

## Tesis de Posgrado

# Economía muscular cardíaca : Ca y contracciones extrasistólicas

Marengo, Fernando Diego

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:**

Marengo, Fernando Diego. (1994). Economía muscular cardíaca : Ca y contracciones extrasistólicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2653\\_Marengo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2653_Marengo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Marengo, Fernando Diego. "Economía muscular cardíaca : Ca y contracciones extrasistólicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2653\\_Marengo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2653_Marengo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ECONOMIA MUSCULAR CARDIACA: Ca y CONTRACCIONES EXTRASISTOLICAS**

Tesis para optar al Doctorado en Ciencias Biológicas

FERNANDO DIEGO MARENGO

Director: Prof. Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas  
Facultad de Medicina - UBA

*tesis  
2653  
Ej. 2*

*a Roxana*

*a mis viejos*

*a mi hermano*

*a mis abuelos*

*a mis tíos*

*a mis amigos*

*y a todos los que alguna vez y de alguna*

*manera me quisieron y apoyaron*

Agradecimientos:

- Al Dr Jorge E Ponce-Hornos, por ser fundamental en mi formación científica y por su constante apoyo.

- A la Dra María Teresa Márquez, por prestarme oídos siempre que fue necesario discutir temas de trabajo y por su invaluable ayuda para llevar adelante este trabajo.

- A la Dra Patricia Bonazzola y a la Lic Alicia Consolini, quienes fueron mis restantes compañeras de laboratorio mientras realicé este trabajo y de las cuales recibí mucha ayuda.

- Al Prof Dr Alberto C Taquini, por su permanente apoyo y por haberme permitido desarrollar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Cardiológicas.

- A todos mis compañeros del ININCA que de una u otra manera me ayudaron y apoyaron.

## Indice General

	página
<u>Introducción</u> .....	1 - 46
A - Calcio y contractilidad miocárdica .....	1 - 29
1 - Generalidades .....	1 - 3
2 - Papel del calcio extracelular y el sarcolema .....	3 - 17
a) Canales de calcio .....	8 - 12
b) Intercambiador NaXCa .....	12 - 16
c) Bomba de calcio del sarcolema .....	16 - 17
3 - Fuentes intracelulares de calcio .....	17 - 23
a) Retículo sarcoplásmico .....	17 - 20
b) Mitocondrias .....	20 - 23
4 - Modelos del proceso excitación-contracción-rela- jación.....	24 - 29
B - Energética Cardíaca .....	30 - 46
1 - Generalidades .....	30 - 32
2 - Antecedentes históricos de los estudios miotérmi- cos .....	32 - 34
3 - Métodos miotérmicos .....	34 - 38
a) Método de las diferencias de temperatura arte- riovenosa.....	34 - 35
b) Método de las termopilas .....	35 - 36
c) Método microcalorimétrico para tejidos perfundi- dos .....	37 - 38
4 - Componentes energéticos del músculo cardíaco ....	38 - 46
a) Metabolismo basal .....	38 - 40

b) Metabolismo activo .....	40 - 46
b-1) Componentes del calor activo: estudios clásicos .....	41 - 43
b-2) Separación de componentes del calor activo por medio del estudio cinético de la respuesta calorimétrica a una contracción muscular cardíaca .....	43 - 46
<u>Objetivos</u> .....	47 - 48
<u>Materiales y Métodos</u> .....	49 - 61
1 - Preparación biológica .....	49 - 50
2 - Mediciones miotérmicas y mecánicas simultáneas ..	50 - 56
3 - Soluciones .....	56 - 56
4 - Estadística .....	57 - 57
5 - Protocolos experimentales .....	57 - 61
<u>Resultados</u> .....	62 - 113
1 - Análisis clásicos de los de los registros calorimétricos de latidos controles (estacionarios y aislados).....	63 - 67
2 - Descripción de un modelo para la evaluación de las respuestas observadas .....	68 - 80
3 - Análisis de los procesos asociados a los componentes ajustados en latidos estacionarios y aislados.	81 - 89
4 - Análisis de los procesos asociados a los componentes ajustados en latidos estacionarios. Efecto de la variación de la concentración extracelular de Ca	

y de la estimulación pareada .....	90 - 101
5 - Análisis mecánico-energético de las contraccio- nes extrasistólicas y postextrasistólicas .....	102 - 113
<u>Discusión</u> .....	114 - 131
1. Métodos de evaluación de los registros miotérmicos	114 - 117
2. Componentes de latidos aislados y estacionarios ..	117 - 126
3. Contracciones extrasistólicas y postextrasistóli- cas .....	127 - 131
<u>Resumen</u> .....	132 - 129
<u>Referencias</u> .....	137 - 160

## Lista de abreviaturas y símbolos

min: minuto  
s: segundo  
ms: milisegundo  
Hz: hertz  
kHz: kilohertz  
mm: milímetro  
mN: milinewton  
g: gramo  
mcal: milicaloría  
mJ: milijoule  
mW: miliwatt  
 $\mu$ W: microwatt  
mV: milivoltio  
t: tiempo  
 $\infty$ : infinito  
tg: tangente  
ml: mililitro  
mM: milimolar  
 $\mu$ M: micromolar  
mmol: milimol  
 $\mu$ mol: micromol  
nmol: nanomol  
mOsm: miliosmolar  
[Ca]<sub>o</sub>: concentración extracelular de calcio  
(Ca)<sub>o</sub>: actividad extracelular de calcio



(Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>: calcio libre citosólico

I<sub>Ca</sub>: corriente de calcio

E<sub>m</sub>: diferencia de potencial de la membrana plasmática

RS: retículo sarcoplásmico

C: latido control

TW: estímulo doble o pareado, o contracción resultante de esta estimulación

PTW: contracción posterior a una de tipo Tw

CD: curva diferencia obtenida restando el trazado calorimétrico de C al trazado calorimétrico de TW

H: calor (medido en mJ o mcal)

$\dot{H}$ : potencia (medida en mW o  $\mu W$ )

$\dot{H}_t$ : potencia total liberada por un músculo contrayéndose

$\dot{H}_r$ : potencia liberada por un músculo en reposo

$\dot{H}_a$ : potencia liberada debido a la actividad contráctil del músculo

H'<sub>a</sub>: calor por latido

H<sub>1</sub>: componente de calor de una contracción

H<sub>2</sub>: componente de calor de una contracción

H<sub>3</sub>: componente de calor de una contracción

H<sub>4</sub>: componente de calor de una contracción

$\dot{H}_4$ : valor de potencia alcanzada por H<sub>4</sub> en la meseta del registro

P: máxima presión desarrollada durante una contracción

+P: máxima velocidad de contracción

-P: máxima velocidad de relajación

I<sub>Pt</sub>: integral de la curva de desarrollo de presión en función del tiempo

tc<sub>1</sub>: tiempo transcurrido desde el inicio de la contracción hasta +P

tc2: tiempo transcurrido desde +P hasta P

tr1: tiempo transcurrido desde P hasta -P

tr2: tiempo transcurrido desde -P hasta el final del ciclo contráctil

$\mu$ : constante de velocidad de enfriamiento del calorímetro

$\beta$ : constante de velocidad para el retardo en la detección de la señal calorimétrica

ATP: trifosfato de adenosina

ADP: difosfato de adenosina

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

TnC: troponina C

O<sub>2</sub>: oxígeno molecular

N<sub>2</sub>: nitrógeno molecular

Ca: ion calcio.

