 4-5 minutos, alcanzando un estado estacionario.

tinua y simultáneamente, tensión de reposo (TR), fuerza desarrollada (T), velocidad máxima de desarrollo de fuerza ( $+\dot{T}$ ), velocidad máxima de relajación ( $-\dot{T}$ ), presión de perfusión (PP), producción de calor total ( $H_t$ ), producción de calor asociada al reposo mecánico ( $H_r$ ) y producción de calor activo ( $H_a$ ). Además de estos parámetros mecánicos y energéticos se dividió el evento contráctil en cuatro períodos como se describe en la Figura 6. Para ello, en cada condición experimental se realizaron registros con una velocidad de papel de  $50 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . De este modo pudieron ser evaluados: el tiempo transcurrido desde que se inicia el proceso contráctil hasta que la velocidad de contracción se hace máxima ( $tC_1$ ), desde que la velocidad de contracción se hace máxima hasta que la fuerza desarrollada se hace máxima ( $tC_2$ ), desde este punto hasta que la velocidad de relajación se hace máxima ( $tR_1$ ) y desde ésta última hasta que finaliza el evento contráctil ( $tR_2$ ). A partir de estos trazados a alta velocidad también pudo calcularse, por planimetría, la integral tensión tiempo (ITt).

### C. SOLUCIONES

La composición de las soluciones utilizadas para la perfusión de cada una de las preparaciones biológicas estudiadas así como la nomenclatura con las que se las identifica en cada caso están detalladas en la Tabla I. Todas las drogas empleadas en su preparación fueron de grado analítico. Cuando se trabajó en presencia de cafeína (British Drug Houses, LTD; Poole Dorset UK) esta fue agregada al medio de perfusión a partir de una solución 10% P/V, hasta alcanzar una concentración final de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . La droga fue agregada a las soluciones justo antes de cada experimento.

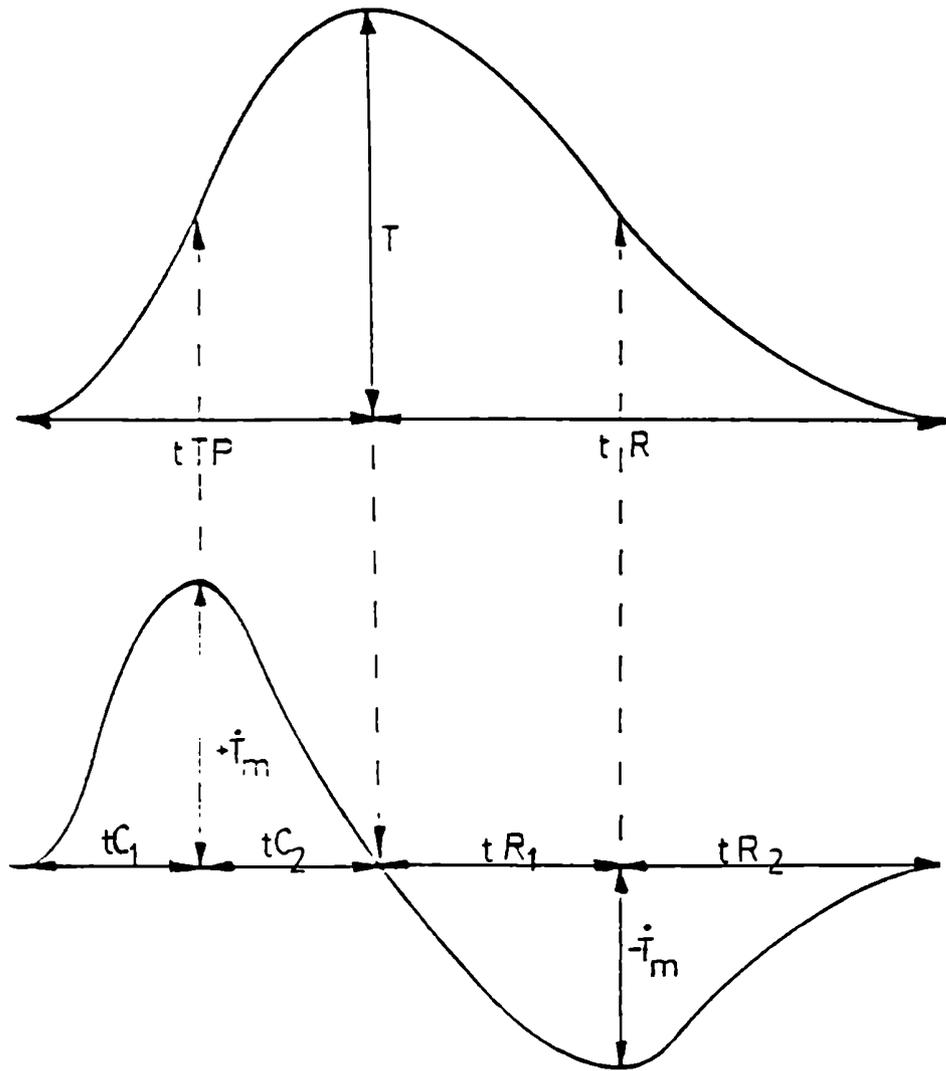


Figura 6. Representación esquemática de un trazado de tensión isométrica (parte superior) y su primera derivada (parte inferior), en donde se indican los parámetros mecánicos evaluados.  $T$ : tensión isométrica;  $+\dot{T}$ : máxima velocidad de desarrollo de la fuerza;  $-\dot{T}$ : máxima velocidad de relajación;  $t_{TP}$ : tiempo a la tensión pico, que incluye  $t_{C1}$  y  $t_{C2}$ ;  $t_{R}$ : tiempo de relajación, que abarca  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$ .

TABLA I

Nomenclatura	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Glucosa
TIC	120	6,5	1,0	1,5	0,5	25	6,0
VR	120	6,5	1,0	1,2	0,5	25	6,0
VS	95	6,0	1,0	1,0	0,5	25	6,0

Las concentraciones están expresadas en  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

TIC: Tabique interventricular de conejo

VR: Ventrículo de rata

VS: Ventrículo de sapo

## D. ESTADISTICA

Todos los ajustes que se presentan se realizaron utilizando el criterio de los cuadrados mínimos. En los casos en que se manifestaron tendencias sistemáticas sin que se pudiera definir una función de ajuste se utilizó un análisis de varianza de dos vías. El análisis "a posteriori" o cuando sólo se analizaron diferencias apareadas consistió en la aplicación de dos métodos estadísticos: la prueba de las diferencias apareadas utilizando la distribución del estadístico  $t$  y un análisis de varianza simple (ANOVA simple). En aquellos casos en que el comportamiento de la variable no era ajustable a una función lineal, como en el caso de regresiones hiperbólicas, el tratamiento estadístico de los datos experimentales consistió en linearizar la función por el sistema de recíprocas para luego utilizar el ajuste lineal de los datos transformados utilizando el criterio de los cuadrados mínimos. Las tablas utilizadas para el cálculo de probabilidades fueron las correspondientes a Dixon y Massey (1969). Se consideró significativo el nivel de  $p < 0,05$ .

A menos que se indique explícitamente, todos los resultados calorimétricos presentados están expresados por gramo de tejido seco.

RESULTADOS

## A. TABIQUE INTERVENTRICULAR DE CONEJO

Durante el período de equilibración (aproximadamente 1,5-2 hs) se establecieron las condiciones de estabilidad mecánico-energéticas de la preparación. Esto se llevó a cabo a través de la evaluación de parámetros mecánicos y calorimétricos de tal modo de asegurar condiciones estacionarias. Así, se descartaron aquellas preparaciones que no mantenían constante y superior a dos la relación entre fuerza generada (T) y fuerza diastólica (TR) cuando eran estimulados a 0,5 Hz o que no permanecían en reposo, imposibilitando la determinación del metabolismo basal.

Una vez establecidas las condiciones de estabilidad mecánico-energéticas de la preparación los músculos fueron sometidos a diversas intervenciones. En primer lugar, se varió la frecuencia de estimulación según dos patrones. En un grupo de tres experimentos la secuencia de estimulación fue: 0,5; 0,66; 0,83; 0,33 y 0,17 Hz. En otros tres experimentos se varió la frecuencia en un orden determinado por la generación de números al azar (ver Dixon y Massey, 1969). Debido a que ambos patrones de estimulación dieron los mismos resultados tanto en las determinaciones mecánicas como energéticas, los valores para cada frecuencia se promediaron. En el protocolo experimental utilizado en esta preparación, luego de variar la frecuencia de estimulación, se estableció un período de reposo durante el cual se inició la perfusión en presencia de cafeína (1 ml). Aproximadamente 10 minutos luego de la adición de la droga se reinició la estimulación del músculo siguiendo la misma secuencia que se utilizara en el período control.

El estado estacionario, en cada condición experimental (en cada frecuencia en presencia o en ausencia de cafeína), se estableció realizando las me-

diciones mecánicas y calorimétricas 15 minutos después de iniciada la nueva condición experimental. De estas mediciones, sólo fueron consideradas para su análisis aquellas que permanecieron estables por un período no inferior a los cinco minutos. La dosis de cafeína utilizada (1 mM) fué elegida, a partir de experimentos preliminares que no se presentan en este trabajo, de tal modo que cumpliera con la condición de no modificar la fuerza generada por esta preparación estimulada a una frecuencia de 0,33 Hz.

### 1. Parámetros contráctiles

De acuerdo con el protocolo experimental descrito anteriormente, se evaluaron: la fuerza desarrollada ( $T$ ), la máxima velocidad de contracción ( $+\dot{T}$ ) y la máxima velocidad de relajación ( $-\dot{T}$ ), respecto de las variaciones de la frecuencia de estimulación, en presencia y en ausencia de cafeína. En la situación control, los tres parámetros contráctiles mencionados siguieron un patrón de respuesta similar (Figura 7), incrementándose con el aumento de la frecuencia de estimulación ( $F \geq 22,5$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$ ). La respuesta inotrópica positiva obtenida por aumento de la frecuencia, aunque cuantitativamente menor, fue cualitativamente semejante en presencia de cafeína ( $F \geq 5,79$ ;  $n_1 = 4$ ;  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$ ). Como se muestra en la Figura 7, mientras que los parámetros mecánicos relacionados con la generación de fuerza,  $T$  y  $+\dot{T}$ , sólo descendieron en presencia de la droga a frecuencias superiores a 0,33 Hz,  $-\dot{T}$  disminuyó significativamente a todas las frecuencias analizadas. El descenso de estos parámetros fue más notorio a mayores frecuencias de estimulación ( $F \geq 3,58$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 25$ ;  $p < 0,05$ ). Conviene destacar que en todos los experimentos realizados con esta preparación, los músculos estimulados a 0,83 Hz en pre

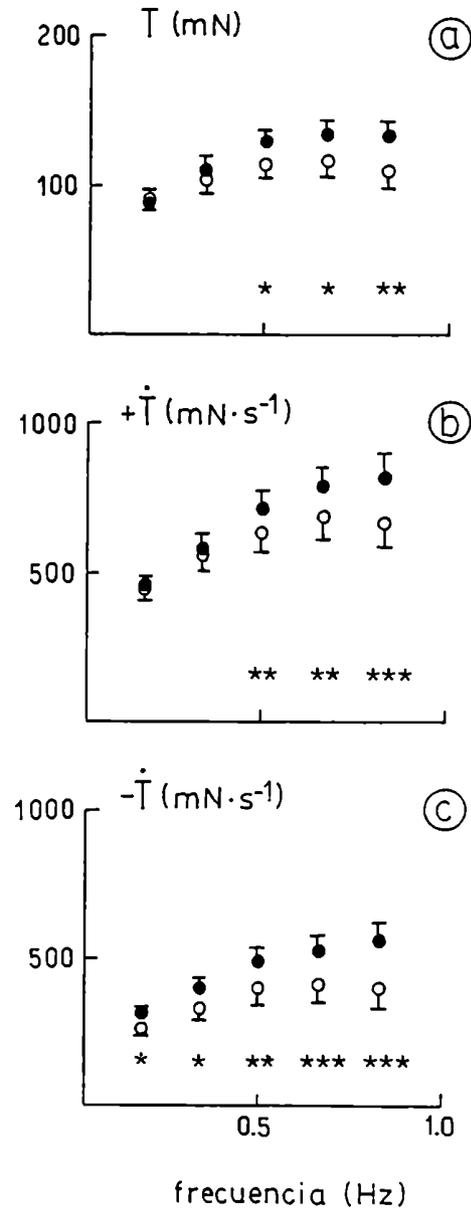


Figura 7. Respuesta contráctil del tabique interventricular de conejo a las variaciones de la frecuencia de estimulación. a) T: tensión desarrollada. b) +T: velocidad máxima de contracción. c) -T: máxima velocidad de relajación. Las barras representan + 1 error estándar para control (●) y - 1 error estándar en presencia de cafeína (○).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

sencia de cafeína no podían relajarse por completo antes de la llegada del nuevo estímulo y consecuentemente se producía un ligero incremento en la tensión diastólica (Figura 8). Si se suspendía la estimulación el músculo rápidamente se relajaba retornando a los valores diastólicos iniciales.

Es sabido que intervenciones inotrópicas de distinto origen que modifican la fuerza máxima desarrollada y la máxima velocidad de contracción, afectan simultáneamente a la máxima velocidad de relajación. Aunque el nexo entre contracción y relajación es complejo y no bien comprendido, la contractilidad y la relajación están interconectadas. Es por ello que se emplean una serie de índices que tienden a dilucidar que parte del ciclo contracción-relajación es el afectado en cada caso. Como se muestra en la Figura 9, los índices  $\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/T$  se incrementaron con el aumento de la frecuencia tanto en ausencia como en presencia de cafeína ( $F \geq 15,71$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$  para  $\dot{T}/T$  y  $F \geq 2,87$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,05$  para  $-\dot{T}/T$ ), mientras que la relación  $-\dot{T}/\dot{T}$  no se modificó ( $F \leq 0,48$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ; NS). Por otra parte,  $ITt/T$  disminuyó con el aumento de frecuencia tanto en ausencia como en presencia de la droga ( $F \geq 17,7$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$ ). La cafeína afecta comparativamente más a la relajación que a la contracción en este preparado, hecho que se pone de manifiesto en el comportamiento de los índices antes mencionados. En efecto, mientras que respecto del control la caída en la máxima velocidad de contracción estuvo principalmente adscripta a la disminución en la fuerza generada inducida por cafeína (tal que la relación entre ambas fue, a cada frecuencia, la misma tanto en ausencia como en presencia de cafeína), la caída de la máxima velocidad de relajación observada a cada frecuencia en presencia de la droga, no es explicable solamente por disminución en la fuerza generada ya que la relación entre ambas,  $-\dot{T}/T$ , fué sistemáticamente menor a todas las frecuencias estudiadas (ver

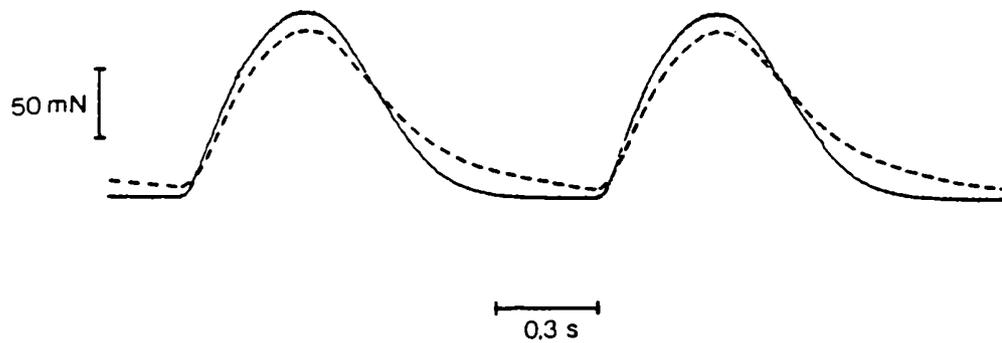


Figura 8. Registro original a alta velocidad ( $50 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de la tensión desarrollada por un tabique interventricular de conejo estimulado a  $0,83 \text{ Hz}$ . Sobre el registro control (en trazo continuo) se graficó, en forma superpuesta, el registro obtenido en el mismo músculo en presencia de cafeína  $1 \text{ mM}$  (en trazo discontinuo). Nótese la ausencia de completa relajación en presencia de cafeína debido a la prolongación de la contracción particularmente en su fase final.

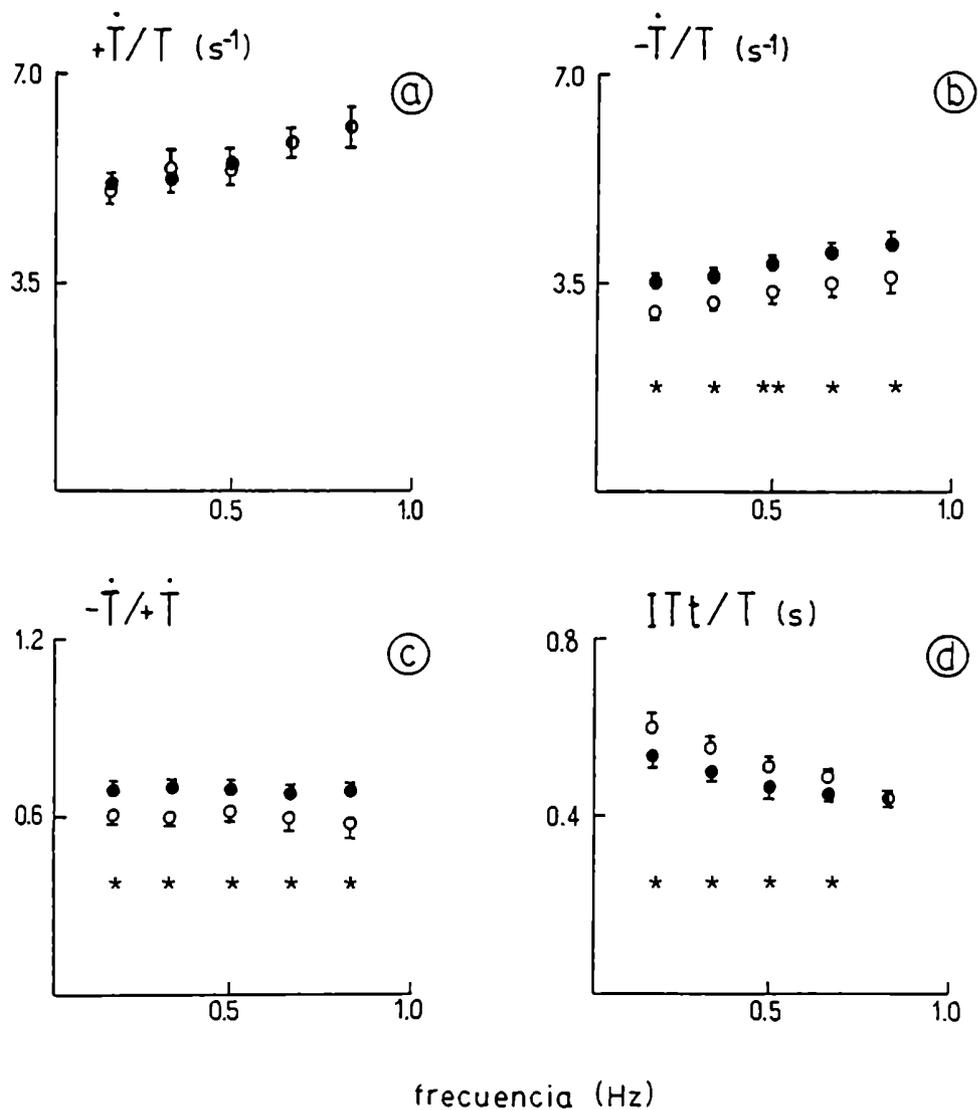


Figura 9. Cociente entre parámetros contráctiles en tabique interventricular de conejo a distintas frecuencias de estimulación en ausencia (●) y presencia de cafeína 1 mM (○). a)  $+\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de contracción y la tensión desarrollada; b)  $-\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de relajación y la tensión desarrollada; c)  $-\dot{T}/+\dot{T}$ : cociente entre máximas velocidades de contracción y relajación; d)  $ITt/T$ : relación entre la integral tensión-tiempo y la tensión desarrollada. Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estandar de la media.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  para las diferencias apareadas (cafeína-control).