Mg: ion magnesio

Na: ion sodio

K: ion potasio

Mn: ion manganeso

## **Introducción**

## A. CALCIO Y CONTRACTILIDAD CARDIACA

### 1. Generalidades

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).

El gradiente iónico para calcio es cuantitativamente el más importante que se establece a través de la membrana celular. 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 está parcialmente garantizado por la baja permeabilidad de la membrana a este ión en condiciones de reposo. Además, el bajo nivel de  $(\text{Ca}^{2+})_i$  en estas condiciones es mantenido por sistemas de transporte que directamente o por su asociación con otros sistemas de transporte, utilizan energía química. Estos sistemas están ubicados tanto en la membrana celular o sarcolema (bomba de Ca asociada a sarcolema e intercambiador de  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ ) como en el retículo sarcoplásmico (RS) (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 a rápidos cambios en la concentración intracelular de Ca, la cual oscila entre el nivel basal correspondiente al estado de reposo mecánico ( $<10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>) hasta aproximadamente  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> en el pico de activación, en períodos que pueden variar entre 50 a 1000 ms dependiendo de la especie y la temperatura. Por lo tanto, el músculo cardíaco posee mecanismos capaces de regular cíclicamente en forma rápida y precisa los niveles de (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> de lo que depende su función contráctil. En trabajos más recientes se propuso que existiría una competencia entre el intercambiador Na<sub>x</sub>Ca y la bomba de Ca del RS por la remoción del Ca que entra al intracelular en una contracción, de modo que cuando uno de estos dos sistemas es inhibido el otro sería capaz de captar todo el Ca que ingresó (Bers y Bridge, 1989; Shattock y Bers, 1989; Bridge, Smolley y Spitzer, 1990; Lewartowski, Wolska y Zdanowski, 1992).

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 de 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 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 sarcoplasmático, mitocondrias) con capacidad de acumular calcio en cantidad suficiente como para modificar la oferta de este catión al medio intracelular. A continuación se desarrollarán detalladamente las características de cada uno de los compartimientos potencialmente involucrados en el control del Ca celular. A su vez se discutirá el lugar que estos ocupan en los modelos de excitación-contracción-relajación existentes hoy en día en la literatura.

## 2. Papel de calcio extracelular y el sarcolema

El músculo cardíaco cesa casi inmediatamente de responder frente a un estímulo cuando se priva de calcio (Ca) el medio de perfusión. Esto denota la crítica dependencia existente en músculo cardíaco entre la actividad contráctil y la presencia de Ca en el medio extracelular (Ringer, 1883; Philipson y Langer, 1979; Rich, Langer y Klassen, 1988) lo que lo diferencia del músculo esquelético el cual es capaz de contraerse aún en medios libres de Ca por espacio de horas a temperatura ambiente (Amstrong, Bezanilla y Horowicz, 1972).

El medio extracelular es un compartimiento que contiene suficiente Ca para activar el aparato contráctil, sin embargo el Ca responsable del mantenimiento de la contracción cardíaca no parece provenir exclusiva-

mente de allí. En efecto, si bien la fuerza generada disminuye rápidamente por 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 posteriormente 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 y por el método de voltage-clamp en células aisladas, 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 Ca. 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 Ca 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 el Ca, 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 Ca 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 totalmente su habilidad para contraerse en menos de un segundo de cambiado el medio, la que se recupera inmediatamente con la reposición del Ca extracelular. Esta fracción de Ca rápidamente intercambiable fue asociada al sarcolema o a sitios de rápido intercambio con esta membrana. Posteriormente se determinó, por medio de flujos radioisotópicos bajo condiciones no limitantes de perfusión, la existencia de un componente de Ca de intercambio rápido ( $t_{1/2} < 1.5$  seg) en células cardíacas de rata neonata (Kuwata y Langer, 1989). Este componente, por sus propiedades cinéticas y porque era desplazable por lantano, también fue asociado a la membrana o a una región de rápido intercambio con esta. Este componente de intercambio



rápido fue confirmado posteriormente en células de rata adulta (Langer, Rich y Orner, 1990) y la contracción resultó totalmente dependiente de él. Esta fracción de Ca era suficientemente grande como para explicar por sí sola la fuerza generada en una contracción. Sin embargo la ubicación específica de este "pool" de Ca aún no está confirmada. Posteriormente se determinó que una fracción discreta del componente rápido (aproximadamente el 20%) estaba ubicada del lado interno de la membrana celular, poseía un tiempo medio de 650 ms y su intercambio era completamente dependiente del intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  (Langer y Rich, 1992). Todos estos datos coinciden en atribuir al Ca sarcolemal una participación importante en la contracción.

La importancia del Ca sarcolemal en la contracción está corroborada por los estudios realizados en vesículas de sarcolema y en tejido muscular cardíaco frente a concentraciones de Ca extracelular variable (0,05 a 9,0 mM), que demostraron que el Ca unido al sarcolema estaba en estrecha relación con la fuerza activa generada por las preparaciones musculares. De hecho el gráfico que relaciona el Ca unido a sarcolema vs. concentración de Ca extracelular y aquél que relaciona la máxima velocidad de contracción vs. el mismo parámetro son 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 ( $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) 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 al 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 Å), 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 Ca para el acople de la despolarización con la contracción. A su vez existirían sitios de unión y almacenamiento de Ca en, o cerca de, la superficie celular, desde los cuales éste sería liberado. Estos sitios parecerían estar localizados 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  $700 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  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 generar el 50% de la fuerza máxima en ventrículo de mamífero (Pierce, Philipson y Langer, 1985). Este valor es aún superado por la fracción de intercambio rápido ( $2.6 \text{ mmol.kg}^{-1}$  de tej.húmedo) hallado más recientemente por medio de la técnica de superfusión rápida (Kuwata y Langer, 1989; Langer, Rich y Orner, 1990)