Figura 9). A la misma conclusión se llega analizando el índice  $-\dot{T}/\dot{T}$ , que se comportó en forma similar a la relación  $-\dot{T}/T$ .

El análisis de la duración de las distintas fases del evento contráctil mostró (Figura 10) que el acortamiento en el tiempo total de la contracción ( $t_{TC}$ ) inducido por el aumento de la frecuencia de estimulación estuvo asociado a una disminución en el tiempo a la tensión pico ( $t_{TP}$ ) y en el tiempo de relajación ( $t_R$ ), tanto en ausencia como en presencia de cafeína ( $F \geq 7,68$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$  para  $t_{TC}$ ;  $F \geq 10,8$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$  para  $t_{TP}$  y  $F \geq 5,87$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$  para  $t_R$ ). Por otra parte, la cafeína prolongó la contracción sin alterar el tiempo a la tensión pico a todas las frecuencias analizadas (ver Figura 10). Cuando se analizaron las cuatro fases del evento contráctil como se detalló en Métodos, se observó que la disminución en el  $t_{TP}$  y en el  $t_R$  inducida por el aumento de la frecuencia estuvo adscrita a un acortamiento del  $t_{C_1}$  y del  $t_{R_2}$  respectivamente, tanto en ausencia como en presencia de cafeína ( $F \geq 8,26$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ,  $p < 0,01$  para  $t_{C_1}$  y  $F \geq 5,63$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$  para  $t_{R_2}$ ). Además, la prolongación en la duración del evento contráctil en presencia de cafeína estaba asociada a un enlentecimiento de la relajación y más específicamente a la segunda fase de la misma ya que la duración de ninguna de las dos fases de la contracción ( $t_{C_1}$  y  $t_{C_2}$ ) ni la duración de la primera fase de la relajación ( $t_{R_1}$ ) fueron afectadas por la droga (Tabla II).

## 2. Parámetros energéticos

Simultáneamente con los parámetros contráctiles antes mencionados se evaluaron: la producción de calor total por latido ( $H'_t$ ), la producción de calor

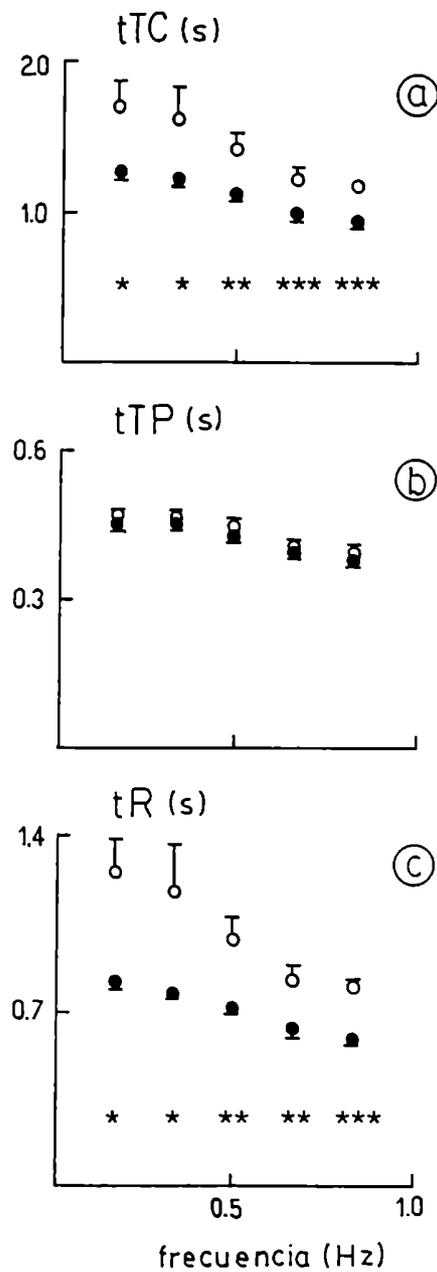


Figura 10. Duración de distintas fases del evento contráctil en el tabique interventricular de conejo en función de la frecuencia de estimulación. a) t $\dot{T}C$ : tiempo total de la contracción; b) t $\dot{T}P$ : tiempo a la tensión pico; c) t $\dot{T}R$ : tiempo de relajación. Las barras verticales representan -1 error estandard para el control (●) y +1 error estandard en presencia de cafeína (○).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  para diferencias apareadas (cafeína-control)

TABLA II. Efecto de la cafeína sobre los distintos períodos en que se dividió el evento contráctil a varias frecuencias de estimulación en ventrículo de conejo.

Períodos (s)	Frecuencia (Hz)				
	0,17	0,33	0,50	0,67	0,83
tTC <sub>control</sub>	1,278 ± 0,031	1,232 ± 0,030	1,141 ± 0,020	1,028 ± 0,048	0,976 ± 0,016
tTC <sub>cafeína</sub>	1,728 ± 0,170*	1,655 ± 0,188*	1,436 ± 0,075**	1,234 ± 0,078**	1,200**
△tC <sub>1</sub>	0,007 ± 0,013	0,010 ± 0,007	0,013 ± 0,011	0,005 ± 0,006	0,006 ± 0,004
△tC <sub>2</sub>	0,009 ± 0,016	0,003 ± 0,011	0,010 ± 0,016	0,001 ± 0,005	0,002 ± 0,011
△tR <sub>1</sub>	0,016 ± 0,010	0,006 ± 0,012	0,006 ± 0,010	0,002 ± 0,004	0,009 ± 0,011
△tR <sub>2</sub>	0,419 ± 0,177*	0,404 ± 0,191*	0,266 ± 0,080*	0,198 ± 0,043**	0,207 ± 0,024**

tTC: tiempo total de la contracción; △: diferencias en presencia y ausencia de cafeína; tC<sub>1</sub>, tC<sub>2</sub>, tR<sub>1</sub> y tR<sub>2</sub>: períodos en que fue dividido el evento contráctil (ver Métodos). (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,005 para las diferencias apareadas (cafeína-control).

basal ( $H_r$ ) y la producción de calor activo por latido ( $H_a'$ ), es decir ya descontado el metabolismo basal.

La producción de calor asociada al ciclo contráctil es dependiente de la fuerza desarrollada por el músculo (Gibbs y Chapman, 1979b) ya que durante el mismo la energía química es utilizada a nivel de los miofilamentos. Por lo tanto, una de las formas de evaluación de la economía muscular es el estudio del comportamiento de las relaciones entre ambos parámetros ( $H_a'/T$  y  $H_t'/T$ ). Sin embargo, se ha sugerido además que una variable de importancia es el tiempo durante el cual se mantiene el desarrollo de fuerza, por lo cual el análisis de las relaciones  $H_a'/ITt$  y  $H_t'/ITt$  serían índices apropiados para la evaluación de la economía muscular (Holubarsch, Hasenfuss, Blanchard, Alpert, Mulleri y Just, 1986). En el presente trabajo se utilizaron ambos tipos de índices.

El aumento de la frecuencia de estimulación indujo una disminución en la producción de calor total por latido que, combinado con el efecto inotrópico positivo descrito anteriormente, hizo que la relación  $H_t'/T$  disminuyera hiperbólicamente con la frecuencia de contracción ( $r=0,90$ ;  $n=30$ ;  $p<0,001$ ). Esta disminución de  $H_t'/T$  implica un aumento de la economía muscular global (Ponce-Hornos y Taquini, 1986) con la frecuencia. De igual modo, el incremento de la frecuencia de estimulación indujo una disminución en la relación  $H_a'/T$  que se correlacionó hiperbólicamente con la frecuencia ( $r=0,52$ ;  $n=30$ ,  $p<0,01$ ). Los parámetros de regresión, pendientes y ordenadas al origen obtenidas figuran en la Tabla III. Este hecho indicaría un aumento de la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación ya que se requeriría un menor consumo de energía para la generación de un dado nivel de fuerza isométrica. La presencia de cafeína 1 mM en el medio de perfusión produjo cambios cuali y cuantitativos tanto en la relación  $H_t'/T$  como en la re-

TABLA III. CONEJO

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	p
$H_t' / T$	control	0,90	$0,101 \pm 0,043$	$0,145 \pm 0,024$	0,001
	cafeína	0,84	$0,193 \pm 0,061$	$0,155 \pm 0,032$	0,001
$H_a' / T$	control	0,52	$0,180 \pm 0,027$	$0,016 \pm 0,008$	0,01
	cafeína	0,39	$0,227 \pm 0,044$	$0,018 \pm 0,013$	0,05

\*Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 30 datos experimentales.

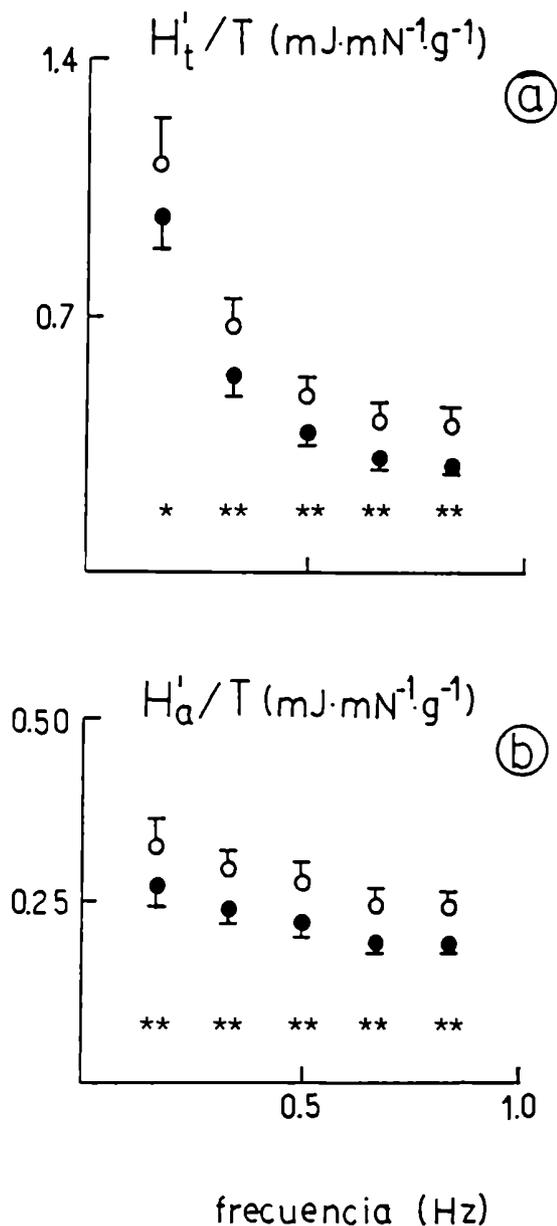


Figura 11. Comportamiento energético del septum interventricular de conejo respecto de la frecuencia de estimulación. a)  $H'_t/T$ : generación de calor por latido dividido por la fuerza generada. b)  $H'_a/T$ : generación de calor asociada al proceso de excitación-contracción-relajación dividido por la fuerza generada. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar para el control (●) y  $\pm 1$  error estándar en presencia de cafeína 1 mM (○).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,025$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

lación  $H'_a/T$  con respecto al aumento de la frecuencia de estimulación (Tabla III). Como se muestra en la Figura 11 y en la Tabla III, a todas las frecuencias analizadas  $H'_t/T$  y  $H'_a/T$  fueron significativamente mayores en presencia de cafeína. Esto implica una disminución en la economía muscular global que puede ser parcialmente explicada por una disminución en la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación. Cabe destacar que, como se muestra en la Tabla III, las pendientes de las regresiones  $H'_a/T$  versus la recíproca de la frecuencia de estimulación en presencia y ausencia de cafeína son iguales, tal que el incremento de  $H'_a/T$  inducido por cafeína fue independiente de la frecuencia de estimulación ( $F = 0,11$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 25$ ; NS). La diferencia promedio de  $H'_a/T$  para los 30 valores fue  $53,0 \pm 7,6 \mu\text{J}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Cuando se analizó la relación  $H'_t/ITt$  se observó una caída hiperbólica de este índice con el aumento de la frecuencia de estimulación (Figura 12) tanto en ausencia ( $r = 0,87$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ) como en presencia ( $r = 0,81$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ) de cafeína (ver Tabla IV). Sin embargo, la relación  $H'_a/ITt$  (Figura 12 y Tabla IV) no se modificó significativamente con la variación de frecuencia de estimulación ni en ausencia ( $r = -0,098$ ;  $n = 30$ , NS) ni en presencia de la droga ( $r = 0,016$ ;  $n = 30$ , NS). Como se muestra en la Figura 12, a todas las frecuencias analizadas  $H'_t/ITt$  y  $H'_a/ITt$  fueron mayores en presencia de cafeína. Nuevamente, estos resultados implican una disminución en la economía muscular global que puede ser parcialmente explicada por la disminución en la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación. El incremento observado del índice  $H'_a/ITt$  inducido por cafeína fue independiente de la frecuencia de estimulación ( $F = 0,70$ ;  $n_1 = 4$ ;  $n_2 = 25$ , NS). La diferencia promedio de  $H'_a/ITt$  para los 30 valores fue  $78,3 \pm 10,9 \mu\text{J}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

TABLA IV. CONEJO

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	p
$H_t' / ITt$	control	0,87	$0,325 \pm 0,089$	$0,260 \pm 0,047$	0,001
	cafeína	0,81	$0,533 \pm 0,111$	$0,247 \pm 0,058$	0,001
$H_a' / ITt$	control	-0,10			NS
	cafeína	0,02			NS

\* Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 30 datos experimentales

Los valores promedio para el índice  $H_a' / ITt$  fueron de  $0,455 \pm 0,024$  y  $0,533 \pm 0,029 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  en ausencia y presencia de cafeína respectivamente.

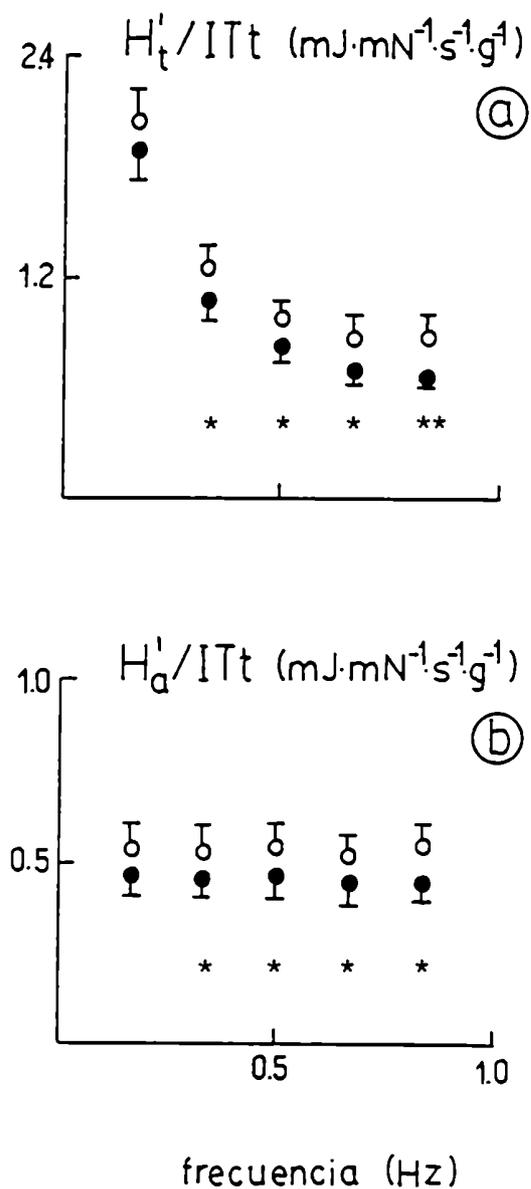


Figura 12. a)  $H'_t/ITt$ : relación entre la generación de calor total por latido y la integral tensión-tiempo; b)  $H'_a/ITt$ : relación entre la generación de calor activo por latido y la integral tensión-tiempo, en ausencia (●) y presencia de cafeína (○). Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

\*  $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,0025$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

Por otra parte, la cafeína 1 mM afectó significativamente a la producción de calor basal ( $H_r$ ) incrementándola de  $10,6 \pm 0,3 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  en situación control a  $12,2 \pm 0,5 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  (promedio de diferencias apareadas  $\pm 1$  error standard:  $1,6 \pm 0,6 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,025$ ). Este incremento de  $H_r$  inducido por cafeína contribuye a acentuar la disminución de la eficiencia muscular global ya que incrementa los valores de  $H_t$  por unidad de fuerza generada.