Debe mencionarse que si el Ca que entra a la célula miocárdica a través de sarcolema estuviera destinado a activar a las proteínas

contráctiles sería necesario un flujo transmembrana de una magnitud tal que, de no mediar compensación por otros movimientos iónicos, generaría corrientes o cambios de potencial de membrana elevados, y estos 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, que debería ser detectado mediante el uso de aequorina (proteína fotoluminiscente en presencia de Ca); Segundo, el tiempo necesario para que el Ca 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 Ca 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 Ca en el medio extracelular implica la existencia de mecanismos involucrados en los movimientos de calcio transsarcolemales. 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 sistemas 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 lenta ( $I_{Si}$ ) es dependiente de Ca, posee una cinética más lenta y una dependencia del potencial de membrana que la diferencian de la corriente rápida de sodio (Reuter, 1979). Posteriormente, en los primeros experimentos de "voltage clamp" realizados en miocitos individuales (Reuter, 1979; Tsien, 1983; Trautwein y Pelzer, 1985), se observó que esta corriente era más selectiva para el Ca de lo que se pensaba. Por este motivo se la comenzó a llamar corriente de calcio ( $I_{Ca}$ ), y su cinética de activación e inactivación mostró ser mucho más rápida que las estimaciones previas, observándose en miocitos de mamífero un tiempo al pico en la corriente de 1 a 2 ms y una inactivación completa entre los 100 y 150 ms (Lee y Tsien, 1982; Lee y Tsien, 1984).

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 (Stanfield, 1986). Este canal, a diferencia del canal rápido de sodio, no es bloqueado por tetrodotoxina pero es sensible a

cationes divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ) y a los antagonistas cálcicos orgánicos como verapamil, nifedipina y otras dihidropiridinas (Stanfield, 1986). El movimiento pasivo transmembrana de Ca a través del canal depende de la diferencia neta de potencial electroquímico para Ca y de la conductancia al 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 (Stanfield, 1986). 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 (Stanfield, 1986). Cualquier cambio en el potencial de membrana causaría la reorientación del sensor cargado dentro del campo y en consecuencia los cambios conformacionales que llevarían al estado activado. La corriente lenta comienza cuando el potencial de la membrana alcanza los -50 a -60 mV, tiene su máximo a 0 mV y posee un bien definido potencial de reversión que varía con la concentración extracelular de Ca de acuerdo a la predicción de un electrodo Nernstiano (Campbell y Giles, 1990). La inactivación además de ser dependiente del voltaje (V) de la membrana lo es de la corriente de Ca, por lo que la inactivación varía con el voltaje dando una curva en forma de U cualitativamente similar a la relación  $I_{Ca}$  vs V (Campbell y Giles, 1990). Esta dependencia que tiene la inactivación con la corriente de Ca pone de manifiesto que el canal de Ca no es analizable por medio de la convencional cinética de Hodgkin-Huxley (Campbell y Giles, 1990), la cual supone una dependencia pura del voltaje. No se sabe si este proceso de inactivación es por acción directa del Ca sobre el canal o por intermedio de una reacción bioquími-

ca, aparentemente una defosforilación (Standen y Stanfield, 1982; Eckert y Chad, 1984; Johnson, Khabbaza, Bailey y Brieshop, 1986). 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 interrumpidas por períodos de cierre variables que oscilan entre menos de 1 ms y 100 ms de duración (Cavalie, Ochi, Pelzer y Trautwein, 1983).

Fisiológicamente, la función de los canales de Ca es modulada por neurotransmisores (Stanfield, 1986). 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 este incremento en la corriente de Ca es debido a un incremento en el número total de canales disponibles funcionalmente o a un aumento en la probabilidad de 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-quinasa 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).

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 (presentes en todas las células cardíacas) y los canales de Ca de tipo T (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara, Irisawa y Kameyama, 1988), que solo fueron descritos en ciertos tipos celulares de algunas especies. 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).

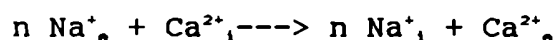
b. Intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ .

La existencia de un sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  ha sido establecida en muchos tejidos incluyendo el tejido cardíaco intacto (Reuter y Seitz, 1968; Horackova y Vassort, 1979) y vesículas de sarcolema cardíaco (Reeves y Sutko, 1979; Philipson y Nishimoto, 1982). Más recientemente, mediante el uso de técnicas de aislamiento y purificación a partir de vesículas de sarcolema cardíaco y aplicación de anticuerpos monoclonales se ha propuesto que la unidad básica del sistema de intercambio de  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  sería una proteína monomérica de aproximadamente 33 kDa de masa molar y que el intercambiador funcionalmente activo sería un tetramero 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 técnicas 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; Bridge, Smolley y Spitzer, 1990).

La dirección del movimiento neto de calcio a través del intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  producirá la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol acoplada con la entrada de  $\text{Na}^+$  siempre que se cumpla:

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

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



respectivamente

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

En el músculo ventricular de mamífero en reposo, en el que el  $E_m$  es de alrededor  $-80$  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  $3 Na^+ : 1 Ca^{2+}$  para el intercambio. Tomando valores promedio para las concentraciones 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  $Na^+Ca^{2+}$  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 aproximadamente  $2$  ms. A este cambio está asociada la entrada de Na a través de los llamados canales rápidos. El cambio en  $(Ca^{2+})_i$  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, hasta concentraciones de 1-2  $\mu\text{M}$ , la relación expresada en la ecuación (1) nuevamente se revierte y el sistema de intercambio NaXCa funcionaría en el sentido de retirar el Ca del citosol. Esto puede suceder aún durante la meseta del potencial de acción (Philipson y Ward, 1986). Mediante técnicas de voltage-clamp en contracturas producidas sobre células tratadas previamente con 10 mM de cafeína a fin de inhibir la actividad del RS, Bridge, Smolley y Spitzer (1990) pudieron identificar una corriente entrante que se activaba en presencia de Na extracelular y que precedía temporalmente a la relajación. Esta corriente fue asimilada al intercambiador NaXCa y explicaba la extrusión de todo el Ca ingresado al citosol en estas condiciones.

Existe numerosa evidencia respecto de la participación del sistema de contratransporte de NaXCa 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 establecida en condiciones fisiológicas (Carafoli, 1985; Philipson y Ward, 1986), aunque existen evidencias de su operatividad 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 NaXCa podría operar en

regímenes de alta o baja velocidad dependiendo de las concentraciones intracelulares de estos ligandos (DiPolo y Beauge, 1984).

c. Bomba de calcio del sarcolema.

Este sistema de transporte activo primario, ha sido identificado en membranas 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 reconstruida 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).