## B. VENTRICULO DE RATA

Los estudios realizados en el tabique interventricular de conejo indicaron que la economía muscular global se incrementaba con la frecuencia de estimulación. Por otra parte, la cafeína, que inhibe la captación de Ca por parte del RS y estimula la liberación de Ca del mismo (Weber y Herz, 1968; Fabiato y Fabiato; 1973), inducía una clara disminución en la eficiencia muscular global y en aquella asociada al proceso de excitación-contracción-relajación. Debido a que estos resultados podían estar relacionados con variaciones en la participación relativa del retículo sarcoplásmico en el evento contráctil, se realizaron experimentos en una preparación cardíaca con un mayor desarrollo del mismo. Se utilizó entonces el corazón de rata perfundido según la técnica de Langendorff como se describió en Métodos. Una vez determinada la estabilidad mecánico-energética de la preparación se estableció un período de reposo de aproximadamente 20 minutos para luego iniciar la estimulación según la secuencia 0,17; 0,33; 0,50; 0,67 y 0,83 Hz, estableciéndose finalmente un nuevo período de reposo. En todos los experimentos esta secuencia de reposo-estimulación-reposo se realizó un mínimo de dos veces con idéntico resultado. Al igual que con el septum de conejo, durante el último período de reposo se cam-

bió la solución control por una que contenía cafeína en la misma concentración que la utilizada para el tabique interventricular de conejo (1 mM). Aproximadamente 5 a 10 minutos luego del agregado de la droga se reinició la estimulación del músculo utilizando el mismo patrón que en el período control. El estado estacionario en cada condición experimental (a cada frecuencia estudiada, en presencia o en ausencia de cafeína) se estableció analizando sólo las mediciones realizadas 15 minutos después de iniciada la nueva condición experimental. De estas mediciones, sólo fueron consideradas aquellas que permanecieron estables por un período no inferior a los cinco minutos.

### 1. Parámetros contráctiles

Como se muestra en la Figura 13, se evaluaron las respuestas de la fuerza desarrollada y las máximas velocidades de contracción y relajación frente a variaciones en la frecuencia de estimulación tanto en ausencia como en presencia de cafeína. La tensión desarrollada y la máxima velocidad de contracción mostraron una respuesta inotrópica negativa con el aumento de la frecuencia de estimulación, clásica en la rata ( $F \geq 3,7$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,05$ ), mientras que la máxima velocidad de relajación permaneció inalterada en el rango de frecuencias analizadas ( $F = 0,3$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ; NS). Este patrón de respuesta fué alterado por la presencia de cafeína 1 mM, ya que, si bien la tensión desarrollada disminuyó con la frecuencia ( $F = 5,7$ ;  $n_1 = 4$ ;  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$ ), las velocidades máximas de contracción y relajación permanecieron sin cambios significativos con la variación de la misma ( $F = 1,3$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ; NS). En todos los casos las tres variables contráctiles fueron sistemáticamente inferiores en presencia de la droga respecto a la condición control (Figura 13). Con

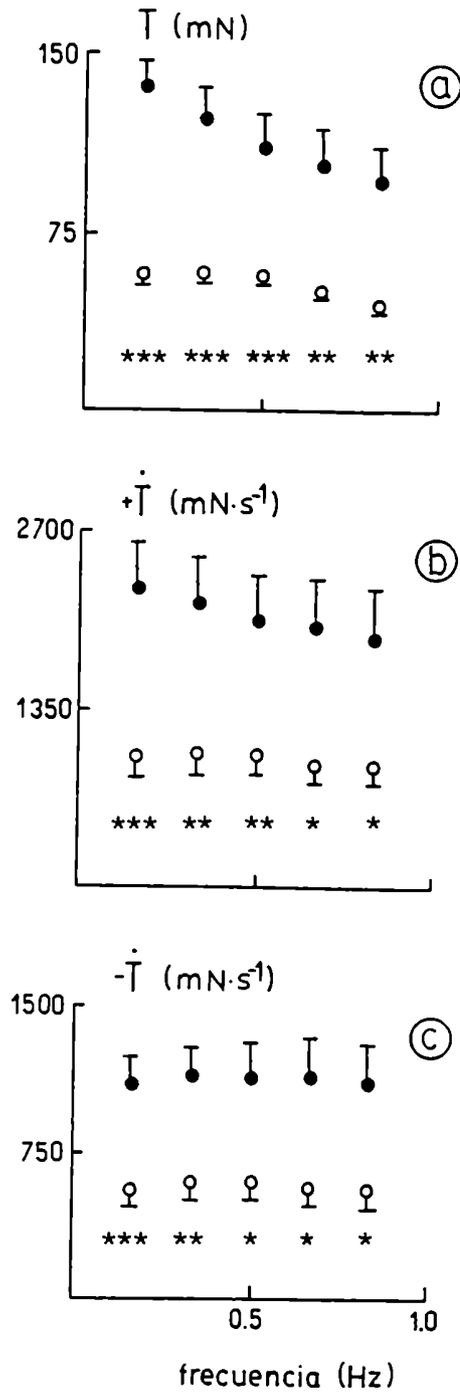
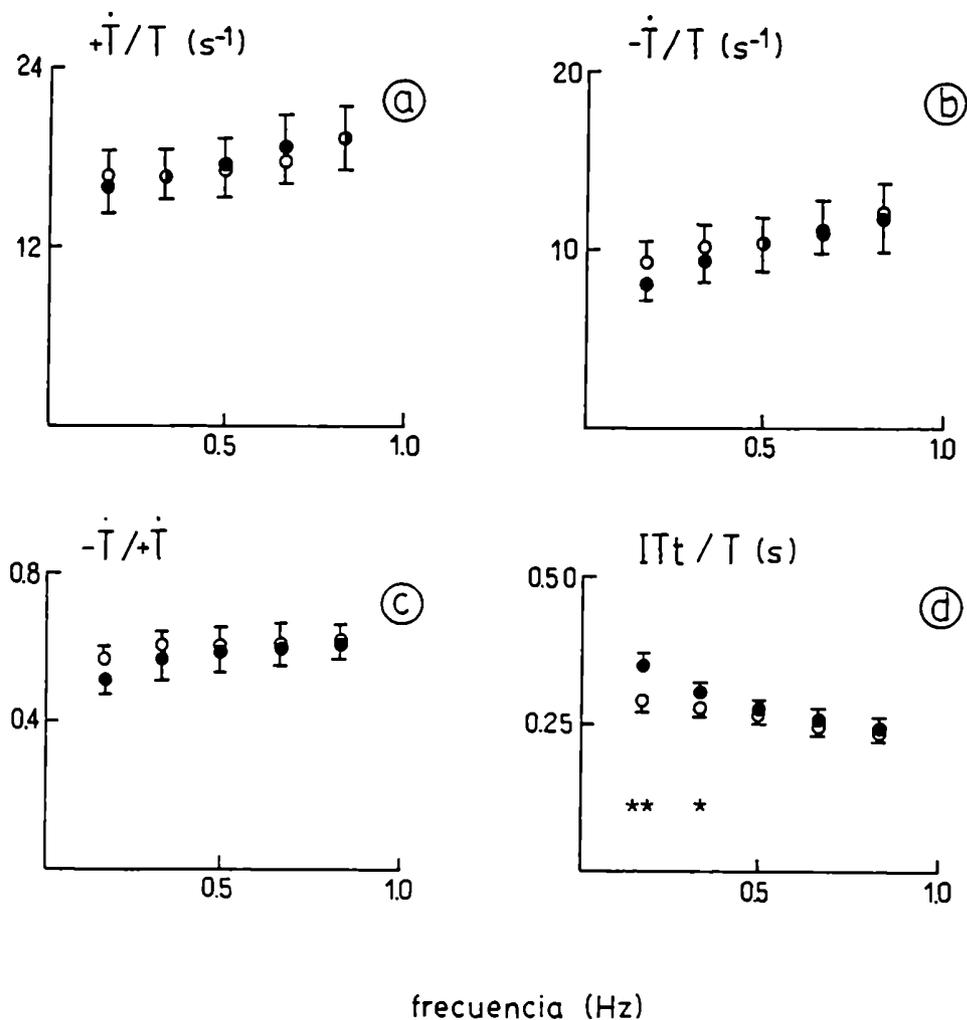


Figura 13. Respuesta contráctil del ventrículo de rata frente a las variaciones de la frecuencia de estimulación. a) T: tensión desarrollada. b) + $\dot{T}$ : velocidad máxima de contracción. c) - $\dot{T}$ : máxima velocidad de relajación. Las barras verticales representan + 1 error estándar para control (●) y - 1 error estándar en presencia de cafeína (○).

\*  $p < 0,025$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

viene destacar que, a diferencia de lo descrito para el tabique interventricular de conejo, la presencia de cafeína, en el rango de frecuencia analizado, no impedía la completa relajación en el ventrículo de rata. Como se muestra en la Figura 14, independientemente del efecto inotrópico negativo observado en condición control, las relaciones  $\dot{T}/T$ ,  $-\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/\dot{T}$  se incrementaron con la frecuencia ( $F = 5,1$ ;  $F = 7,1$  y  $F = 5,4$  respectivamente para  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ). La presencia de cafeína en el medio de perfusión no produjo cambios significativos en ninguna de las relaciones antes mencionadas. Por otra parte la relación  $ITt/T$  disminuyó con el incremento de la frecuencia tanto en ausencia como en presencia de la droga ( $F \geq 35,9$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ;  $p < 0,01$ ).

Si bien, tanto el tiempo total de la contracción, el tiempo a la tensión pico y el tiempo de relajación disminuyeron con la frecuencia tanto en ausencia ( $F = 52,2$ ;  $F = 18,2$  y  $F = 35,6$  respectivamente para  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ) como en presencia de cafeína ( $F = 19,9$ ;  $F = 22,9$  y  $F = 10,2$  respectivamente para  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ), la cafeína sólo afectó respecto del control a estos tres parámetros a la menor frecuencia, siendo el efecto un acortamiento de los mismos (Figura 15). En la situación control, con el aumento de frecuencia, la disminución del tTP estuvo adscripta a la disminución del  $tC_2$  ( $F = 6,6$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ), mientras que la disminución del tR se debió tanto a la disminución del  $tR_1$  como a la del  $tR_2$  ( $F = 98,1$  y  $F = 13,4$  respectivamente,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$   $p < 0,01$ ). Las variaciones de las distintas fases en que se dividió el evento contráctil en presencia de cafeína con respecto al control a cada frecuencia de estimulación se muestran en la Tabla V.



**Figura 14.** Cociente entre parámetros contráctiles en ventrículo de rata a distintas frecuencias de estimulación en ausencia (●) y presencia de cafeína 1 mM (○). a)  $+\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de contracción y la tensión desarrollada; b)  $-\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de relajación y la tensión desarrollada; c)  $-\dot{T}/+\dot{T}$ : cociente entre máximas velocidades de contracción y relajación; d)  $ITt/T$ : relación entre la integral tensión-tiempo y la tensión desarrollada. Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error standard de la media.

\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$  para las diferencias apareadas (cafeína-control).

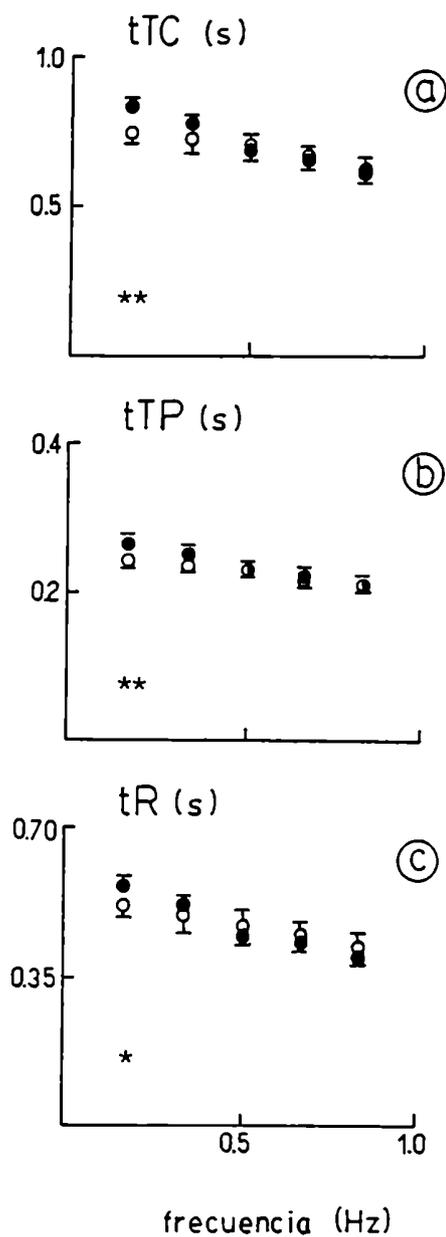


Figura 15. Duración de las distintas fases del evento contráctil en el ventrículo de rata a diferentes frecuencias de estimulación. a) tTC: tiempo total de la contracción; b) tTP: tiempo a la tensión pico; c) tR: tiempo de relajación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar para el control (●) y cafeína (○).

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,025$  para las diferencias apareadas (cafeína-control).

TABLA V. Efecto de la cafeína sobre los distintos períodos en que se dividió el evento contráctil a varias frecuencias de estimulación en ventrículo de rata.

Períodos (s)	Frecuencia (Hz)			
	0,17	0,33	0,50	0,67
tTC <sub>control</sub>	0,835 ± 0,031	0,763 ± 0,024	0,685 ± 0,022	0,663 ± 0,028
tTC <sub>cafeína</sub>	0,767 ± 0,037*	0,743 ± 0,043	0,710 ± 0,042	0,675 ± 0,032
ΔtC <sub>1</sub>	-0,003 ± 0,004	-0,005 ± 0,004	0,000 ± 0,004	-0,003 ± 0,006
ΔtC <sub>2</sub>	-0,022 ± 0,007*	-0,010 ± 0,006	-0,003 ± 0,008	-0,007 ± 0,007
ΔtR <sub>1</sub>	-0,062 ± 0,003***	-0,045 ± 0,006***	-0,017 ± 0,005**	-0,020 ± 0,004**
ΔtR <sub>2</sub>	0,018 ± 0,018	0,040 ± 0,019*	0,042 ± 0,020*	0,045 ± 0,017*
				0,040 ± 0,015*

tTC: tiempo total de la contracción; Δ: diferencias en presencia y ausencia de cafeína; tC<sub>1</sub>, tC<sub>2</sub>, tR<sub>1</sub> y tR<sub>2</sub>: períodos en que fue dividido el evento contráctil (ver Métodos). (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01; (\*\*\*) p < 0,005 para las diferencias apareadas (cafeína-control).

## 2. Parámetros energéticos

Al igual que en el caso del tabique interventricular de conejo, simultáneamente con los parámetros mecánicos antes mencionados, se evaluaron la producción de calor total por latido  $H'_t$ , la producción de calor activo por latido  $H'_a$  y la producción de calor basal o asociada al reposo mecánico  $H'_r$ . El aumento de la frecuencia de estimulación indujo una disminución en  $H'_t$  que a pesar del simultáneo efecto inotrópico negativo, hizo que la relación  $H'_t/T$  disminuyera hiperbólicamente con la frecuencia ( $r = 0,85$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ). Del mismo modo, la producción de calor activo por contracción disminuyó con el aumento de la frecuencia de estimulación, efecto que no pudo ser compensado por el simultáneo descenso en la tensión desarrollada observada, por lo que la relación  $H'_a/T$  disminuyó, correlacionándose hiperbólicamente con la frecuencia de estimulación ( $r = 0,69$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ). Los parámetros de regresión pendientes y ordenadas al origen obtenidas figuran en la Tabla VI. Este incremento en la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación (disminución de  $H'_a/T$ ) y de la eficiencia muscular global (disminución de  $H'_t/T$ ) inducidos por el aumento de la frecuencia fué significativamente alterado por la presencia de cafeína en el medio de perfusión. Como se muestra en la Figura 16, a todas las frecuencias analizadas  $H'_t/T$  y  $H'_a/T$  fueron mayores en presencia de cafeína, diferencias que se mantienen en los valores asintóticos calculados por regresión (ver ordenadas al origen en Tabla VI). Nótese que el incremento de  $H'_a/T$  inducido por cafeína es tal que, las pendientes de la regresión  $H'_a/T$  respecto de la recíproca de la frecuencia, son iguales (ver Tabla VI). Esto indica que el incremento en  $H'_a/T$  inducido por cafeína es independiente de la frecuencia de estimulación ( $F = 0,028$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 20$ ; NS) sien

TABLA VI. RATA

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	p
$H_t' / T$	control	0,85	$0,317 \pm 0,134$	$0,205 \pm 0,041$	0,001
	cafeína	0,87	$0,679 \pm 0,248$	$0,420 \pm 0,077$	0,001
$H_a' / T$	control	0,69	$0,198 \pm 0,070$	$0,063 \pm 0,021$	0,001
	cafeína	0,41	$0,479 \pm 0,154$	$0,070 \pm 0,030$	0,05

\* Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 30 datos experimentales.

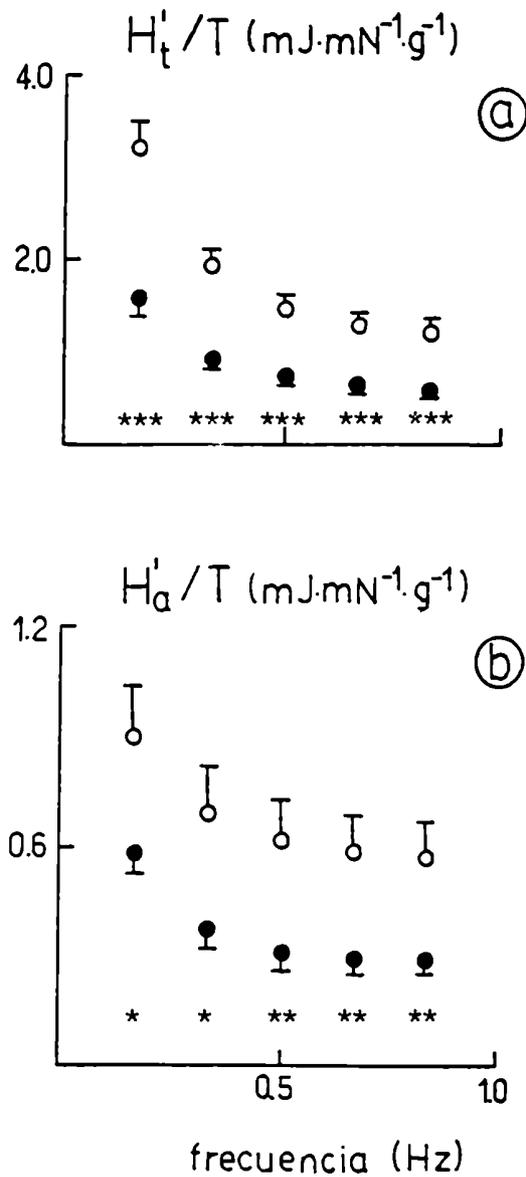


Figura 16. Comportamiento energético del músculo ventricular de rata respecto de la frecuencia de estimulación. a)  $H'_t/T$ : cociente entre la generación de calor total por latido y la fuerza generada; b)  $H'_a/T$ : cociente entre la generación de calor activo por latido y la fuerza generada. Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar para el control (●) y  $\pm 1$  error estándar en presencia de cafeína (○).  
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,025$ ; \*\*\*  $p < 0,0025$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

do la diferencia promedio para los 30 valores de  $303 \pm 47 \mu\text{J}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

El análisis de la relación  $H'_t/\text{ITt}$  mostró una disminución hiperbólica de este índice con el incremento de la frecuencia de estimulación (Figura 17) tanto en ausencia ( $r = 0,79$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ) como en presencia ( $r = 0,90$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,001$ ) de cafeína (ver Tabla VII). Similar comportamiento se observó cuando se evaluó la relación  $H'_a/\text{ITt}$  (Figura 17 y Tabla VII) tanto en ausencia ( $r = 0,55$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,01$ ) como en presencia de la droga ( $r = 0,37$ ;  $n = 30$ ,  $p < 0,05$ ). Como se muestra en la Figura 17, a todas las frecuencias analizadas  $H'_t/\text{ITt}$  y  $H'_a/\text{ITt}$  fueron mayores en presencia de cafeína, indicando una disminución en la economía muscular global que puede ser parcialmente explicada por la disminución en la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación. El incremento observado del índice  $H'_a/\text{ITt}$  inducido por cafeína fue independiente de la frecuencia de estimulación ( $F = 0,11$ ;  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 25$ ; NS). La diferencia promedio de  $H'_a/\text{ITt}$  para los 30 valores fue  $1,21 \pm 0,13 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Por otra parte, la producción de calor asociada al reposo mecánico  $H_r$ , que en condición control fue de  $20,9 \pm 0,3 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ , se incrementó significativamente en presencia de cafeína ( $3,0 \pm 0,6 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,0025$ ) lo que contribuye a acentuar la disminución de la eficiencia muscular global.

### C. VENTRICULO DE SAPO

Los resultados presentados hasta aquí indicaron que la eficiencia muscular global se incrementaba con la frecuencia de estimulación independientemente de la especie en estudio. Es interesante destacar que esto sucede aún en dos especies cuya respuesta inotrópica a la frecuencia es opuesta (inotró-

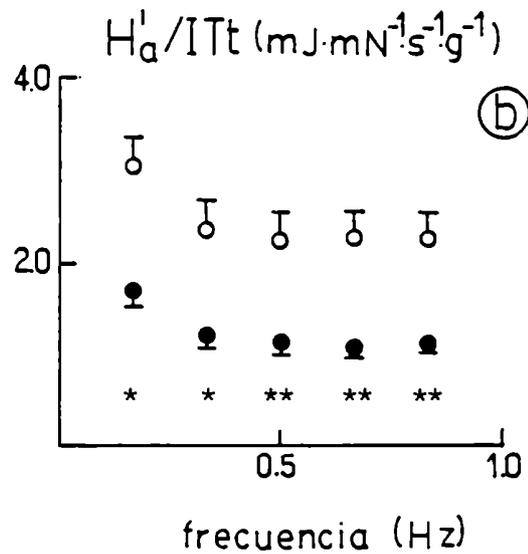
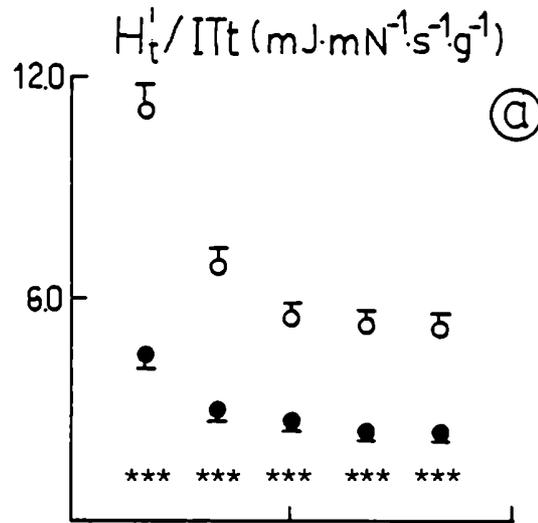


Figura 17. a)  $H'_t/ITt$ : cociente entre la generación de calor total por latido y la integral tensión-tiempo; b)  $H'_a/ITt$ : relación entre la generación de calor activo por latido y la integral tensión-tiempo, en ausencia (●) y presencia de cafeína (○). Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media.  
 \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

TABLA VII. RATA

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	P
$H_t^i / ITt$	control	0,79	$1,781 \pm 0,359$	$0,441 \pm 0,110$	0,001
	cafeína	0,90	$3,315 \pm 0,616$	$1,274 \pm 0,190$	0,001
$H_a^i / ITt$	control	0,55	$0,932 \pm 0,182$	$0,116 \pm 0,056$	0,01
	cafeína	0,37	$2,011 \pm 0,426$	$0,163 \pm 0,077$	0,05

\* Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 30 datos experimentales

pica positiva para el ventrículo de conejo e inotrópica negativa para el ventrículo de rata). La cafeína también indujo cambios energéticos cualitativamente similares en ambas especies. En efecto, tanto en el ventrículo de rata como en el septum de conejo, la cafeína 1 mM indujo un incremento en la producción de calor asociada al reposo mecánico y disminuyó la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación. Como consecuencia, en ambas especies la cafeína produjo una disminución en la eficiencia muscular global.

Estos resultados están de acuerdo con posibles variaciones en la participación relativa del retículo sarcoplásmico en el proceso contráctil. Por este motivo era de interés analizar esta hipótesis, no sólo en un músculo cardíaco con relativa abundancia de retículo sarcoplásmico como el ventrículo de rata, sino también en músculo cardíaco en el que esta organela estuviese ausente o tuviera un pobre desarrollo. En consecuencia se utilizó el ventrículo de sapo, músculo cardíaco considerado como uno de los que poseen menor desarrollo del sistema retículo sarcoplásmico.

Al igual que con las dos preparaciones cardíacas ya descritas, una vez determinada la estabilidad mecánico-energética de la preparación, se estableció un período de reposo de aproximadamente 20 minutos, iniciándose luego la estimulación según la secuencia 0,08; 0,17; 0,25 y 0,33 Hz, estableciéndose posteriormente un nuevo período de reposo. Con respecto a esta preparación, debe mencionarse que el rango de frecuencia utilizado está desplazado hacia valores menores, ya que a frecuencias mayores que 0,33 Hz se observó, en experimentos preliminares, que el músculo perdía notablemente su capacidad de generar fuerza, mostrando períodos de recuperación post-estimulación más prolongados. Por otra parte, la diferencia de temperatura (22 °C) respecto de la utilizada para los músculos ventriculares de mamíferos (25 °C) obedece a que

a 22 °C (en el rango de frecuencias de estimulación estudiadas) podían asegurarse condiciones de estabilidad tales que todos los parámetros mecánicos y energéticos podían ser reproducidos en músculos perfundidos por más de doce horas.

La secuencia reposo-estimulación-reposo en ausencia y en presencia de cafeína se realizó de modo similar al utilizado para la rata. Sin embargo, debe destacarse que la llegada a estado estacionario para los cambios de estimulación tardó más que en los ventrículos de mamíferos. En efecto, una vez iniciada la estimulación se observó un incremento sostenido de los parámetros mecánicos y energéticos durante 25 a 30 minutos. En consecuencia, el estado estacionario en cada condición experimental (a cada frecuencia, en presencia o en ausencia de cafeína) se estableció analizando las mediciones realizadas 30 minutos después de iniciada la nueva condición experimental. De estas mediciones sólo se consideraron aquellas que permanecieron estables por un período no inferior a los cinco minutos. La perfusión, en presencia de cafeína 1 mM, se inició durante el último período de reposo control (posterior a los cambios de frecuencia) reiniciándose la estimulación 10 minutos después del agregado de la droga.

### 1. Parámetros contráctiles

Se evaluó, como se muestra en la Figura 18, la respuesta de la fuerza desarrollada y las máximas velocidades de contracción y relajación frente a variaciones en la frecuencia de estimulación, tanto en ausencia como en presencia de cafeína. Los tres parámetros contráctiles mencionados se incrementaron con el aumento de la frecuencia de estimulación ( $F \geq 34,7$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p <$

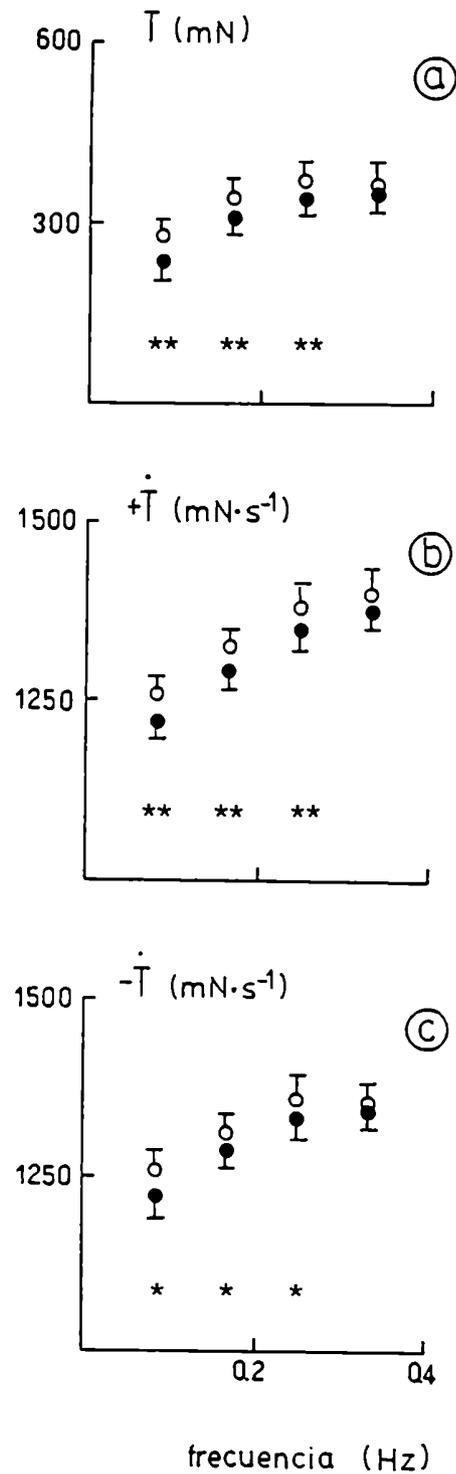


Figura 18. Respuesta contráctil del ventrículo de sapo a diferentes frecuencias de estimulación. a) T: tensión desarrollada. b)  $+\dot{T}$ : velocidad máxima de contracción. c)  $-\dot{T}$ : máxima velocidad de relajación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar para control (●) y  $\pm 1$  error estándar en presencia de cafeína (○). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,025$  para diferencias apareadas (cafeína-control).

0,01). En presencia de cafeína 1 mM el patrón de incremento de los tres parámetros contráctiles con la frecuencia fue similar al control pero significativamente mayor a 0,08; 0,17 y 0,25 Hz. Si bien a 0,33 Hz en promedio tanto  $T$  como  $+T$  y  $-T$  fueron ligeramente mayores en presencia de cafeína, a esta frecuencia las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Debe destacarse que esta respuesta inotrópica positiva a la cafeína 1 mM es contrastante con lo observado tanto en ventrículo de rata como en ventrículo de conejo para la misma dosis de la droga. Por otra parte, si bien  $\dot{T}/T$  se incrementó con la frecuencia ( $F = 3,7$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p < 0,05$ ) de igual modo que en los dos preparados antes mencionados (Figura 19), el comportamiento de los parámetros  $-\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/\dot{T}$  con el aumento de frecuencia fue diferente. En efecto, mientras que  $-\dot{T}/T$  en los músculos ventriculares de mamífero se incrementó con la frecuencia y  $-\dot{T}/\dot{T}$  se incrementó en la rata y no se alteró en el conejo, en el ventrículo de sapo  $-\dot{T}/\dot{T}$  disminuyó ( $F = 6,0$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p < 0,01$ ) y  $-\dot{T}/T$  se mantuvo constante ( $F < 1,0$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ; NS) en el rango de frecuencias analizadas (Figura 19). Ninguna de estas tres relaciones ( $\dot{T}/T$ ,  $-\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/\dot{T}$ ) se modificaron por la presencia de cafeína. Estos resultados sugieren que en el músculo ventricular de sapo, a diferencia de lo que sucede con los ventrículos de mamíferos, el incremento de la frecuencia favorecería más a la contracción que a la relajación, efecto éste no dependiente de mecanismos cafeíno-sensibles. El análisis de la duración de las distintas fases del evento contráctil mostró que el acortamiento en el tiempo total de la contracción inducido por el aumento de la frecuencia de estimulación estuvo asociado a una disminución en el tiempo a la tensión pico y en el tiempo de relajación tanto en ausencia ( $F = 26,8$ ;  $F = 31,7$  y  $F = 7,4$  respectivamente para  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p < 0,01$ ) como en presencia de cafeína ( $F = 25,3$ ;  $F = 15,3$  y  $F =$

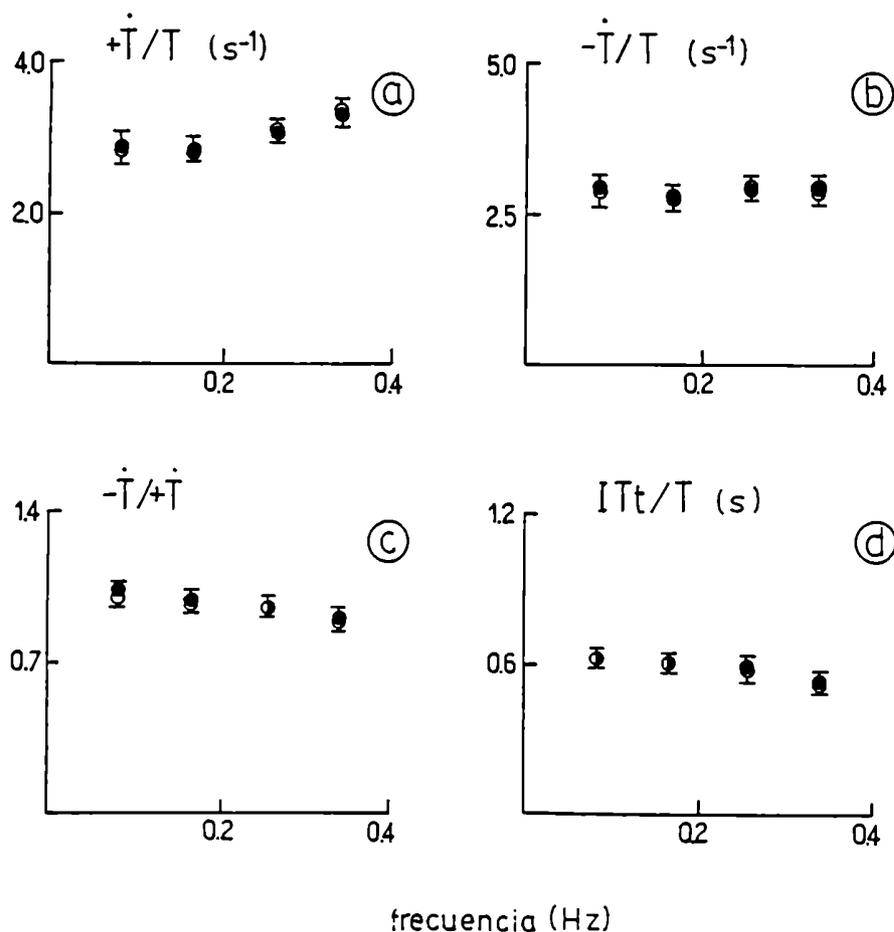


Figura 19. Cociente entre parámetros contráctiles en ventrículo de sapo a distintas frecuencias de estimulación en ausencia (●) y presencia de cafeína 1 mM (○). a)  $+\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de contracción y la tensión desarrollada; b)  $-\dot{T}/T$ : relación entre la máxima velocidad de relajación y la tensión desarrollada; c)  $-\dot{T}/+\dot{T}$ : cociente entre máximas velocidades de contracción y de relajación; d)  $ITt/T$ : relación entre la integral tensión-tiempo y la tensión desarrollada. Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error standard de la media. En ningún caso las diferencias apareadas fueron estadísticamente significativas

9,4 respectivamente para  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 20). Cuando se analizaron las cuatro fases en que se dividió el evento contráctil, se observó que la disminución en el tTP y en el tR inducida por el aumento de la frecuencia estuvo adscrita a un acortamiento del  $tC_1$ , del  $tC_2$  y del  $tR_2$  tanto en ausencia como en presencia de cafeína ( $F \geq 18,2$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ;  $p < 0,01$  para  $tC_1$ ;  $F \geq 3,4$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ,  $p < 0,05$  para  $tC_2$  y  $F \geq 5,1$ ;  $n_1 = 3$ ,  $n_2 = 21$ ,  $p < 0,01$  para  $tR_2$ ). Independientemente del acortamiento inducido por incremento de la frecuencia de estimulación en los períodos analizados, la cafeína no afectó significativamente a ninguno de ellos (Tabla VIII).

## 2. Parámetros energéticos

Simultáneamente con los parámetros mecánicos antes mencionados se evaluaron, al igual que en los tejidos ventriculares de mamífero, producción de calor total por latido  $H'_t$ , producción de calor activo por latido  $H'_a$  y producción de calor asociada al reposo mecánico  $H'_r$ .

El aumento de la frecuencia de contracción indujo en esta especie una disminución en la producción de calor total por latido que asociada al efecto inotrópico positivo hizo que la relación  $H'_t/T$  disminuyera con la frecuencia (Figura 21). Esta disminución mostró un comportamiento cualitativo semejante a lo observado para los músculos ventriculares de mamífero, correlacionándose en forma hiperbólica con la frecuencia (ver Tabla IX). La relación  $H'_a/T$ , en cambio, no se modificó con la frecuencia en el rango analizado ( $r = -0,08$ ;  $n = 32$ , NS). Esto implica que mientras la economía muscular global mejora con la frecuencia, la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación, evaluada a través de estos índices, es independiente de ella. Este

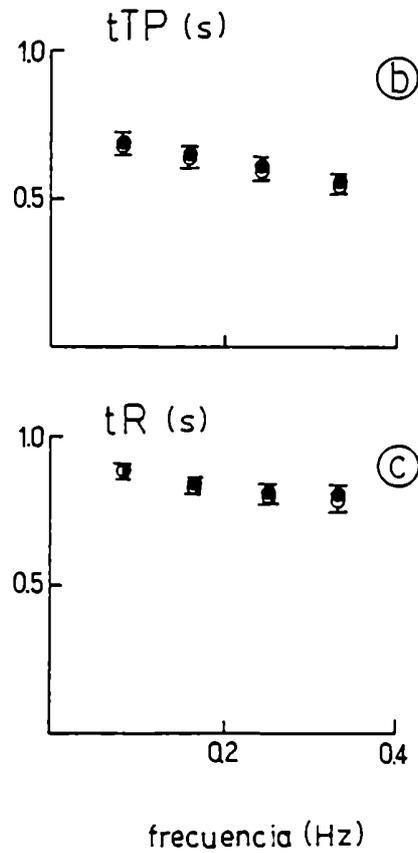


Figura 20. Duración de las distintas fases del evento contráctil en ventrículo de sapo a diferentes frecuencias de estimulación. a) tTC: tiempo total de la contracción; b) tTP: tiempo a la tensión pico; c) tR: tiempo de relajación. Las barras verticales representan + 1 error estándar para el control (●) y - 1 error estándar en presencia de cafeína 1 mM (○). En ningún caso las diferencias apareadas fueron estadísticamente significativas.