Caroni y Carafoli (1980) 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). En la célula cardíaca intacta esto 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 intracelular y el calcio total es muy baja, hecho que sugiere un importante control de los niveles de calcio en el medio intracelular (Mullins y Requena, 1979; Langer, 1982). Por ejemplo, en el músculo esquelético la parvoalbúmina, el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias funcionan como reservorios intracelulares de Ca. 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. El músculo cardíaco carece de parvoalbúmina (Hamoir, Focart y Disteche, 1966), y los lugares más probables de almacenamiento del Ca intracelular 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 Niederggerke, 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 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 aislados de células cardíacas altamente enriquecidos en retículo sarcoplásmico, han mostrado que los mismos son capaces de acumular hasta 76 nmoles de Ca.g<sup>-1</sup> 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 nmol.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo (Solaro, Wise, Shiner y Briggs, 1974). Esta última aseveración debería ser tomada con precaución debido a que los estudios de captación mencionados están hechos a concentraciones extramicrosomales constantes, lo que por supuesto no ocurre en la célula, donde la concentración citoplasmática de Ca libre disminuye a medida que este ión es captado por el RS. Sin embargo también existen evidencias en sistemas tisulares cardíacos que muestran que la organela en cuestión sería capaz, por sí sola, de efectuar una relajación completa en contracturas por enfriamiento (Bers y Bridge, 1989)

La captación de Ca por parte de este sistema membranoso es llevada a cabo por una Ca-ATPasa, 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 ( $V_{max}=30$  nmoles de Ca.mg<sup>-1</sup>

'de proteína. $s^{-1}$ ) 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. Por otro lado Rich, Langer y Klassen en 1988 asociaron al retículo sarcoplásmico con una fracción de Ca de intercambio relativamente lento con el extracelular, que en células ventriculares de rata adulta era responsable de una fracción importante de la contracción (>90%), mientras que en células de ventrículo de conejo tenía mucha menor importancia. Posteriormente (Langer, Rich y Orner, 1990) en células ventriculares de rata, se demostró por medio de estudios con flujos radioisotópicos que esta fracción de Ca podía descomponerse cinéticamente en dos subcomponentes ( $t_{1/2} = 3,5$  y 19 segundos respectivamente) y que en conjunto representaban un contenido de  $2.1 \text{ mmol/kg}^{-1}$  de tejido seco.

Existen varias hipótesis para explicar la liberación de Ca por parte del RS de músculo cardíaco. La más difundida actualmente es la de Fabiato, en la cual la liberación del Ca es inducida por Ca (Fabiato, 1981a). Sin embargo, también se sostiene que dicha liberación es consecuencia de una despolarización a nivel de la cisterna terminal del

RS (muy probable en músculo esquelético aunque no demostrada en músculo cardíaco) (Fabiato, 1986), o de una estimulación por la vía la ruta del Inositol-1,4,5-trifosfato (Volpe, Salviati, Di Virgilio y Pozzan, 1985; Mosvesian, Thomas, Selak y Williamson, 1985). Como un dato más a favor de la primera hipótesis, existen evidencias recientes que indican la presencia de canales de Ca activables por Ca que serían responsables de la liberación del mismo desde esta organela (Rousseau, Smith, Henderson y Meissner, 1987). La molécula proteica que forma estos canales sería la misma que actúa como receptor de rianodina, y fue purificada y reconstituida en membranas artificiales donde aún mantenía sus propiedades conductoras de Ca (Lai, Anderson, Rousseau, Liu y Meissner, 1988).

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 Hoppel, 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  $\mu\text{moles de Ca.g}^{-1}$  de tejido húmedo.

Sin embargo, estudios realizados tanto en tejido cardíaco como en otros tejidos, utilizando microanálisis por difracción de rayos X, han disminuido el contenido de Ca de las mitocondrias a alrededor de 1-2 nmoles de  $\text{Ca.mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial o 0,1-0,2  $\mu\text{moles de Ca.g}^{-1}$  de tejido húmedo (Wendt-Gallitelli y Jacob, 1982; 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 almacenarían 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 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  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  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 Ca.mg<sup>-1</sup> de proteína.s<sup>-1</sup>. Además, este sistema de captación muestra baja afinidad por Ca (K<sub>m</sub>= 15-30 μM) por lo que para condiciones de concentraciones de Ca y Mg similares a las existentes in vivo, la velocidad de captación oscilaría entre 0,3 y 3 nmoles de Ca.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo.s<sup>-1</sup> lo que haría improbable su participación en la regulación del Ca citoplasmático durante el ciclo de excitación-contracción-relajación normal (Crompton, Sigel, Salzman 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 nmoles.l<sup>-1</sup>. Esto se debe a la existencia de un mecanismo de salida de Ca activado por Na cuyo K<sub>m</sub> está alrededor de 7 nmoles.l<sup>-1</sup> 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).

Los niveles de la concentración de Na intracelular oscilan entre 5,7 y 11 nmoles.l<sup>-1</sup> (Lee, 1981), lo cual significa que el flujo de salida de Ca debido al intercambio de Na<sub>x</sub>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 niveles 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 grandes 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. Pero como potencialmente existen otras fuentes de Ca capaces de participar en el fenómeno contráctil, durante la década del setenta y la primera mitad de los ochenta se plantearon dos modelos antagónicos. Ambos modelos coincidían en asignar un papel preponderante a la entrada de Ca desde el medio extracelular como activador inicial del proceso, pero disentían en el grado de participación que esta fuente tendría en el Ca que finalmente se une a los miofilamentos.

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 medio extracelular es insuficiente para activar a los miofilamentos en forma directa. Una entrada relativamente pequeña de Ca (vía los canales lentos y posiblemente el intercambiador de Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>) 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,