TABLA VIII. Efecto de la cafeína sobre los distintos períodos en que se dividió el evento contráctil a varias frecuencias de estimulación en ventrículo de sapo.

Períodos (s)	Frecuencia (Hz)			
	0,083	0,167	0,25	0,333
tTC <sub>control</sub>	1,579 ± 0,041	1,491 ± 0,026	1,414 ± 0,030	1,370 ± 0,022
tTC <sub>cafeína</sub>	1,563 ± 0,060	1,471 ± 0,029	1,385 ± 0,039	1,336 ± 0,036
△ tC <sub>1</sub>	-0,016 ± 0,012	-0,008 ± 0,006	-0,012 ± 0,007	-0,010 ± 0,006
△ tC <sub>2</sub>	-0,003 ± 0,016	-0,005 ± 0,011	-0,002 ± 0,011	-0,005 ± 0,007
△ tR <sub>1</sub>	-0,001 ± 0,010	0,001 ± 0,005	0,001 ± 0,005	-0,007 ± 0,006
△ tR <sub>2</sub>	0,003 ± 0,018	-0,007 ± 0,011	-0,016 ± 0,019	-0,014 ± 0,023

tTC: tiempo total de la contracción; △: diferencias en presencia y ausencia de cafeína; tC<sub>1</sub>, tC<sub>2</sub>, tR<sub>1</sub> y tR<sub>2</sub>: períodos en que fue dividido el evento contráctil (ver Métodos). En ninguno de los casos las diferencias apareadas (cafeína-control) fueron estadísticamente significativas.

TABLA IX. SAPO

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	p
$H_t' / T$	control	0,85	$0,015 \pm 0,009$	$0,020 \pm 0,04$	0,001
	cafeína	0,88	$0,024 \pm 0,008$	$0,019 \pm 0,03$	0,001
$H_a' / T$	control	-0,08			NS
	cafeína	-0,05			NS

\* Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 32 datos experimentales.

No existiendo diferencias entre cafeína y control para  $H_t' / T$  los valores fueron promediados en conjunto siendo el promedio para  $n = 64$  de  $0,048 \pm 0,002 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

es un aspecto diferencial respecto de lo observado tanto en el tabique inter\_ ventricular de conejo como en el ventrículo de rata. Más aún, como se mues- tra en la Tabla IX, la presencia de cafeína 1 mM en el medio de perfusión no afectó a la relación  $H'_t/T$  así como tampoco lo hizo con la relación  $H'_a/T$  (Figura 21). Cuando se analizó la relación  $H'_t/ITt$  se observó una caída de es- te índice que se correlacionó hiperbólicamente con el aumento de la frecuen- cia de estimulación (Figura 22) tanto en ausencia ( $r = 0,76$ ;  $n = 32$ ,  $p < 0,001$ ) como en presencia de cafeína ( $r = 0,76$ ;  $n = 32$ ,  $p < 0,001$ ) (ver Tabla X). La relación  $H'_a/ITt$  (Figura 22 y Tabla X) no se modificó significativamente con la variación de la frecuencia de estimulación ni en ausencia ( $r = 0,11$ ;  $n = 32$ , NS) ni en presencia de la droga ( $r = 0,21$ ;  $n = 32$ , NS). Como se muestra en la Figura 22, en presencia de cafeína, los valores de  $H'_t/ITt$  y  $H'_a/ITt$  fue\_ ron semejantes a los controles a todas las frecuencias analizadas.

La producción de calor asociada al reposo mecánico  $H_r$  fue afectada por la cafeína 1 mM incrementándose de  $3,71 \pm 0,18 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  en situación control a  $4,46 \pm 0,16 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  (promedio de diferencias apareadas  $\pm 1$  error standard:  $0,75 \pm 0,21 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ;  $n = 8$ ;  $p < 0,005$ ). Cabe destacar que el incremento de  $H_r$  observado con cafeína (efecto negativo sobre la eficiencia muscular global) se ve compensada por el efecto inotrópico positivo de la droga tal que las re\_ laciones  $H'_t/T$  y  $H'_t/ITt$  no se modificaron respecto del control.

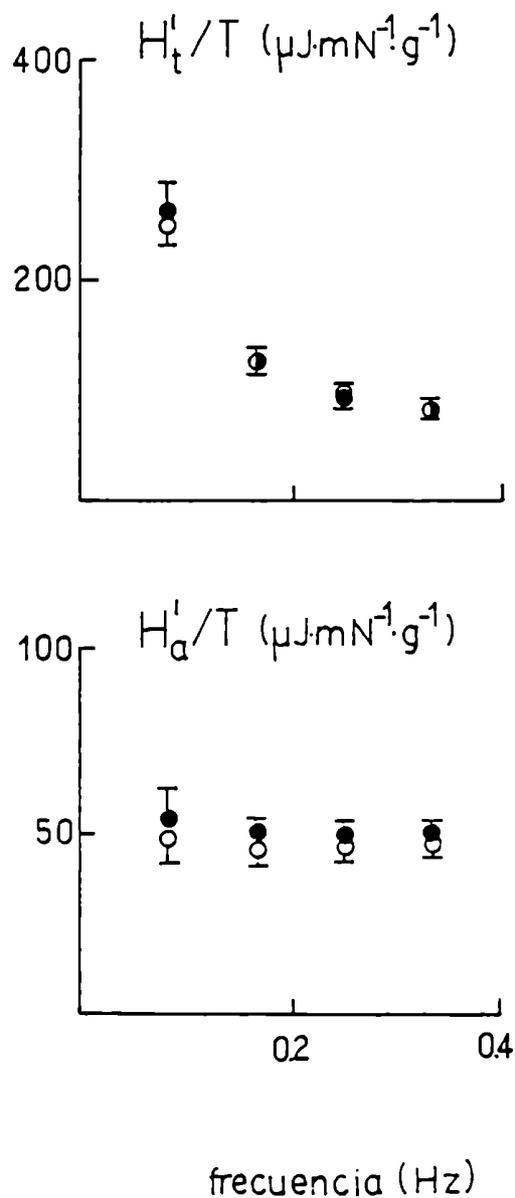


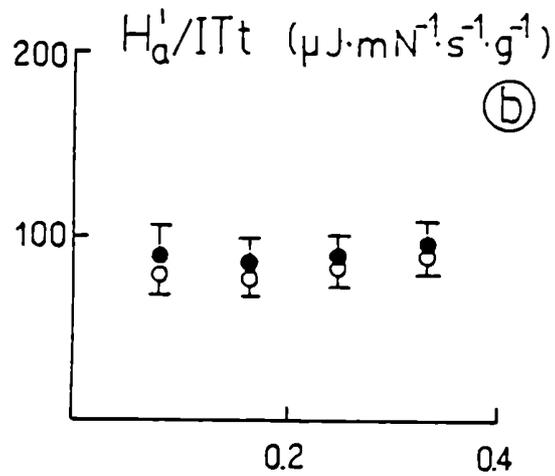
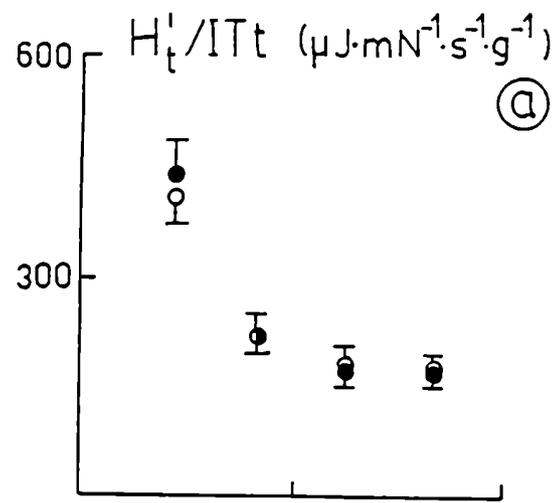
Figura 21. Comportamiento energético del músculo ventricular de sapo respecto de la frecuencia de estimulación. a)  $H'_t/T$ : generación de calor total por latido dividido por la fuerza generada. b)  $H'_a/T$ : generación de calor asociada al proceso de excitación-contracción-relajación por latido dividido por la fuerza generada. Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar para control (●) y cafeína(o). En ningún caso las diferencias apareadas fueron estadísticamente significativas.

TABLA X. SAPO

	n	r	ordenada al origen* ( $\text{mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	pendiente* ( $\text{mW} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	p
$H'_t/\text{ITt}$	control	0,76	$0,055 \pm 0,036$	$0,031 \pm 0,008$	0,001
	cafeína	0,76	$0,077 \pm 0,030$	$0,027 \pm 0,007$	0,001
$H'_a/\text{ITt}$	control	-0,10			NS
	cafeína	0,02			NS

\* Parámetros de regresión  $\pm 1$  intervalo de confianza para 32 datos experimentales.

No existiendo diferencias entre cafeína y control para el índice  $H'_a/\text{ITt}$  los valores fueron promediados en conjunto, siendo el promedio para  $n = 64$  de  $0,088 \pm 0,004 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .



frecuencia (Hz)

Figura 22. a)  $H'_t/ITt$ : cociente entre la generación de calor total por latido y la integral tensión-tiempo; b)  $H'_a/ITt$ : relación entre la generación de calor activo por latido y la integral tensión-tiempo, en ausencia (●) y presencia de cafeína (○). Los datos son valores medios y las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media. En ningún caso las diferencias apareadas (cafeína-control) fueron estadísticamente significativas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

## 1. Introducción.

Si bien se esta de acuerdo que el Ca proveniente del medio extracelular es fundamental en la contracción muscular cardíaca, la participación relativa frente a otras fuentes de Ca potencialmente capaces de acumular y/o liberar Ca para la contracción es materia de debate. Además de la participación del Ca extracelular libre y particularmente el asociado al sarcolema (Langer, 1986), se reconoce al retículo sarcoplásmico como un sistema capaz no sólo remover Ca durante el ciclo contracción-relajación sino también como un sistema capaz de liberarlo. La participación de esta organela a través del mecanismo "Ca induce la liberación de Ca" ha sido principalmente sostenido por Fabiato y colaboradores (Fabiato, 1981a; Fabiato, 1985). Sin embargo el grado de participación mecánico-energética de esta organela en el proceso de excitación-contracción-relajación y en el mantenimiento del estado de reposo mecánico en músculo cardíaco no está aún establecido.

La utilización de una u otra de las distintas vías existentes tanto para la entrada como para la remoción del calcio citosólico implica diferencias energéticas vinculadas con la economía o la eficiencia con que el músculo es capaz de generar fuerza. Así por ejemplo, la entrada de Ca por los llamados canales lentos implica una disminución del gradiente electroquímico con la consiguiente pérdida neta de energía potencial almacenada en el mismo, mientras que la entrada de Ca en intercambio por sodio conduce a una menor pérdida de energía potencial pues parte de esta se recupera como gradiente electroquímico de sodio. El mismo tipo de análisis puede realizarse en relación con los mecanismos asociados a la remoción de Ca ya que dependiendo del mecanismo involucrado, diferente será el gasto de energía química (en forma de ATP) requerida para efectuar dicho trabajo. Debi-

do a que la movilización de Ca esta indisolublemente ligada tanto a la generación de fuerza como al consumo de energía, la evaluación conjunta y simultánea de estos parámetros se presenta como un enfoque necesario para el mejor entendimiento de la compartimentalización del Ca en general y del papel relativo del retículo sarcoplásmico en particular. Con tal objeto, se realizaron evaluaciones miotérmicas y mecánicas simultáneas en preparaciones cardíacas de distintas especies, a las que se sometió a variaciones en la frecuencia de estimulación (alterando de este modo el estado inotrópico de las mismas) y a la presencia de cafeína conocido bloqueante de la actividad del sistema retículo sarcoplásmico (Shine y Langer, 1971; Bers, 1985). Respecto de esto último, el hecho que la cafeína disminuya la captación de Ca por el RS (Weber y Herz, 1968; Shine y Langer, 1971) e induzca la liberación del mismo desde el RS (Thorpe, 1973; Fabiato y Fabiato, 1978) lleva a una depleción del contenido de Ca en esta organela. Debe también tenerse en cuenta que la cafeína, además de sus marcados efectos sobre el RS, incrementa la entrada de Ca transarcolemal durante el potencial de acción lo que se ha atribuido a su acción inhibitoria sobre la fosfodiesterasa (Blinks, Olson, Jewell y Braveny, 1972; Kolhardt, Kubler y Hansi, 1974; Di Genaro y Vasalle, 1984) y aumenta la sensibilidad al Ca de la maquinaria contráctil (Fabiato, 1981b; Wendt y Stephenson, 1983). Este último efecto ha sido observado a dosis superiores a 10 mM (Blayney, Thomas, Muir y Henderson, 1978; Wendt y Stephenson, 1983). En consecuencia, los efectos de la cafeína sobre la contractilidad encontrados en los experimentos presentados, deberán analizarse teniendo en cuenta el efecto relativo de la droga sobre la liberación desde reservorios intracelulares respecto de su influencia en la entrada de Ca. Las diferentes preparaciones biológi-

cas utilizadas fueron escogidas teniendo en cuenta la abundancia relativa de retículo sarcoplásmico (rata > conejo > sapo) (Langer, 1973; Page, 1978; Blayney, 1983).

En los párrafos que siguen, se discutirán los resultados obtenidos en las distintas preparaciones biológicas en cuanto a su comportamiento mecánico correlacionándolo con los resultados miotérmicos obtenidos en cada una de ellas en presencia y en ausencia de cafeína, de tal modo de evaluar la participación relativa del RS tanto en el mantenimiento del estado relajado (reposito mecánico) como durante el evento contráctil.

## 2. Comportamiento mecánico.

Cambios en la frecuencia de estimulación inducen cambios en el estado inotrópico del músculo cardíaco que son diferentes dependiendo de la preparación en estudio. A este respecto, es conocido que el incremento de la frecuencia de estimulación está asociado con un efecto inotrópico positivo (aumento de  $T$  y  $\dot{T}$ ) en corazones de anfibios y en la mayoría de los corazones de mamíferos (Koch-Wesser y Blinks, 1963; Henderson, Brutsaert, Parmley y Sonneblick, 1969). Contrariamente, el corazón de rata exhibe una respuesta inotrópica negativa frente al incremento de la frecuencia de contracción (Hoffman y Kelly, 1959; Langer, 1978). El mismo comportamiento frente a la frecuencia ha sido observado recientemente en miocitos aislados de distintas especies, por lo que la relación fuerza-frecuencia es un mecanismo propio del miocito para el control de la fuerza que desarrolla (Capogrossi, Kort, Spurgeon y Lakatta, 1986) y no es atribuible a la interacción celular que existe en el tejido. Los efectos producidos por la variación en la frecuencia de estimulación en el desarrollo de fuerza contráctil en estado es-

tacionario, que se presentan en esta tesis están de acuerdo con estudios previous. A pesar de las diferentes respuestas que mostraron tanto  $T$  como  $+\dot{T}$  en las tres especies, el comportamiento de la relación entre ambas ( $+\dot{T}/T$ ) fue uniforme, incrementándose en todas ellas. Esto indica que la velocidad con que el Ca es puesto a disposición de la maquinaria contráctil para generar fuerza es mayor a frecuencias mayores. La presencia de cafeína 1 mM en el medio de perfusión, que indujo marcado inotropismo negativo en la rata, inotropismo positivo en ventrículo de sapo y ningún cambio o inotropismo negativo en ventrículo de conejo dependiendo de la frecuencia, no alteró la relación  $+\dot{T}/T$ . Esto sugiere que, independientemente de la especie y, por ende, de que el efecto de la droga sea inotrópico positivo o negativo, estos índices relacionados con la generación de fuerza son afectados en forma paralela. Por el contrario, tanto  $-\dot{T}/T$  como  $-\dot{T}/+\dot{T}$ , índices que analizan el comportamiento de los procesos asociados a la relajación respecto de aquellos relacionados con la contracción (Kapelko, Gorina y Novikova, 1982; Mattiazzi, Garay y Cingolani, 1986), mostraron comportamientos diferentes en las tres especies. Este comportamiento disímil se observó tanto respecto a las variaciones de frecuencia como a los efectos inducidos por la cafeína, pero están de acuerdo con el distinto grado de desarrollo del RS interespecie. Mientras que en ventrículo de sapo  $-\dot{T}/T$  no se modificó con la frecuencia, por lo que en términos relativos la velocidad con que el músculo se relaja respecto a la fuerza alcanzada no sufre modificaciones, en los ventrículos de mamífero esta relación se incrementó a frecuencias mayores. Por otra parte, mientras que en ventrículo de sapo y de rata las relaciones  $-\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/+\dot{T}$  no fueron alteradas en presencia de cafeína, en ventrículo de conejo estas relaciones disminuyeron a todas las frecuencias ana-

lizadas. Esto sugiere que, en el ventrículo de conejo, la relajación sería más dependiente de mecanismos cafeína-sensibles que la generación de fuerza. El hecho que, en el ventrículo de rata, la fuerza generada disminuya sensiblemente con la cafeína sin que se observen cambios significativos de la relajación para esa fuerza generada ( $-\dot{T}/T$  constante) sugiere que, al menos frente a una oferta de Ca disminuída, los mecanismos encargados de la remoción del mismo son capaces de realizar esta tarea en forma efectiva. Por lo tanto puede inferirse que en ventrículo de rata la generación de fuerza sería más dependiente de mecanismos cafeína-sensibles que en ventrículo de conejo. Esto está de acuerdo con que el mecanismo de "Ca induce liberación de Ca por el RS" tiene un menor umbral de disparo en la rata respecto al conejo, de lo que se ha sugerido que el ventrículo de conejo sería más dependiente del Ca extracelular para generar fuerza que el ventrículo de rata (Fabiato, 1981). Los resultados se ajustarían a un modelo general en el que, en el caso de la rata, la presencia de cafeína en estado estacionario disminuiría la oferta de Ca por parte del RS, ya que al aumentar la liberación de Ca e inhibir la captación conduciría finalmente a la depleción de la organela. Habiendo menos Ca para ser removido (por una menor contribución del RS), el efecto negativo de la cafeína sobre la relajación (sobre la remoción de Ca citosólico) sería menos evidente y podría ser completada (aunque como se discutirá mas adelante, con un mayor costo energético). En el ventrículo de conejo, en el que la generación de fuerza sería más dependiente del Ca proveniente del medio extracelular que en la rata, pero que dependería en forma significativa del RS para la remoción de Ca citosólico, el efecto mecánico de la cafeína sería entonces comparativamente más importante sobre la relajación que sobre la contracción. Nótese, que a frecuencias elevadas, el ventrículo de conejo pierde su capacidad de completa relajación (Figura 8). Fi-

nalmente, la virtual ausencia de RS en ventrículo de sapo, en el que no se observa significativa liberación de Ca por Ca (Fabiato y Fabiato, 1978), tal que las vesículas de retículo existente probablemente actúen como sistema buffer del Ca citosólico, explica por si misma la ausencia de cambios en la relación  $-\dot{T}/T$  o  $-\dot{T}/+T$  con cafeína. El leve inotropismo positivo observado en ventrículo de sapo (0-20% dependiendo de la frecuencia), es posible que esté asociado con el efecto de metilxantina de la cafeína, efecto cuya consecuencia es el incremento de la corriente lenta de entrada durante el potencial de acción. El hecho de que no se observe este efecto en estado estacionario en los ventrículos de mamífero (a la dosis utilizada), probablemente se deba al efecto negativo que la droga ejerce sobre el suministro de Ca por parte del RS. De este modo en ventrículo de rata la disminución en la oferta de Ca a los miofilamentos sería tan importante que superaría el efecto del incremento en la entrada de Ca, dando como resultado un efecto inotrópico negativo. En el conejo, con un desarrollo intermedio del sistema RS, se genera una respuesta inotrópica intermedia entre ventrículo de rata y sapo, es decir ausencia de cambios inotrópicos o ligero inotropismo negativo. Nótese a este respecto que el efecto inotrópico negativo en presencia de cafeína es mucho más notable en ventrículo de rata (56-49%) que en ventrículo de conejo (0-13%) dependiendo de la frecuencia.