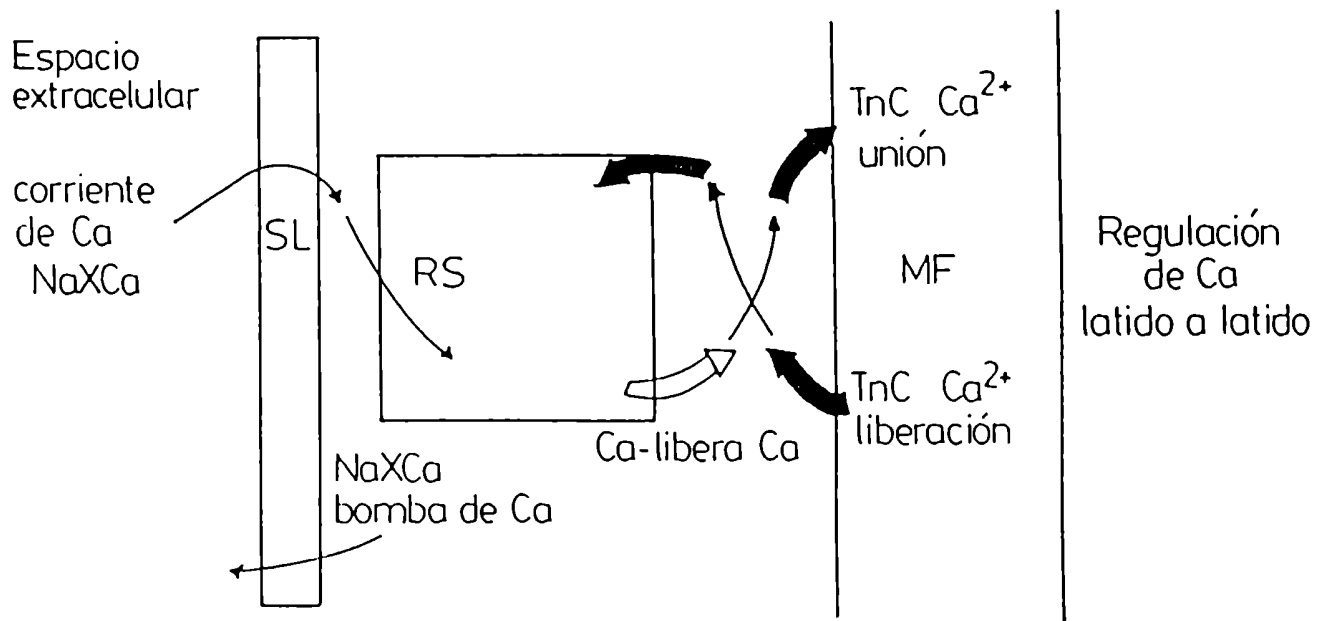


Figura 1: Participación del retículo sarcoplásmico en el proceso contráctil según el modelo de Ca induce liberación de Ca.

SL:sarcolema; TnC:Troponina C; MF:miofilamentos.

el mismo cambio en la concentración de Ca libre puede o bien cargar de Ca al RS si fue aplicado lentamente (5 s) o inducir a la liberación de Ca si lo fue rápidamente (0,2 s). De estos estudios los autores infieren que la simple entrada de Ca transarcolemal 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 membrana plasmática, mas específicamente, del complejo glicocálix-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 la 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; Langer, Rich y Orner, 1990).

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  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ ; 2. esta entrada de Ca estimularía la liberación de Ca adicional por el RS; 3. la combinación del Ca liberado por el RS y el 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  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ . 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; Rich, Langer y Klassen, 1988; Shattock y Bers, 1989).

Aún aceptando este esquema como válido quedan varios aspectos por resolver, entre los que podemos citar:

- Si el influjo de Ca para la contracción tiene o no un componente asociado al intercambiador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ .

- Cuáles son las modificaciones que se producen en las participaciones relativas de las distintas fuentes como el RS y el complejo glicocálix-sarcolema en contracciones asociadas a fenómenos frecuencia dependientes como las extrasistolias y las postextrasistolias.

- Cuál es el gasto energético que se produce por movimientos iónicos en la contracción cardíaca en comparación al asociado a la hidrólisis de ATP por los miofilamentos.

El trabajo que se describe en esta tesis pretende abordar en parte

a estas preguntas y/o establecer un método de análisis que permita continuar investigándolas.

El establecimiento de un modelo cada vez más completo del proceso excitación-contracción-relajación no sólo tiene importancia por el mismo conocimiento fisiológico del sistema, sino también por las aplicaciones farmacológicas y terapéuticas que puedan derivar de este conocimiento. Debe recordarse que estamos hablando del funcionamiento de un tejido vital para el ser humano y cuyas patologías representan una de las más grandes preocupaciones de la medicina actual.



## 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 aquéllos 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; Ponce-Hornos y Langer, 1982; Dominguez-Mon, Ponce-Hornos, Gómez, Cannata y Taquini, 1984); c) Mediciones biofísicas (seguimiento fluorométrico de cambios redox, R.M.N. de compuestos de fosfato, 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; Kushmerick, 1897). Cualquiera sea el método utilizado es esencial que las conclusiones obtenidas a partir de mediciones químicas y/o mecánicas sean compatibles con aquéllas obtenidas a partir de mediciones termodinámicas.

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 aquéllos 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 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, dentro del error experimental, intercambiables.

## 2. Antecedentes históricos de los estudios miotérmicos

El uso de las técnicas miotérmicas data de más de un siglo atrás. Fue 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 esta 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; 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 realizaran 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 más grandes, para poder realizar estudios metabólicos e iónico-cinéticos simultáneos, fueron en general de baja sensibilidad y

lenta respuesta. Posteriormente, se desarrolló 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 se ha aplicado en esta tesis para el estudio mecánico-energético del músculo cardíaco (ver Métodos).

### 3. Métodos miotérmicos

Hasta el presente, en el estudio energético del tejido muscular 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 fluidos arteriales y venosos (Neill, Wagner, Messner, Krasnow 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:

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

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 corazón 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, Gluter 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 consiguen desarrollar un sistema (posteriormente mejorado por Mulieri y colaboradores, 1977) de termopilas que permiten medir producción de calor en preparaciones musculares cardíacas con características especiales (Ricchiuti y Gibbs, 1965;

Gibbs, Mommaerts y Ricchiuti, 1967). 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 este 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 5 mg) como, por ejemplo, el error asociado a la cantidad de solución adherida a la preparación 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 parámetros 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, características considerablemente superiores al método basado en diferencias de temperatura arterio-venosa.

### 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 127 unidades termosensibles cada uno, conectadas en serie y ubicadas 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 aquél 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 velocidad de respuesta, es mayor (constante de tiempo de 0,5 min) que la del método basado en la medición de diferencias de temperatura arterio-venosas (constante de tiempo de 2,7 min) pero menor que la del método de termopilas descrito en b. Su sensibilidad 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, como estas mediciones son técnicamente independientes de la existencia de perfusión, el método 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.

#### 4. Componentes energéticos del músculo cardíaco

Una forma de analizar el comportamiento energético del corazón es dividir el calor generado por el músculo en una fracción relacionada fundamentalmente con el estado de reposo mecánico (denominada calor basal) y otra que está asociada con la actividad mecánica (calor activo). La evaluación de ambos componentes se realiza estudiando calorimétricamente al músculo en actividad y en estado de reposo, tal que la diferencia entre la producción de calor total y aquella que se obtiene durante el reposo es el calor activo.

##### a. Metabolismo basal

Aún cuando no se lo estimule, el 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 conjunta-

mente con métodos radioisotópicos se ha estimado 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 en 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 (Loiselle, 1987; Ponce-Hornos, Márquez y Bonazzola, 1992) 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 y 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 constante 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).