El análisis del curso temporal del ciclo contracción-relajación en las tres especies conduce a conclusiones similares a las esbozadas anteriormente. El incremento en la frecuencia de contracción acorta la duración del evento contráctil en las tres especies, pero en ventrículo de sapo la presencia de cafeína 1 mM no produjo cambios en ninguno de los subperíodos analizados (Tabla VIII). Lo mismo sucedió con los subperíodos  $tC_1$  y  $tC_2$  en ventrí-

culos de mamífero (sólo se observó un ligero acortamiento en el  $tC_2$  en ventrículo de rata a 0,17 Hz) (ver Tablas II y V). Las diferencias más notables se observan en la relajación. Mientras que en el ventrículo de conejo el  $tR$  se prolongó significativamente en presencia de cafeína a todas las frecuencias estudiadas, en el ventrículo de rata, en cambio, este período se acortó a expensas del subperíodo  $tR_1$  a 0,17 Hz o no se modificó en presencia de la droga teniendo entonces un comportamiento similar al observado para la relación  $-\dot{T}/T$  y  $-\dot{T}/+\dot{T}$ . Esta ausencia de cambios o aún acortamiento en el  $tR$  sucede a pesar de la significativa prolongación del  $tR_2$ . En consecuencia, la ausencia de cambios o ligero acortamiento en el tiempo de relajación en el ventrículo de rata es compatible con la hipótesis de que, en esta especie la pronunciada disminución de la oferta de Ca a la maquinaria contráctil es predominante, pudiendo los mecanismos encargados de la remoción del mismo efectuar dicho trabajo en similares períodos. Por otra parte, el hecho que en ambas especies de mamíferos se observe una prolongación en la segunda fase de la relajación ( $tR_2$ ) sugiere que la presencia de cafeína afecta mecanismos que actúan en la remoción de Ca particularmente a niveles bajos de Ca citosólico.

### 3. Evaluaciones miotérmicas.

El costo energético asociado al funcionamiento global del músculo cardíaco como transductor mecánico-químico puede ser separado en dos componentes: un componente relacionado con la actividad mecánica y un componente independiente de la misma. Este último es conocido como metabolismo basal. El componente ligado a la actividad mecánica se asocia con el gasto de energía química de todos aquellos procesos que tienen lugar durante el ciclo excitación-contracción-relajación, fundamentalmente el costo ligado con la interacción de proteínas

contráctiles para generar fuerza a nivel de puentes actina-miosina y la fracción asociada al restablecimiento de gradientes iónicos mediante procesos de transporte activo.

Como ya se indicara, la producción de calor asociada al estado de reposo mecánico en músculo cardíaco ( $H_r$ ) es una medida de su metabolismo basal ya que aún cuando no sea estimulado, en el músculo tienen lugar procesos que tienen como objeto la conservación de la integridad de la composición intracelular. Aunque las bases bioquímicas del metabolismo basal no han sido establecidas inequívocamente, en la actividad de los sistemas transportadores de Na y Ca transarcolemiales, de Ca sarcoreticular y el recambio de proteínas se encuentran las fracciones más significativas del costo energético del mantenimiento del estado de reposo mecánico (Gibbs y Chapman, 1979a; Gibbs, 1986; Loiselle, 1987).

Los valores de  $H_r$  obtenidos para las preparaciones miocárdicas de mamíferos estudiadas son comparables con valores obtenidos por otros autores utilizando otras metodologías miotérmicas. Así, la producción de calor asociada al reposo mecánico en septum interventricular de conejo ( $10.6 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido seco o  $0.42 \text{ mcal.s}^{-1}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo) es comparable con los valores obtenidos previamente en nuestro laboratorio en la misma preparación, con los obtenidos en músculo papilar de conejo por Alpert y Mulieri ( $0.42 \text{ mcal.s}^{-1}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo) y el promedio de los comunicados por Gibbs y Chapman, también en músculo papilar de conejo ( $0.43 \text{ mcal.s}^{-1}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo), usando glucosa como sustrato metabólico (Gibbs y Chapman, 1979b; Alpert y Mulieri, 1982). Asimismo, los valores obtenidos de  $H_r$  en la presente tesis para ventrículo de rata ( $20.9 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido seco o  $3.7 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido húmedo) son comparables con los valores reportados por Gibbs y Loiselle ( $3.5 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido húmedo) y por Holubarsch y cola-

boradores ( $4.0 \text{ mW} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo) en músculos papilares de rata (Gibbs y Loiselle, 1978; Holubarsch, Goulette, Litten, Martín, Mulieri y Alpert, 1985). Por otra parte, esta es la primera comunicación de una evaluación miotérmica de músculo ventricular de sapo y los resultados son coherentes con una menor actividad metabólica, característica de los anfibios. Estos resultados generan entonces un espectro de metabolismos basales en el cual el músculo septal de conejo quedaría a mitad de camino entre un metabolismo elevado como el de ventrículo de rata y un metabolismo bajo como el de ventrículo de sapo ( $3.7 \text{ mW} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido seco). En la misma ubicación intermedia se encontraría el músculo papilar de ventrículo de perro (Ponce-Hornos y Taquini, 1986).

Es de interés destacar las notables diferencias existentes en el metabolismo basal de las tres especies estudiadas. A este respecto, cabe mencionar que estudios calorimétricos recientes en células aisladas de distintas especies han confirmado la existencia de tales diferencias interespecies, existiendo acuerdo con las mediciones llevadas a cabo en tejidos perfundidos o superfundidos siendo entonces las diferencias observadas propiedad inherente de cada tipo celular (Ponce-Hornos, Parker y Langer, 1989). Una posible explicación para las diferencias observadas entre los metabolismos basales de las distintas especies, estaría vinculada con las diferencias existentes en el contenido mitocondrial de las mismas (Loiselle, 1987). A este respecto se ha especulado que un componente significativo del metabolismo basal reflejaría la respuesta mitocondrial al continuo influjo de protones hacia su matriz. Esto contribuiría a elevar el metabolismo basal en aquellas especies que poseen mayor volumen mitocondrial en sus corazones (Langer, 1973; Loiselle, 1987). Por otra parte, el elevado metabolismo basal observado en ventrículo de rata podría estar vinculado con las observaciones realizadas por

Nayler y colaboradores y estudios realizados por Penpargkul y colaboradores quienes sugirieron que el RS de rata tendría menor capacidad de retener Ca y, como consecuencia, este ciclaría continuamente entre el RS y el citosol aún en ausencia de activación (Nayler, Dunnet y Burian, 1975; Penpargkul, Repke, Katz y Schener, 1977). Estudios bioquímicos llevados a cabo en vesículas de RS cardíaco aisladas de distintas especies apoyan estas observaciones ya que, aun cuando las velocidades de bombeo de Ca por parte del RS se correlacionan con la frecuencia cardíaca natural de las distintas especies, el RS de rata no retiene Ca tan efectivamente (Blayney, 1983). Nótese asimismo que el desarrollo del sistema RS es mayor en ventrículo de rata que en conejo (que a su vez es semejante a ventrículo de perro), siendo el ventrículo de sapo el que posee menor desarrollo de esta organela (Page y Niederggerke, 1972; Langer, 1973, Fabiato, 1981a).

La presencia de cafeína (1 mM) en el medio de perfusión incrementó la producción de calor basal estacionaria en las tres especies. A este respecto, Chapman y colaboradores no encontraron diferencias significativas en la producción de calor de reposo en músculos papilares de conejo expuestos a dosis de cafeína de 5 mM (Chapman, Gibbs y Loisel, 1977). La discrepancia puede deberse a que en los experimentos realizados en músculos papilares existía una contínua caída en la producción de calor de reposo (alrededor del 15% en 3 hs) durante el curso del protocolo experimental, lo que enmascararía el incremento en  $H_r$  inducido por la droga (Gibbs y Chapman, 1979a). En los resultados aquí presentados, la producción de calor basal permaneció estable durante el protocolo experimental (alrededor de 6 hs) tanto en ausencia como en presencia de cafeína. Por otra parte, Gibbs y Loisel informaron incrementos signigicativos en  $H_r$  (alrededor de  $0,7 \text{ mW} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo) en músculos papilares de

rata expuestos a elevadas concentraciones extracelulares de Ca y elevadas dosis de cafeína (10 mM) (Gibbs y Loiselle, 1978), siendo ese incremento ligeramente superior al reportado en la presente tesis ( $0.5 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido húmedo) en condiciones moderadas de exposición a la droga.

En condiciones de reposo mecánico, es probable que los sistemas de bombeo de Ca que mantienen una concentración del mismo extremadamente baja en el citosol, se encuentren trabajando por debajo de su velocidad máxima. Además los sistemas sarcolemales de extrusión de este ión tendrían una pobre participación en el mantenimiento del gradiente de Ca transarcolemal debido a la alta impermeabilidad de la membrana plasmática en condiciones de reposo. A este respecto la exposición, de músculos cardíacos de distintas especies, a variaciones de la concentración de Ca extracelular en un amplio rango, no afecta ni el consumo de oxígeno (Suga, Hisano, Goto, Yamada e Igarashi, 1983) ni la producción de calor basal (Gibbs y Loiselle, 1978; Wendt y Loiselle, 1981; Ponce-Hornos y Taquini, 1986), lo que sugeriría un menor papel de los sistemas asociados a sarcolema en el mantenimiento de los niveles de Ca intracelular en estado de reposo mecánico. Por lo tanto, el incremento en el metabolismo basal inducido por la cafeína podría ser explicado a través de un incremento en la velocidad de bombeo sarcoreticular para prevenir la contracción, ya que en presencia de la droga el RS incrementaría su pérdida basal de Ca hacia el citosol. Es de hacer notar que el incremento observado en  $H_r$  en las tres especies estudiadas se correlaciona con el grado de desarrollo de RS, ya que el incremento observado en ventrículo de rata fue el mayor ( $3.0 \pm 0.6 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido seco), el incremento en ventrículo de conejo intermedio ( $1.6 \pm 0.6 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido seco) mientras que el menor fue el observado en ventrículo de sapo ( $0.75 \pm 0.21 \text{ mW.g}^{-1}$  tejido seco).

Una vez establecidas las condiciones de longitud inicial, la fuerza generada en un latido estará fundamentalmente vinculada a la cantidad de Ca liberada en el citosol, la que deberá, posteriormente, ser removida para reestablecer las condiciones iniciales de reposo mecánico. Este proceso de excitación-contracción-relajación va acompañado de una generación de calor que refleja el costo energético de la utilización y recuperación de la energía química consumida durante el ciclo contráctil. En consecuencia, la relación entre la actividad contráctil y la producción de calor asociada a la misma puede utilizarse como una forma de evaluar la economía muscular. Esto puede ser llevado a cabo analizando el comportamiento de la relación entre la producción de calor activo ( $H'_a$ ) y la tensión desarrollada (T) en condiciones estacionarias ( $H'_a/T$ ). Este índice sería una medida del costo energético necesario para generar un dado nivel de tensión isométrica. En los músculos ventriculares de mamífero  $H'_a/T$  disminuyó significativamente con el incremento en la frecuencia de estimulación, indicando una mayor eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación (menos calor liberado por unidad de fuerza generada). Este incremento en la economía muscular observado con la frecuencia, en los ventrículos de mamíferos, se correlacionó con el aumento registrado en la relación  $\dot{T}/T$  sugiriendo, en las condiciones de temperatura y rango de frecuencia utilizado, una mejoría de la relajación respecto de la fuerza generada. Debido a que la relajación es un proceso activo con consumo de una importante fracción de la energía vinculada al proceso contráctil, una "facilitación" relativa de la relajación podría ser la clave del mejoramiento de la economía muscular antes mencionado. De acuerdo con esto está el hecho que en ventrículo de sapo  $H'_a/T$  no varía con la frecuencia de estimulación y tampoco lo hace la relación  $\dot{T}/T$ . Mientras que los re-

sultados obtenidos en la presente tesis muestran un descenso en la relación  $H'_a/T$  con la frecuencia, Gibbs y Gibson trabajando en músculo papilar de conejo (Gibbs y Gibson, 1970) y Loisel en papilar de rata (Loiselle, 1979) no observaron cambios en la relación calor-tensión por variaciones en la frecuencia de estimulación. Esta discrepancia podría deberse a las condiciones no estacionarias empleadas por estos autores. De hecho, en la metodología utilizada por ellos (Método de las termopilas, ver Introducción) la estimulación se inicia en el momento de realizar las determinaciones miotérmicas lo que obliga a promediar las 15-20 primeras contracciones y, en consecuencia, se incluye el fenómeno de escalera. A este respecto conviene destacar, además, que existe creciente información relativa al variado comportamiento contráctil que se observa luego de reposos prolongados, así como también, la influencia que tiene la duración del reposo en la evolución de los parámetros contráctiles durante los primeros latidos post-reposo (Bers, 1985; Janczewski y Lewartowski, 1986). Los resultados presentados en esta tesis, en cambio, fueron obtenidos en estrictas condiciones estacionarias y, por ende, no están contaminadas por variaciones mecánico-energéticas transitorias vinculadas con el fenómeno de escalera o con la influencia de los períodos de reposo pre-estimulación.

El incremento de la frecuencia de estimulación induce no sólo cambios en la tensión isométrica desarrollada sino que abrevia la duración del estado activo en las tres especies. Debido a que los cambios en la duración del estado activo también están vinculados a cambios en el consumo de energía, es importante establecer en que medida estas variaciones podrían estar afectando la economía muscular. Como los cambios en la tensión isométrica no necesariamente implican cambios en la duración del estado activo, otra forma a-

propia de evaluar la economía muscular es a través de la relación entre la producción de calor activo por latido ( $H'_a$ ) y la integral tensión-tiempo (ITt). En este caso, ya que la ITt cubre el período total de la actividad, la relación  $H'_a/ITt$  sería una medida del costo energético asociado al mantenimiento de la fuerza generada durante el ciclo contracción-relajación. En general, la relación  $H'_a/ITt$  no mostró cambio con la frecuencia de estimulación (sólo se elevó en ventrículo de rata a la más baja frecuencia analizada) lo que indica que los cambios en el mantenimiento de la fuerza debidos a cambios en la frecuencia se suceden con proporcional incremento de la energía consumida.

Es de interés a esta altura notar que los valores de fuerza generada presentados en esta tesis no son valores totales sino que representan un componente, proporcional a la fuerza total, que es generado en la dirección del transductor de fuerza. Este componente es semejante dentro de la misma especie y, obviamente, exactamente el mismo en cada experimento, pero variable entre especies (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982; Ponce-Hornos y Taquini, 1986). Por lo tanto es conveniente mencionar que, en los experimentos presentados, los valores absolutos de los índices evaluativos de la economía muscular no pueden ser comparados entre especies, siendo sólo válidas sus variaciones dentro de cada especie.

La presencia de cafeína en el medio de perfusión indujo disminución en la economía del proceso de excitación-contracción-relajación (tanto  $H'_a/T$  como  $H'_a/ITt$  se incrementaron) en ambas especies de mamífero, siendo este efecto independiente de la frecuencia a la que fueron sometidos. Es de destacar que este último hecho es observado en dos especies con respuestas opuestas frente a variaciones de la frecuencia de estimulación (inotrópica

positiva en el conejo e inotrópica negativa en la rata). Esto sugiere que el efecto de la cafeína sobre la economía muscular no es dependiente de los mecanismos involucrados en los cambios inotrópicos dependientes de la frecuencia de estimulación.

La disminución en la eficiencia del proceso contráctil inducido por la cafeína en ventrículos de mamífero está de acuerdo y apoya al modelo antes planteado para la interpretación de los resultados contráctiles. En efecto, es conocido que la bomba de Ca asociada al RS remueve a este ión con una estequiometría de 2 Ca/ATP que consume, mientras que la bomba de Ca asociada a sarcolema extruye 1 Ca/ATP consumido (Weber, Herz y Reiss, 1966; Caroni y Carafoli, 1981; Tada e Inui, 1983; Carafoli, 1987). El sistema de intercambio NaCa extruye 1 Ca por cada 3 Na que ingresan a la célula (Langer, 1982; Reeves y Hale, 1984) los que al ser removidos por la bomba de Na-K, con utilización de 1 ATP por cada 3 Na, lleva al consumo de 1 ATP por cada Ca intercambiado por Na. Al inhibir con cafeína la captación de Ca por el RS, el Ca utilizado para la contracción deberá ser removido por otros mecanismos, menos eficientes, como la bomba de Ca de sarcolema, el intercambiador NaCa, o ambos. La actividad de estos mecanismos hace posible la relajación pero con un costo energético más elevado. Nótese que no sólo el proceso se enlentece sino que, aún considerando la consecuente prolongación del estado activo, el proceso es menos eficiente ( $H'_a/ITt$  se incrementa). Cabe agregar que la limitación de estos sistemas para reemplazar al RS se manifiesta particularmente en el caso de ventrículo de conejo. En éste, siendo la generación de fuerza más dependiente del Ca proveniente del medio extracelular, la oferta de Ca a los miofilamentos esta menos afectada (entre 0 y 18%) que en la rata (entre 49 y 56%), haciendo entonces crítica la ope-

ratividad de los mecanismos responsables de la remoción de Ca citosólico. Como consecuencia de este efecto asimétrico, a frecuencias de estimulación relativamente elevadas (aumento de la exigencia de la remoción de Ca citosólico) la relajación no podría completarse (ver Figura 8). El pobre desarrollo del RS en ventrículo de sapo explicaría la ausencia de efecto de la cafeína sobre la economía del proceso de excitación-contracción-relajación. En ventrículo de rata, el efecto inotrópico negativo (la disminución de la oferta de Ca a los miofilamentos) compensaría la inhibición de la remoción del mismo, haciendo posible la completa relajación pero con la participación de mecanismos menos eficientes ya que la economía del sistema se ve disminuida.

En resumen, en los casos en que el sistema más eficiente debe ser reemplazado, la remoción del Ca remanente deberá realizarse con menos eficiencia. Por ello, si esta fracción remanente es alta la relajación se realizará con menos eficiencia y aún podría no completarse (como en el septum de conejo), mientras que si la fracción remanente es baja, el reemplazo por los sistemas menos eficientes alcanzaría para completar el proceso, aunque siempre con un mayor costo energético.

La disminución de la economía muscular global (evaluada a través de las relaciones  $H'_t/T$  o  $H'_t/ITt$ ), observada en las tres especies con el incremento de la frecuencia, implica necesariamente un mejor aprovechamiento del metabolismo basal. Esto se ve potenciado en el ventrículo de rata cuyo metabolismo basal es el más elevado, tal que a pesar de la disminución de la fuerza generada la eficiencia muscular global se incrementa marcadamente con la frecuencia (comparar las pendientes de las regresiones obtenidas en cada especie, Tablas III, VI y IX para la relación  $H'_t/T$  y Tablas IV, VII y X pa-

ra la relación  $H_t^1/ITt$ ). Independientemente de esto, el incremento en el metabolismo basal inducido por la cafeína trae aparejada una disminución en la economía global en las dos especies de mamífero estudiadas. En el caso del ventrículo de sapo, el incremento en la generación de calor total se ve compensado por el aumento en la fuerza generada en el estado activo, de modo que no se ven alteraciones de los índices  $H_t^1/T$  y  $H_t^1/ITt$  en presencia de cafeína. Esto indica que en el sapo, los mecanismos que de ser afectados comprometerían a la economía muscular, no se alteran o bien están ausentes lo que se correlaciona con la virtual ausencia de un RS activo. Por otra parte, en el caso de los ventrículos de mamífero, en los que sí existe un RS activo, el efecto de la cafeína se manifiesta por una disminución de la economía con que el proceso de excitación-contracción-relajación se lleva a cabo.

## CONCLUSIONES

- a. Independientemente de la especie estudiada y del efecto inotrópico que la frecuencia de contracción tuvo sobre cada una de ellas, el comportamiento de la relación entre parámetros asociados con la generación de fuerza, como  $\dot{T}/T$ , fue uniforme con la frecuencia (incrementándose en las tres especies) y no fue alterado por la presencia de cafeína en el medio de perfusión lo que implica que ambos parámetros ( $\dot{T}$  y  $T$ ) son modificados en forma paralela.
- b. El análisis del comportamiento de los índices asociados a la relajación respecto de los relacionados con la generación de fuerza sugiere que, en ventrículo de rata, la generación de fuerza sería más dependiente de mecanismos cafeína-sensibles que en el conejo, en el que predominaría el efecto inhibitorio de la cafeína sobre la remoción del Ca citosólico. La virtual ausencia de RS en ventrículo de sapo independizaría a este último de los efectos diferenciales sobre la contracción respecto de la relajación.
- c. Esta es la primera evaluación miotérmica del metabolismo basal realizada en corazón de anfibio. De esta manera se hace posible generar un espectro de metabolismos basales interespecies, con el corazón de anfibio en el extremo inferior del mismo.
- d. Las diferencias interespecie en los metabolismos basales observadas se correlacionan con el distinto grado de desarrollo de RS en los músculos ventriculares de cada especie (rata > conejo > sapo). Debe agregarse que el RS de la rata tendría una menor capacidad de retener Ca, obligando al Ca a ciclar continuamente entre el RS y el citosol (aún en ausencia de activación) con el consecuente incremento del consumo de energía.
- e. La presencia de cafeína incrementó el metabolismo basal en las tres especies, siendo el aumento en ventrículo de rata mayor que en ventrículo de conejo y este mayor que en ventrículo de anfibio. Esto está de acuerdo con la distinta actividad del RS interespecie.
- f. El incremento en la frecuencia de estimulación mejora la economía muscular

global en las tres especies por un mejor aprovechamiento del metabolismo basal. Este efecto se ve potenciado en ventrículo de rata cuyo metabolismo basal es el más elevado.

- g. El incremento en la frecuencia de estimulación mejora la economía muscular para la generación de fuerza isométrica en los ventrículos de mamíferos, hecho que se correlaciona con un aumento de la relajación respecto a la fuerza generada. Esto sugiere que, una "facilitación" relativa de la relajación podría ser la clave de la mejora observada en la economía muscular. De acuerdo con esta hipótesis es el hecho que en ventrículo de sapo no se observan cambios en la economía muscular para generar tensión isométrica como tampoco una mejoría de la relajación respecto a la fuerza generada con el incremento de frecuencia.
- h. La cafeína afecta la economía muscular global en ventrículo de rata y conejo, debido a que incrementa el consumo de energía asociado al metabolismo basal y a que disminuye la eficiencia del evento contráctil.
- i. La disminución en la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación inducido por la cafeína puede ser explicado por la distinta eficiencia de los mecanismos responsables de la remoción de Ca citosólico. Al inhibir la cafeína la captación de Ca por el RS (consumo de 1 ATP/2 Ca removidos), el Ca utilizado para la contracción deberá ser removido por otros sistemas menos eficientes como la bomba de Ca de sarcolema o el intercambiador Na<sub>x</sub>Ca (ambos con una estequiometría equivalente a 1 ATP/1 Ca removido). De acuerdo con este esquema en el ventrículo de sapo, en el que el RS está virtualmente ausente, no se esperarían (y no se observan) cambios en la economía del proceso de excitación-contracción-relajación.
- j. La respuesta energética del evento contráctil se correlaciona con el grado de desarrollo del RS en cada especie y marca una participación relativa del mismo diferencial para cada una de ellas tanto en el proceso de contración como en el de relajación.

RESUMEN

Si bien hace más de un siglo que Ringer demostró, en músculo cardíaco, la dependencia que existe entre la fuerza contráctil y la concentración de Ca en el medio extracelular, la fuente de Ca responsable del mantenimiento de la contracción cardíaca continúa siendo un problema no resuelto. Se han postulado dos modelos que, teniendo en cuenta al Ca extracelular en el evento contráctil, proponen para su entrada a la célula, diferentes papeles. Uno de ellos sugiere que la entrada de Ca sería insuficiente para activar a los miofilamentos, pero que sería utilizado para liberar Ca del RS el que a su vez activaría a los miofilamentos. El otro postula que el influjo de Ca sería suficiente para activar a la maquinaria contráctil, otorgándole al RS el papel de organela buffer de los cambios de la concentración de Ca intracelular. Debido a que el costo energético de la movilización de Ca varía según el mecanismo y/o compartimiento que participe, resulta importante dilucidar el papel de cada uno de ellos. Con el objeto de estudiar la participación mecánico-energética del RS en el evento contráctil, se han utilizado músculos ventriculares de tres especies, elegidas por su distinto grado de desarrollo de esta organela. Esta característica biológica diferencial se sometió al efecto de la variación de frecuencia de estimulación en presencia y ausencia de cafeína, droga capaz de deplecionar de Ca al RS por un doble efecto, el de estimular la liberación del mismo e inhibir su recaptación.

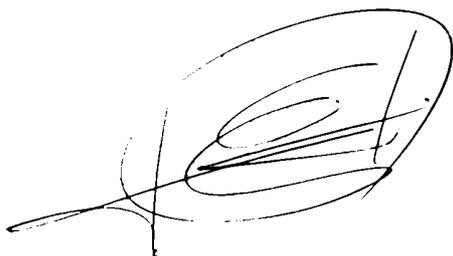
En el presente trabajo, el análisis del comportamiento mecánico de las tres especies estudiadas sugiere que en el ventrículo de rata la generación de fuerza sería más dependiente de mecanismos cafeína-sensibles (como la liberación de Ca del RS) que en el conejo, en el cual predominaría el efecto inhibitorio de la cafeína sobre la remoción del Ca citosólico. Independien-

temente de esto, la eficiencia del proceso de excitación-contracción-relajación se encuentra disminuida en presencia de cafeína en estas dos especies, lo que sería explicable por la distinta eficiencia de los mecanismos responsables de la remoción de Ca citosólico. Al inhibir la cafeína la captación de Ca por el RS (consumo de 1 ATP por cada 2 Ca removidos), el Ca utilizado para la contracción deberá ser removido por otros sistemas, menos eficientes, como la bomba de Ca de sarcolema o el intercambiador NaCa (ambos con una estequiometría equivalente a un consumo de 1 ATP por Ca removido). Los resultados obtenidos en el ventrículo de sapo dan apoyo a esta hipótesis. En efecto, la virtual ausencia del sistema retículo sarcoplásmico en el ventrículo de sapo explicaría de por sí la falta de efecto de la cafeína sobre la economía del proceso de excitación-contracción-relajación.

Por otra parte, la frecuencia de estimulación aumentó la eficiencia muscular global en las tres especies, lo que necesariamente implica un mejor aprovechamiento del metabolismo basal. Esto se ve potenciado en el ventrículo de rata cuyo metabolismo basal es el más elevado tal que, a pesar de la disminución en la fuerza generada, la economía muscular global se incrementa marcadamente con la frecuencia. La presencia de cafeína disminuyó la eficiencia muscular global en los ventrículos de mamíferos por dos vías: debido al incremento en el metabolismo basal y a la disminución de la economía con que el ciclo contráctil se lleva a cabo. En el caso del ventrículo de sapo, el incremento de la generación de calor total se ve compensado por el aumento de la fuerza generada en el estado activo indicando que en esta especie los mecanismos que se ven afectados en presencia de la droga comprometerían la economía muscular, o no son afectados o bien están ausentes.

tes, lo que se correlaciona con la virtual ausencia de un RS activo. Asimismo, el incremento observado en el metabolismo basal en las tres especies en presencia de cafeína, se correlaciona con el grado de desarrollo del RS de las mismas.

En el presente trabajo, se desglosa la participación mecánico-energética del RS en cuanto a su función en la generación de fuerza, su papel en la relajación y en el mantenimiento del estado de reposo mecánico en músculo cardíaco. Por otra parte, muestra la estrecha relación existente entre la actividad de esta organela y la economía con que el músculo cardíaco es capaz de mantener su actividad contráctil.



*Handwritten signature*  
M. J. Sánchez

BIBLIOGRAFIA

Affolter H, Carafoli E. The  $Ca^{2+} - Na^{+}$  antiporter of heart mitochondria operates electroneutrally. *Biochem Biophys Res Commun* 95:193-196. 1980.

Allen DG, Blinks JR. Calcium transients in aequorine-injected frog cardiac muscle. *Nature London* 273:509-513. 1978.

Alpert NR, Mulieri LA. Increased myothermal economy of isometric force during cardiac hypertrophy induces arterial constriction in the rabbit. *Circ Res* 50:491-500. 1982.

Armstrong CM, Bezant JA, Horowitz LR. Twitches in the presence of ethylene glycol bis (E-aminoethyl ether)-N,N' tetraacetic acid. *Biochim Biophys Acta*

Aschcroft FM, Stanfield PR. Calcium inactivation in skeletal muscle fibers of the stick insect, *Carausius morosus*. *J Physiol London* 330:349-372. 1982.

Barcena-Ruiz L, Bauckelman DJ, Wier WG. Sodium-calcium exchange in heart: mechanism, currents and changes. *Science* 238:1730-1732. 1987.

Bers DM. Early transient depletion of extracellular calcium during individual cardiac muscle contractions. *Am J Physiol* 244:H462-H468. 1983.

Bers DM. Calcium influx and sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. *Am J Physiol* 248:H366-H381. 1985.

Bers DM, Langer GA. Uncoupling cation effects on cardiac contractility and sarcolemmal  $Ca^{2+}$  binding. *Am J Physiol* 237:H332-H341, 1979.

Bers DM, Ellis D. Intracellular calcium and sodium activity in sheep heart Purkinje fibers. *Pflugers Arch* 393:171-178, 1982.

Bers DM, Philipson KD, Langer GA. Cardiac contractility and sarcolemmal calcium binding in several cardiac muscle preparations. *Am J Physiol* 240:H576-H583, 1981.

Blayney L. Cardiac sarcoplasmic reticulum. In *Cardiac Metabolism*, chapter 2, 19-47, edited by A J Drake-Holland and MIM Noble, J Wiley & Sons Ltd, 1983.

Blayney L, Thomas H, Muir J, Henderson A. Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrills, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum from rabbit heart. *Circ Res* 43:520-526, 1978.

Blinks JR, Olson CB, Jewell BR, Braveny P. Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian muscle. Evidence for a dual mechanism of action. *Circ Res* 30:367-392, 1972.

Bolton JB. Mechanisms of action of transmitters and other substances in smooth muscle. *Physiol Rev* 59:607-718, 1979.

Brady AJ. The development of tension in cardiac muscle. In *Pharmacology of cardiac function*, pp 15-23, Pergamon Press Inc, 1964.

Bridge JHB. Bassingthwighte . Uphill sodium transport driven by an inward calcium gradient in heart muscle. *Science* 219:178-180. 1983.

Brutsaert DL. Concerning contraction and relaxation of the heart. *Verhandelingen van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. 41 (1):14-80. 1979.

Burt JM, Duenas CJ, Langer GA. Influence of polymixin B, a probe for anionic phospholipids, on calcium binding and calcium and potassium fluxes of the cultured cardiac cells. *Circ Res* 53:679-687. 1983.

Bygrave FL. Mitochondria and the control of intracellular calcium. *Biol Rev* 53:43-79. 1978.

Capogrossi MC, Kort AA, Spurgeon HA, Lakatta EG. Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the Ca- and species-dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle. *J Gen Physiol* 88:589-513. 1986.

Carafoli E. Calmodulin-sensitive calcium pumping ATPase of plasma membranes: isolation, reconstitution and regulation. *Federation Proc* 43:3005-3010. 1984.

Carafoli E. The homeostasis of calcium in heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 17:203-212. 1985.

Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 56:395-433. 1987.

Caroni P, Carafoli E. An ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature London* 283:765-767. 1980

Caroni P, Carafoli E. The calcium pumping ATPase of heart sarcolemma: characterization. calmodulin dependence and partial purification. *J Biol Chem* 256:3263-3270, 1981.

Caroni P, Reinlib L, Carafoli E. Charge movements during the  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6354-6358. 1980.

Caroni P, Zurini M, Clark A, Carafoli E. Further characterization and reconstitution of a purified  $\text{Ca}^{2+}$  pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 258:7305-7310. 1983.

Cavaliere A, Ochi R, Pelzer D, Trautwein W. *Pflugers Arch* 398:284-297. 1983.

Coulson RL. Energetics of isovolumic contractions of the isolated rabbit heart. *J Physiol London* 260:45-53. 1976.

Coulson RL, Rusy BF. A system for assessing mechanical performance, heat production and oxygen utilization of isolated perfused whole hearts. *Cardiovascular Res* 7:859-869. 1973.

Crompton M, Capano M, Carafoli E. The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. *Eur J Biochem* 69:453-462. 1976.

Crompton M, Sigel E, Salzmann M, Carafoli E. A kinetic study of the energy-linked influx of  $Ca^{2+}$  into heart mitochondria. *Eur J Biochem* 69:429-434, 1976.

Chapman RA. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 35:1-52, 1979.

Chapman RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* H535-H552, 1983.

Chapman RA. Sodium-calcium exchange and intracellular buffering in ferret myocardium: an ion-sensitive-microelectrode study. *J Physiol London* 383:163-169, 1986.

Chapman RA, Gibbs CL. The effect of metabolic substrate on mechanical activity and heat production in papillary muscle. *Cardiovasc Res* 8:656-667, 1974.

Chapman JB, Gibbs CL, Gibson WR. Effects of calcium and sodium on cardiac contractility and heat production in rabbit papillary muscle. *Circ Res* 27:601-610, 1970.

Chapman JB, Gibbs CL, Loiselle DS. Simultaneous heat and fluorescence changes in muscle at high rates of energy expenditure: effects of caffeine and isoprenaline. *J Mol Cell Cardiol* 9:715-732, 1977.

Chapman JB, Gibbs CL, Loiselle DS. Myothermic, polarographic and fluorometric data from mammalian muscles. Correlations and an approach to biochemical synthesis. *Federation Proc* 41:176-184, 1982.

Desilets M, Baumgarten CM.  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  activities in ventricular myocytes isolated from rabbit heart. *Am J Physiol* 251:C197-C208, 1986.

Di Gennaro M, Vasalle M. Role of calcium on the actions of caffeine in ventricular muscle fibers. *J Cardiovasc Pharmacol* 6:739-747, 1984.

DiPolo R, Beauge L. Interaction of physiological ligands with the Ca pump and  $Na^+Ca^{2+}$  exchange in squid axons. *J Gen Physiol* 84:895-914, 1984.

Dixon WJ, Massey FJ, Jr. Introduction to statistical analysis. Mc Graw-Hill Inc., 1969.

Dominguez-Mon M, Ponce-Hornos JE, Gomez R, Cannata MA, Taquini AC. Energetic, metabolic and contractile effects of vasopressin in mammalian heart. *Meth & Find Exptl Clin Pharmacol* 6:373-378, 1984.

duBell UH, Houser SR. A comparison of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in resting feline and rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* 8:259-268, 1987.

Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J Gen Physiol* 78:457-497, 1981a.

Fabiato A. Effects of cyclic AMP and phosphodiesterase inhibitors on the contractile activation and the  $Ca^{2+}$  transient detected with aequorine in skinned cardiac cells from rat and rabbit ventricles. *J Gen Physiol* 78:15-16.

1981b.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245:C1-C14. 1983.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 85:189-320. 1985.

Fabiato A. Appraisal of the hypothesis of the sodium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum or the mitochondria in skinned cells from the rat ventricle and the canine Purkinje tissue. In *Sarcoplasmic reticulum in muscle physiology, Vol II*, pp 51-72. Ed. M L Entman y W B Van Whikle. CRC Press INC, Boca Raton, Fl. USA, 1986.