#### b.1-Componentes del calor activo: estudios clásicos.

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 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 (o al menos minimizarse) del proceso de excitación-contracción-relajación toda interacción entre miofilamentos. En el músculo esquelético esto se ha logrado por estiramiento de las fibras (Rall, 1979). En el músculo cardíaco este procedimiento no puede emplearse, y la disminución de la interacción actina-miosina se ha intentado, en músculos papilares, disminuyendo la tensión de reposo 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, Loisselle y Wendt, 1988). En concentraciones de calcio fisiológicas los valores obtenidos por ambos métodos varían, según la especie bajo estudio, entre 1,6 y 2.6  $\text{mJ.g}^{-1}$  de tejido húmedo (Loisselle y Gibbs, 1979; Loisselle, 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). Un problema que se planteó sobre el primer método citado fue que la entrada de Ca era dependiente del estiramiento al cual se somete al tejido (Allen y Kurihara, 1982), y por lo tanto el calor de activación obtenido debería ser menor al correspondiente a una contracción en longitud óptima. Para evitarlo se desarrolló el método de "quick release" (Gibbs, Loisselle y Wendt, 1988) el cual permite el acortamiento de la longitud del tejido durante la iniciación de la contracción de modo que no exista generación medible de fuerza pero partiendo de la longitud óptima durante la estimulación eléctrica. Por este último método se obtuvieron valores más altos para el calor independiente de

tensión que en la técnica del preacortamiento (respectivamente 3.46 vs. 2.06 mJ.gr<sup>-1</sup> de tej.húmedo (Gibbs, Loisselle y Wendt; 1988.)

En resumen, actualmente existen numerosas evidencias experimentales que permiten sugerir la contribución de distintos procesos al metabolismo activo del músculo cardíaco. Sin embargo hasta el presente no fue posible la medición independiente de los calores de activación y dependiente de miofilamentos sin realizar una intervención que saque al tejido muscular de sus condiciones fisiológicas, lo cual permite dudar acerca de las magnitudes obtenidas. Con respecto a esto último basta con dar un repaso a la amplia gama de valores que existen en la literatura acerca del calor de activación, para cerciorarse que aún no es posible establecer una magnitud como definitiva.

b.2 - Separación de componentes del calor activo por medio del estudio cinético de la respuesta calorimétrica a una contracción muscular cardíaca.

Utilizando unas termopilas similares a las desarrolladas por Ricchiutti y Gibbs (Ricchiutti y Gibbs, 1965) pero de respuesta más rápida, Alpert y Mulieri obtuvieron registros de producción de calor como los que se muestran en la Fig 3, para un músculo contrayéndose a una frecuencia constante (Alpert y Mulieri, 1982). Los autores asumieron que el pico de la generación de calor de un latido marcaba la finalización del calor inicial, que estaría asociado al gasto de energía durante el ciclo contráctil, y el inicio de la recuperación (Alpert y Mulieri, 1982). La cuantificación de cada uno de los componentes asociados a un latido cardíaco en condiciones de estimulación estacionaria, ha sido abordada por los autores mediante la aplicación del método de Bugnard

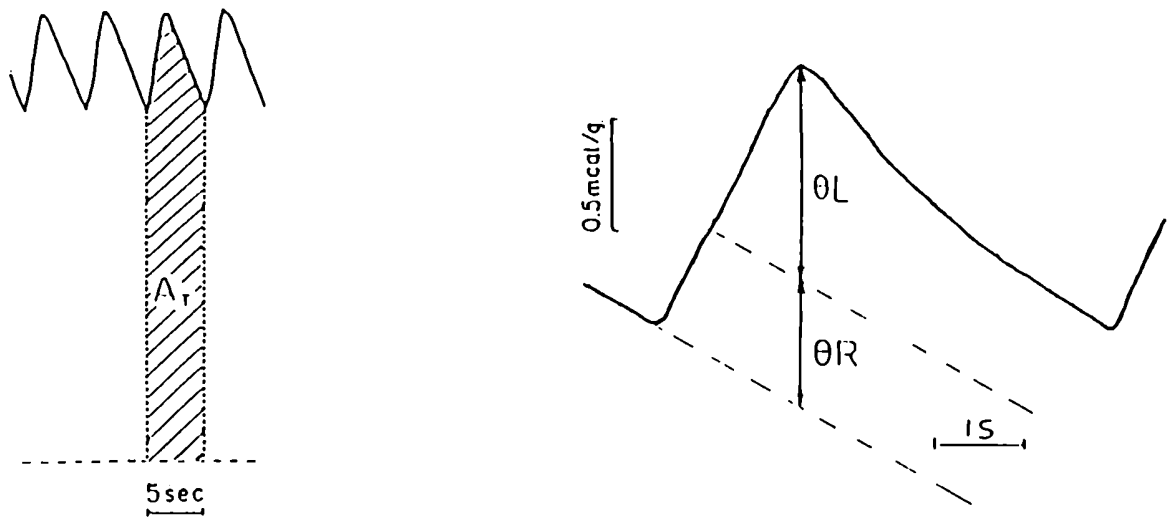


Figura 3: Análisis por el método de Bugnard de los componentes energéticos asociados a un latido en estado estacionario (esquemas realizados a partir de trazados originales de Alpert y Mulieri, Circ Res 50(4):491, 1982). A la izquierda se muestra el registro de un tren de latidos en estado estacionario. AT: area proporcional al calor total liberado en un latido. A la derecha está representada la oscilación en el registro producida por un latido. Están indicadas las alturas  $\theta_R$  y  $\theta_L$ , a partir de las cuales estos autores calculan las magnitudes de los dos componentes del calor inicial.

(Bugnard, 1934). En este método, esquematizado en la Figura 3b, se asume arbitrariamente como tiempo cero de un componente de producción de calor al máximo de la evolución del componente previo, lo que implica que no existiría contribución de un dado componente sobre el anterior pero sí de los componentes previos sobre los posteriores.

Los autores dividieron el calor inicial en una fase rápida y una más lenta posterior. Tanto el primero como el segundo componente son calculados en términos de calor liberado, a partir de las alturas indicadas en la Figura 3 ( $\theta_R$  y  $\theta_L$ ) como el área bajo la curva de enfriamiento del aparato sensor utilizado por estos autores. El tercer componente de producción de calor, que estos autores atribuyen al calor de recuperación (RH), se obtiene por diferencia entre AT (calor total por latido) y la suma de los dos primeros. Resumiendo, puede verse que estos investigadores postularon como explicación de sus trazados dos componentes iniciales asociados al proceso contráctil, y un tercero más tardío y obtenido por diferencia que fue relacionado con la recuperación energética. Con respecto al último de los componentes, este modelo implica una separación temporal entre el gasto y la recuperación de la energía, lo que se contradice con lo hallado previamente por otros autores y mostraría para el músculo cardíaco un funcionamiento más similar al músculo esquelético de lo que se pensaba. En otro trabajo (Mulieri y Alpert, 1982) también se mostró la existencia de dos componentes en el calor independiente de la fuerza a partir de experimentos realizados en músculos esquelético y cardíaco en medios hiperosmóticos para disminuir la interacción actomiosínica. El primero de estos componentes fue asociado a la unión de Ca a la troponina C mientras que el segundo sería el pegado y captación de este ión por la bomba de Ca



del RS.

Por lo descrito hasta aquí aún no ha sido posible identificar una fracción de calor independiente de la fuerza sin involucrar en la experiencia algún elemento no fisiológico como puede ser el preacortamiento del tejido o el sometimiento de este a soluciones hiperosmolares. De hecho, cualquiera de estas manipulaciones experimentales puede potencialmente afectar a los procesos responsables de la liberación de calor independiente de la fuerza que es justamente lo que se desea medir. Por otro lado las interpretaciones cinéticas realizadas imponen condiciones de evolución temporal que no necesariamente son ciertas. De hecho es de esperar al menos un cierto grado de solapamiento temporal entre, por ejemplo, la recaptación de Ca y la interacción actina-miosina durante la relajación.

## **Objetivos**

La finalidad última de este trabajo de tesis es contribuir al establecimiento de un modelo de excitación-contracción-relajación más completo y perfeccionado que el existente, haciendo hincapié en los sistemas que intervienen en la regulación del Ca durante una contracción miocárdica. Para esto y tomando como herramienta a la energética, fue objetivo de esta tesis diferenciar y cuantificar los procesos energéticos durante un ciclo contráctil, tanto en condiciones de estimulación a frecuencia constante como en latidos aislados (luego de un largo reposo). Como ya ha sido mencionado antes, si bien varios autores se entregaron a la tarea de dividir a la contracción en procesos energéticos diferenciables (Ponce Hornos, 1990), el avance ha sido lento y limitado. Los trabajos que involucraron la determinación simultánea de un mayor número de componentes los realizaron Alpert y Mulieri (1982), que reconocieron cinéticamente 2 componentes más un tercero calculado como la diferencia entre el calor total por latido y los dos cinéticamente reconocibles.

En la presente tesis se aplicó un sistema de ecuaciones para difusión de calor, estudiando la generación de calor de una contracción con mayor resolución que la descrita en la literatura hasta el momento.

Los estudios fueron realizados en ventrículo de rata. Esta preparación fue escogida por tener un retículo sacoplásmico muy desarrollado por lo que el Ca que interviene en la contracción provendría en mayor grado de esta organela comparativamente con el medio extracelular (Rich, Langer y Klassen, 1988).

A fin de poder identificar los componentes energéticos que se describen en este trabajo con los diferentes procesos en los que interviene el Ca durante la contracción, se practicaron dos formas de

intervenir sobre estos procesos. Por un lado se modificaron las concentraciones de Ca extracelular, y se estudió la respuesta mecánica y de los diferentes componentes energéticos a este ión. En segundo lugar se eligió como herramienta experimental perturbar al sistema músculo cardíaco suministrándole una sobrecarga de Ca (desde el medio extracelular y en cada contracción) por medio del agregado de un pulso extra de estimulación. Este pulso extra se aplica con un breve retardo (suficiente para superar el período refractario y lo más cercano a la tensión pico) con respecto al pulso correspondiente de la frecuencia utilizada (0.16 Hz). Este estímulo extra induce una nueva despolarización de la membrana celular con una concomitante entrada de Ca. Las consecuencias esperadas de esta perturbación serían cambios tanto mecánicos como energéticos, ya que el músculo deberá poner en juego sistemas de control para el Ca extra que ingresa a la célula durante el segundo estímulo. Por otro lado, esta última intervención permite también estudiar los efectos mecánico-energéticos producidos sobre la post-extrasistolia (contracción que sigue a continuación de la estimulación doble). Además, el estudio de estas contracciones provocadas por estimulaciones dobles o twins (Tw) permite obtener información acerca de los eventos mecánico-energéticos que ocurren durante situaciones patológicas como las contracciones extrasistólicas.

## **Materiales y Metodos**

## 1. Preparación biológica

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (200-300 g) que fueron heparinizadas (1500 Unidades FEU.kg<sup>-1</sup>) y sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital (100 mg.kg<sup>-1</sup>) administrada por vía intraperitoneal. El corazón fue rápidamente retirado del animal por toracotomía y sumergido en solución de Krebs (0.5 mM de Ca) a temperatura ambiente. Luego el músculo fue inmediatamente canulado vía aorta y perfundido en forma retrógrada por el método de Langendorff. Para evitar el automatismo y tener absoluto control de la frecuencia de contracción, se retiraron cuidadosamente las aurículas y cuando fue necesario se practicó una pequeña incisión sobre la base del septum, con lo que a 25 °C el músculo permanecía en reposo a menos que fuera estimulado. En todos los casos el tiempo transcurrido desde la toracotomía hasta el comienzo de la perfusión fue inferior a los tres minutos. Desde el momento de la canulación el músculo es introducido dentro de un soporte de Kel-F en forma de anillo, construido especialmente para adaptarse a la cámara interna del calorímetro. Seguidamente se introdujo en el ventrículo izquierdo un globo de látex de volumen regulable, conectado a través de una cánula a un transductor de presión Statham, cerrando dicho ventrículo por medio de una sutura.

Luego de concluida esta operación, el músculo incluido en el soporte fue introducido en un calorímetro como el que se muestra en la Figura 4 y se le conectaron los electrodos de estimulación. La frecuencia de estimulación se controló mediante un estimulador Grass SD 9.