Fabiato A. Fabiato F. Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs. *Eur J Cardiol* 1:143-155. 1973.

Fabiato A. Fabiato F. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 40:119-129. 1977.

Fabiato A. Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann NY Acad Sci* 307:491-522. 1978.

Fenn WO. The quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius of the frog. *J Physiol London* 58:175-203,

1923.

Fenn WO. The relation between work performed and the energy liberated in muscular contraction. *J Physiol London* 58:373-395, 1924.

Fiskum G, Lehninger AL. The mechanisms and regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport. *Federation Proc* 39:2432-2436, 1980.

Fozzard HA, Beeler GW jr. The voltage clamp and cardiac electro-physiology. *Circ Res* 34:403-413, 1975.

Gibbs CL. Modification of the physiological determinants of cardiac energy expenditure by pharmacological agents. *J Pharmacol Ther* 18:133-152, 1982.

Gibbs CL. Thermodynamics and cardiac energetics. *Life Sciences* 62:549-576, 1983.

Gibbs CL. Myocardial metabolism and heat production: an overview. *J Mol Cell Cardiol* 18 (Suppl 1): R22, 1986.

Gibbs CL. Cardiac energetics and the Fenn effect. *Basic Res Cardiol* 82:61-68, 1987.

Gibbs CL, Chapman JB. Cardiac Energetics. In *Handbook of Physiology, Sec 2: The cardiovascular system, Vol 1*. Edited by RM Berne, N Sperelakis, SR Geiger. Chapter 22:775-804. Am Physiological Society, Maryland, 1979a.

Gibbs CL, Chapman JB. Cardiac heat production. *Ann Rev Physiol* 41:507-519, 1979b.

Gibbs CL, Gibson WR. Effects of alterations in the stimulus rate upon energy output, tension development and tension-time integral of cardiac muscle in rabbits. *Circ Res* 27:611-618, 1970.

Gibbs CL, Gibson WR. Energy production of rat soleus muscle. *Am J Physiol* 223:864-871, 1972.

Gibbs C, Loiselle D. The energy output of tetanized cardiac muscle: Species differences. *Pflugers Arch* 373:31-38, 1978.

Gibbs CL, Loiselle DS, Werdt IR. Activation heat in rabbit cardiac muscle. *J Physiol London* 395:115-130, 1988.

Gibbs CL, Moemaerts WFJM, Ricchiutti NV. Energetics of cardiac contractions. *J Physiol* 191:25-46, 1967.

Gibbs CL, Vaughan P. The effect of calcium depletion upon the tension independent component of cardiac heat production. *J Gen Physiol* 52:532-549, 1968.

Hagiwara H, Byerly L. Calcium channel. *Ann Rev Neurosci* 4:49-125, 1981.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J*

*Physiol London* 395:233-253, 1988.

Hamoir G, Focart B, Distèche M. Proteinic criteria of differentiation of white, cardiac and various red muscles of the carp. *Comp Biochem Physiol* 418:665-674, 1966.

Helmholtz H. *Arch Anat Physiol* 144-164, 1848.

Henderson AH, Brutsaert DI, Parmley WW, Sonnenblick EH. Myocardial mechanics in papillary muscle of the rat and cat. *Am J Physiol* 217:1273-1279, 1969.

Hill AV. The recovery heat production in oxygen after a series of muscle twitches. *Proc Roy Soc London. Ser B* 103:181-191, 1928.

Hill AV. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc Roy Soc London Ser B* 126:136-195, 1938.

Hill Av. *Trails and Trials in Physiology*. Edward Arnold Publishers Ltd, 1965.

Hoffmann BF, Kelly JJ. Effects of rate and rhythm on contraction of rat papillary muscle. *Am J Physiol* 197:1199-1204, 1959.

Holubarsch C, Goulette RP, Litten RZ, Martin BJ, Mulieri LA, Alpert NR. The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium. *Circ Res* 56:78-86, 1985.

Holubarsch C, Hasenfuss G, Blanchard E, Alpert NR, Mulieri LA, Just H. Myotermic economy of rat myocardium: Chronic adaptation versus acute inotropism. *Basic Res Cardiol (Suppl 1)*:95-102, 1986.

Horackova M, Vassort G. Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility. Evidence for an electrogenic, voltage-dependent mechanism. *J Gen Physiol* 73:403-424, 1979.

Hume JR. Component of whole cell Ca current due to electrogenic Na-Ca exchange in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 252:H666-H670, 1987.

Janczewski AM, Lewartowski B. The effect of prolonged rest on calcium exchange and contractions in rat and guinea-pig ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 18:1233-1242, 1986.

Kapel'ko VI, Gorina MS, Novikova NA. Comparative evaluation of contraction and relaxation of isolated heart muscle with decreased calcium concentration in the perfusate, acidosis, and metabolic blockade. *J Mol Cell Cardiol* 14 (Suppl 3):21-27, 1982.

Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol London* 384:163-169, 1987.

Kitazawa T. Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart by comparison with that by the sarcoplasmic reticulum. *J Biochem* 80:1129-1147, 1976.

Koch-Wesser J, Blinks JR. The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacological Rev* 15:605-652, 1963.

Kohlhardt M, Kubler M, Hansi E. Ambiguous effect of caffeine upon transmembrane Ca current in mammalian ventricular myocardium. *Experientia* 30:254-255, 1974.

Kokubun S, Irisawa H. Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium control current of guinea-pig single ventricular cells. *Jap J Physiol* 34:599-611, 1984.

Langer GA. Coupling calcium in mammalian ventricle. Its source and factors regulating its quantity. *Cardiovasc Res Suppl* 1:71-75, 1971.

Langer GA. Heart: Excitation-contraction coupling. *Ann Rev Physiol* 35:55-86, 1973.

Langer GA. Ionic movements and the control of contraction. In: *The mammalian myocardium*. Ed. GA Langer and AJ Brady, pp 193-217. NYWiley Intersciences, 1974.

Langer GA. Interspecies variation in myocardial physiology: the anomalous rat. *Environmental Health Perspective* 26:175-179, 1978.

Langer GA. The role of calcium in the control of myocardial contractility. An update. *J Mol Cell Cardiol* 12 (3):231-239, 1980.

Langer GA. Sodium-calcium exchange in the heart. *Ann Rev Physiol* 44:435-439, 1982.

Langer GA. Calcium at the sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol* 16:147-153, 1984.

Langer GA. Calcium at the sarcolemma: Its role in control of myocardial contraction. In *Cardiac muscle: The regulation of excitation and contraction*, chapter 10. Academic Press Inc, 1986.

Langer GA. The role of calcium at the sarcolemma in the control of myocardial contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 65:627-631, 1987.

Langer GA, Rich TL. Phospholipase D produces increased contractile force in rabbit ventricular muscle. *Circ Res* 56:146-149, 1985.

Langer GA, Serena SF, Mudd LM. Cation exchange in heart cell culture: correlation with effects on contractile force. *J Mol Cell Cardiol* 6:149-161, 1974.

Langer GA, Serena SD, Mudd L. Localization of contractile-dependent Ca: comparison of  $Mn^{2+}$  and verapamil in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol* 229:1003-1007, 1975.

Lee CO. Ionic activities in cardiac muscle cells and application of ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 241:H458-H478, 1981.

Letarte M, Quackenbush EJ, Baumal R, Michalak M. Correlations between the 44D7

antigenic complex and the plasma membrane  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$  exchanger. *Biochem Cell Biol* 64 (11):1160-1169, 1986.

Levitsky DO, Benevolensky DS, Levchenko TS, Smirnov VN, Chazov EI. Calcium-binding rate and capacity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 13:785-796, 1981.

Lochner W, Dudziak R. Stillstandumsatz und Ruheumsatz des Herzens. *Plugers Arch* 285:169-177, 1965.

Loiselle DS. The effects of temperature on the energetics of rat papillary muscle. *Plugers Arch* 379:173-180, 1979.

Loiselle DS. Cardiac basal and activation metabolism. *Basic Res Cardiol* 82:37-50, 1987.

Loiselle DS, Gibbs CL. Species differences in cardiac energetics. *Am J Physiol* 237:H90-H98, 1979.

Longoni F, Carafoli E. Identification of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$  exchanger of calf heart sarcolemma with the help of specific antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 145 (3):1059-1063, 1987.

Mattiazzi A, Garay A, Cingolani HE. Critical evaluation of isometric indexes of relaxation in rat and cat papillary muscles and toad ventricular strips. *J Mol Cell Cardiol* 18:749-758, 1986.

Mc Donald RH jr. Myocardial heat production: its relationship to tension development. *Am J Physiol* 220:894-900, 1971.

McNutt NS, Fawcett DW. The ultrastructure of the cat myocardium. *J Cell Biol* 42:46-47, 1969.

Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5340-5344, 1986.

Movsesian MA, Thomas AP, Selak M, Williamson JR. Inositol triphosphate does not release  $Ca^{2+}$  from permeabilized cardiac myocytes and sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 185:328-332, 1985.

Mulieri LA, Alpert NR. Activation heat and latency relaxation in relation to calcium movement in skeletal and cardiac muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 60:529-541, 1982.

Mulieri LA, Luhr G, Trefry J, Alpert NR. Metal-filme thermopiles for use with rabbit right ventricular papillary muscles. *Am J Physiol* 233:C146-C156, 1977.

Mullins LJ. The generation of electric currents in cardiac fibers by  $Na^{+}Ca^{2+}$  exchange. *Am J Physiol* 236:C103-C110, 1979.

Mullins RH, Requena S. Calcium measurements in the periphery of an axon. *J Gen Physiol* 74:393-413, 1979.

Naylor W, Dunnet J, Burian W. Further observations on species-determined

differences in the calcium accumulating activity of cardiac microsomal fractions. *J Mol Cell Cardiol* 7:663-675, 1975.

Neill WA, Wagner RJ, Messner JV, Krasnov N, Gorlin R. Left ventricular heat production measured by coronary flow and temperature gradient. *J Appl Physiol* 16:883-890, 1961.

Page E. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *Am J Physiol* 235:C147-C158, 1978.

Page SG, Niedegerke R. Structures of physiological interest in the frog heart ventricle. *J Cell Sci* 11:179-203, 1972.

Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 250:H741-H748, 1986.

Penpargkul S, Repke DI, Katz AM, Scheuer J. Effect of physical training on calcium transport by rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 40:134-137, 1977.

Philipson KD, Langer GA. Sarcolemmal-bound calcium and contractility in the mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 11:857-875, 1979.

Philipson KD, Nishimoto AY. Efflux of  $Ca^{2+}$  from cardiac sarcolemmal vesicles. Influence of external  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ . *J Biol Chem* 256:3698-3702, 1981.

Philipson KD, Nishimoto AY.  $Na^{+}$ - $Ca^{++}$  exchange in inside-out cardiac sarcolemmal

vesicles. *J Biol Chem* 257(9):5111-5117, 1982.

Philipson KD, Ward R.  $\text{Ca}^{2+}$  transport capacity of sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange. Extrapolation of vesicle data to in vivo conditions. *J Mol Cell Cardiol* 18:943-951, 1986.

Pierce GM, Philipson KD, Langer GA. Passive calcium-buffering capacity of a rabbit ventricular homogenate preparation. *Am J Physiol* 249:C248-C255, 1985.

Pierce GM, Ward R, Philipson KD. Role for sulfur-containing groups in the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$  exchange of cardiac sarcolemmal vesicles. *J Membr Biol* 94:217-225, 1986.

Pitts BJR. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 254:6232-6235, 1979.

Ponce-Hornos JE, Bonazzola P, Taquini AC. The role of extracellular sodium on heart muscle energetics. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 409:163-168, 1987.

Ponce-Hornos JE, Langer GA. Effects of inorganic phosphate on ion exchange, energy state and contraction in mammalian heart. *Am J Physiol* 242:H79-H88, 1982.

Ponce-Hornos JE, Langer GA. Sodium-calcium exchange in mammalian myocardium: the effects of lithium. *J Mol Cell Cardiol* 12:1367-1382, 1980.

Ponce-Hornos JE, Langer GA, Mudd LM. Inorganic phosphate: its effects on Ca exchange and compartmentalization in cultured heart cells. *J Mol Cell Cardiol*

14: 41-51, 1982.

Ponce-Hornos JE, Marquez MT. *Energetica del reposo mecanico en el miocardio: Papel del K extracelular. Medicina 46:549,1986.*

Ponce-Hornos JE, Marquez MT, Bonazzola P. *K extracelular en la energetica cardiaca. Resumenes de la XVIa Reunion Cientifica de la Sociedad Argentina de Biofisica. Resumen N° 9, 1987.*

Ponce-Hornos JE, Parker JM, Langer GA. *Heat production in isolated heart myocytes: Differences among species. Am J Physiol (enviado), 1989.*

Ponce-Hornos JE, Ricchiuti MV, Langer GA. *On-line calorimetry in the arterially perfused rabbit interventricular septum. Am J Physiol 243:H289-H295, 1982.*

Ponce-Hornos JE, Taquini AC. *Calcium effects on contractility and heat production in mammalian myocardium. Am J Physiol 251:H127-H132, 1986.*

Rasmussen H, Barret FQ. *Calcium messenger system: An integrated view. Physiol Rev, 64:938-984, 1984.*

Reeves JP, Hale CC. *The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. J Biol Chem 259:7733-7739, 1984.*

Reeves JP, Sutko JL. *Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 76 (2):590-594, 1979.*

Reuter H. Properties of two inward membrane currents in the heart. *Ann Rev Physiol* 41:413-424, 1979.

Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301:569-575, 1983.

Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol London* 195:45-70, 1968.

Ricchiutti NV, Gibbs CL. Heat production in a cardiac contraction. *Nature London* 208:897-898, 1965.

Rich TL, Brady AJ. Potassium contracture and utilization of high energy phosphates in rabbit heart. *Am J Physiol* 226:105-113, 1974.

Rich TL, Langer GA, Klassen MG. Two components of coupling calcium in single ventricular cell of rabbits and rats. *Am J Physiol* 254:H932-H946, 1988.

Ringer S. A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol London* 4:29-42, 1883.

Roos KP, Brady AJ. Individual sarcomere length determination from isolated cardiac cells using high-resolution optical microscopy and digital image processing. *Biophys J* 40:233-244, 1982.

Rousseau E, Smith JS, Henderson JS, Meissner G. Single channel and  $^{45}\text{Ca}$  flux

measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys J* 50:1009-1014, 1987.

Rusy BF, Coulson RL. Energy consumption in the isolated rabbit heart. *Anesthesiology* 39:428-434, 1973.

Scarpa A, Graziotti P. Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. *J Gen Physiol* 62:756-772, 1973.

Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206:700-702, 1979.

Scholz H. Inotropic drugs and their mechanisms of action. *JAAC*. 4:389-387, 1984.

Schramm M, Towart R. Modulation of calcium channel function by drugs. *Life Sciences* 37:1843-1860, 1985.

Schreiber SS, Evans C, Oratz M, Rothchild M. The basal level of cardiac protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 18 (Suppl 1):26P, 1986.

Shine KI, Langer GA. Caffeine effects upon contraction and calcium exchange in rabbit myocardium. *J Cell Mol Cardiol* 3:255-270, 1971.

Shine KI, Serena SD, Langer GA. Kinetic localization of contractile calcium in rabbit myocardium. *Am J Physiol* 221: 1408-1417, 1971.

Solaro J, Wise RM, Shiner JS, Briggs FN. Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation. *Circ Res* 34:525-530, 1974.

Somlyo AP, Somlyo AV, Schumann H, Endo M. Calcium and monovalent ions in smooth muscle. *Federation Proc* 41:2883-2890, 1982.

Sopis JA, Langer GA. Calcium kinetics in frog heart. *J Mol Cell Cardiol* 1:295-305, 1970.

Sordhal A. The effects of magnesium, ruthenium red and the antibiotic ionophore A23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 167:104-115, 1974.

Suga H, Hisano R, Goto Y, Yamada O, Igarashi Y. Effects of positive inotropic agents on the relation between oxygen consumption and systolic pressure volume area in canine left ventricle. *Circ Res* 53:306-318, 1983.

Tada M, Inui M. Regulation of calcium transport by the ATPase-phospholamban system. *J Mol Cell Cardiol* 15 (9):565-575, 1983.

Tada M, Yamamoto T, Tonomura Y. Molecular mechanism of active transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 58:1-79, 1978.

Theisohn M, Friedrich M, Justus P, Guttler K, Klaus W. Heat production and oxygen consumption of the isolated rabbit heart: their relation to mechanical function. *Basic Res Cardiol* 72:19-33, 1977.

Thorpe WR. *Some effects of caffeine and quinidine on sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. Can J Physiol Pharmacol* 51:499-503, 1973.

Tillisch JH, Fung LK, Homm PM, Langer GA. *Transient and steady state effect of sodium and calcium on myocardial contractile response. J Mol Cell Cardiol* 11:137-148, 1979.

Towart R. *The selective inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonistic dihydropyridines. Circ Res* 48:650-657, 1981.

Tytgat J, Vereecke J, Carmeliet E. *Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type Ca channels. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337:690-692, 1988.

Van Skiver DM, Spires S, Cohen CJ. *Block of T-type Ca channels in guinea-pig atrial cells by cinnarizine. Biophys J* 53:233a, 1988.

Volpe P, Salviati G, Di Virgilio F, Pozzan T. *Inositol 1,4,5-triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Nature* 316:347-349, 1985.

Vornanen M. *Effects of caffeine on mechanical properties of developing rat heart ventricles. Comp Biochem Physiol* 78C:329-334, 1984.

Weber A Herz R. *The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effects of caffeine on reticulum. J Gen Physiol* 52:750-759, 1968.

Weber A, Herz R, Reiss I. Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented reticulum. *Biochem Z*:329-369, 1966.

Weir WG. Calcium transients during excitation-contraction coupling in mammalian heart aequorin signals of canine Purkinje fibers. *Science* 207:1085-1097, 1980.

Wendt IR, Loiselle DS. The effects of external calcium concentration on activation heat in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 13 (Suppl 3):8P, 1981.

Wendt IR, Stephenson DG. Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibers of the rat. *Pflugers Arch* 398:210-216, 1983.

Wendt-Gallitelli MF, Jacob R. Rhythm-dependent role of different calcium stores in cardiac muscle: X-ray micro analysis. *J Mol Cell Cardiol* 14:487-492, 1982.

Wheeler-Clark ES, Tormey McD.J. Electron Probe X-Ray Microanalysis of sarcolemma and junctional sarcoplasmic reticulum in rabbit papillary muscles: low sodium-induced calcium alterations. *Circ Res* 60:246-250, 1987.

Wilkie DR. Thermodynamics and the interpretation of biological heat measurements. *Prog Biophys* 10:259-298, 1960.