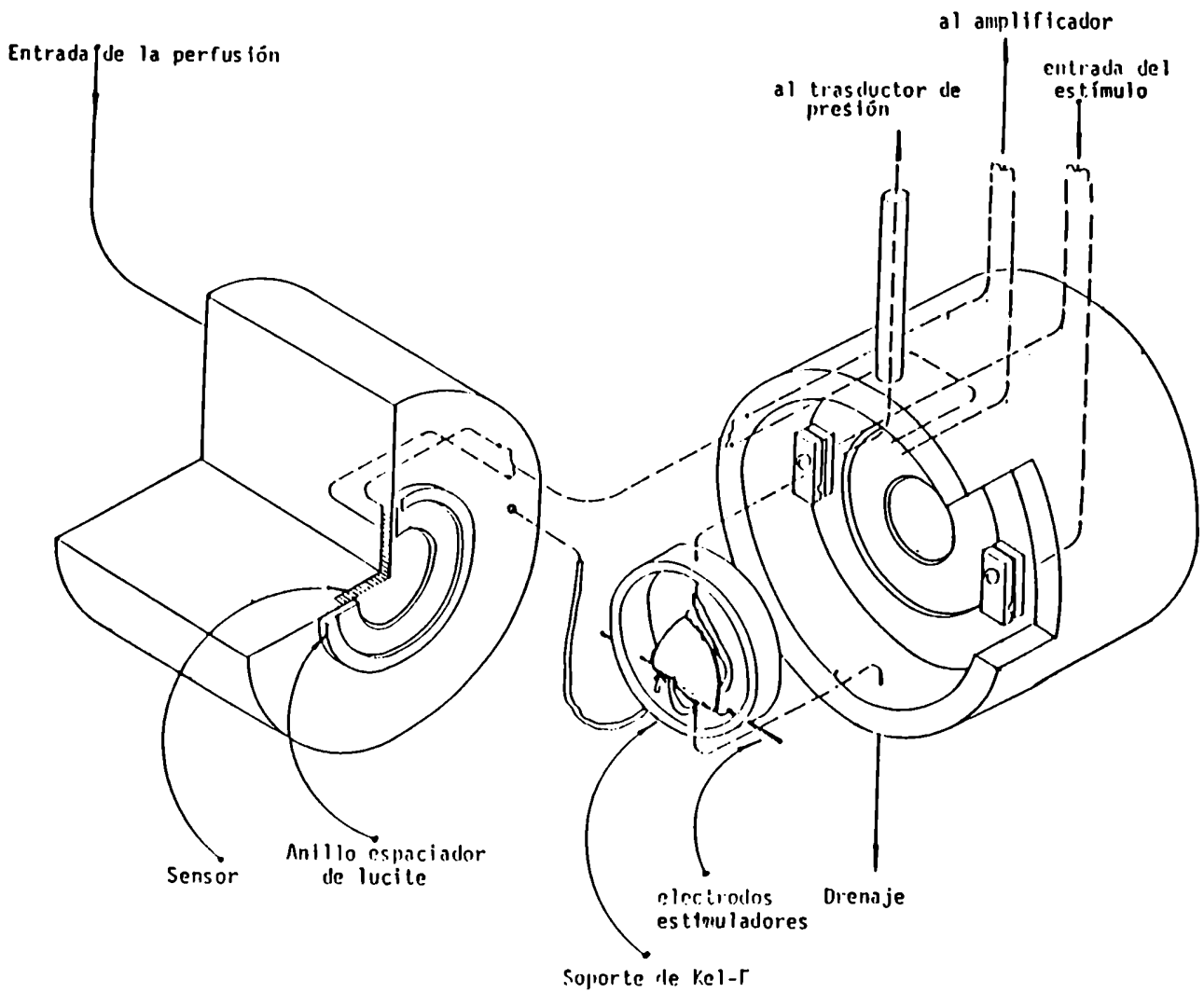
Los músculos fueron perfundidos dentro del sistema calorimétrico a 5.0 ml.min<sup>-1</sup> con una solución de Krebs a 25°C.

Al finalizar cada experimento el tejido fue removido del calorímetro, escurrido durante 15 s sobre un papel de filtro Wathman 50, pesado en un recipiente previamente tarado y secado a 110 °C hasta peso constante a fin de obtener el porcentaje de agua tisular ( $81.9 \pm 0.5 \%$ ,  $n=21$ ). En todos los casos en que los resultados correspondan a experimentos realizados en músculos,  $n$  corresponde a número de músculos (excepto en los ajustes, donde corresponde a número de puntos)

## 2. Mediciones miotérmicas y mecánicas simultáneas

Las mediciones miotérmicas se realizaron utilizando el sistema calorimétrico mostrado en la Figura 4. 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, Ricchiuti, Langer, 1982; Dominguez-Mon, Ponce-Hornos, Gómez, Cannata, Taquini, 1984; Ponce-Hornos, Bonazzola, Taquini, 1987).

El calorímetro que se muestra en la Figura 4 está confeccionado en cobre. Ha sido muy mejorado con respecto al original (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982) en sensibilidad y velocidad de respuesta. Utiliza actualmente dos juegos de unidades termosensibles (Cambion-Cambridge Thermoionic) cada una con 127 unidades conectadas en serie y ubicadas entre la cámara interna y la gran masa de cobre. El calorímetro se sumerge en un baño termostatzado que es controlado por un baño de agua (frío-calor) que regula en  $\pm 0.003$  °C, y en el cual se mantiene en equilibrio térmico la solución de perfusión. El músculo, perfundido con la solución térmicamente equilibrada y montado en el 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



**Figura 4:** Diagrama del cuerpo calorimétrico. El calorímetro una vez cerrado se sumerge en un baño termostatzado que por simplicidad del dibujo no se muestra en el diagrama.



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 diferencias 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. En el rango de velocidades de perfusión utilizadas para las distintas preparaciones, la respuesta calorimétrica alcanzó un "plateau" dentro de los dos minutos con una constante de velocidad de alrededor de  $0.03 \text{ s}^{-1}$ .

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 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).

La perfusión entra al calorímetro con una cantidad finita de energía dada por el producto entre la presión de perfusión y el flujo.

Esta energía es disipada como calor en la cámara interna del calorímetro por lo que esta contribución debe substraerse a las mediciones calorimétricas. La misma se evaluó a partir de la ecuación 1 (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982):

$$\dot{H}_{pp}=0.0022 \cdot PP \cdot V+0.009 \quad (1)$$

donde:

$\dot{H}_{pp}$ = potencia calculada dependiente de la presión y del flujo (mW)

PP= presión de perfusión (en mm de Hg)

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

constantes= 0.0022 mW.min/mm Hg.ml; 0.009 mW.

La presión de perfusión a la entrada del calorímetro (justo antes de la cánula de perfusión) fue 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 presión en la cavidad ventricular se registró también a través de un transductor de presión idéntico al utilizado para la presión de perfusión, que fue conectado a uno de los canales del polígrafo. El cuarto canal se utilizó para derivar la señal recibida por este transductor. Tanto las mediciones mecánicas como energéticas presentadas en este trabajo fueron realizadas a un volumen intraventricular óptimo para la generación de fuerza, el que fue determinado al comienzo de cada experimento.

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 ( $\dot{H}t$ ) y la producción de calor en ausencia de estimulación ( $\dot{H}r$ ), dividiendo por la frecuencia ( $f$ ) a la que el músculo fue estimulado:

$$\frac{(\dot{H}t - \dot{H}r)}{f} = \frac{\dot{H}a}{f} = H'a \quad (2)$$

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 continua y simultáneamente, presión de reposo (PR), máxima presión desarrollada (P), velocidad máxima de contracción (+P), velocidad máxima de relajación (-P), presión de perfusión (PP), producción de calor total ( $\dot{H}t$ ), producción de calor asociada al reposo mecánico ( $\dot{H}r$ ) y producción de calor activo ( $\dot{H}a$ ). Además de estos parámetros mecánicos y energéticos se dividió al evento contráctil en cuatro períodos (Figura 5): desde el inicio de la contracción hasta la máxima velocidad de contracción ( $tc1$ ), desde +P hasta que la presión generada se hace máxima ( $tc2$ ), desde este punto hasta la máxima velocidad de relajación ( $tr1$ ), y finalmente desde -P hasta el fin de la contracción ( $tr2$ ). A partir del trazado de la presión es posible calcular la integral presión tiempo (IPT). Se calcularon también las relaciones +P/P y -P/P como índices de las capacidades de contracción y relajación del tejido. Por otra parte el sistema permite el análisis de latidos individuales (registros llevados a cabo a alta sensibilidad y a alta velocidad de registro).

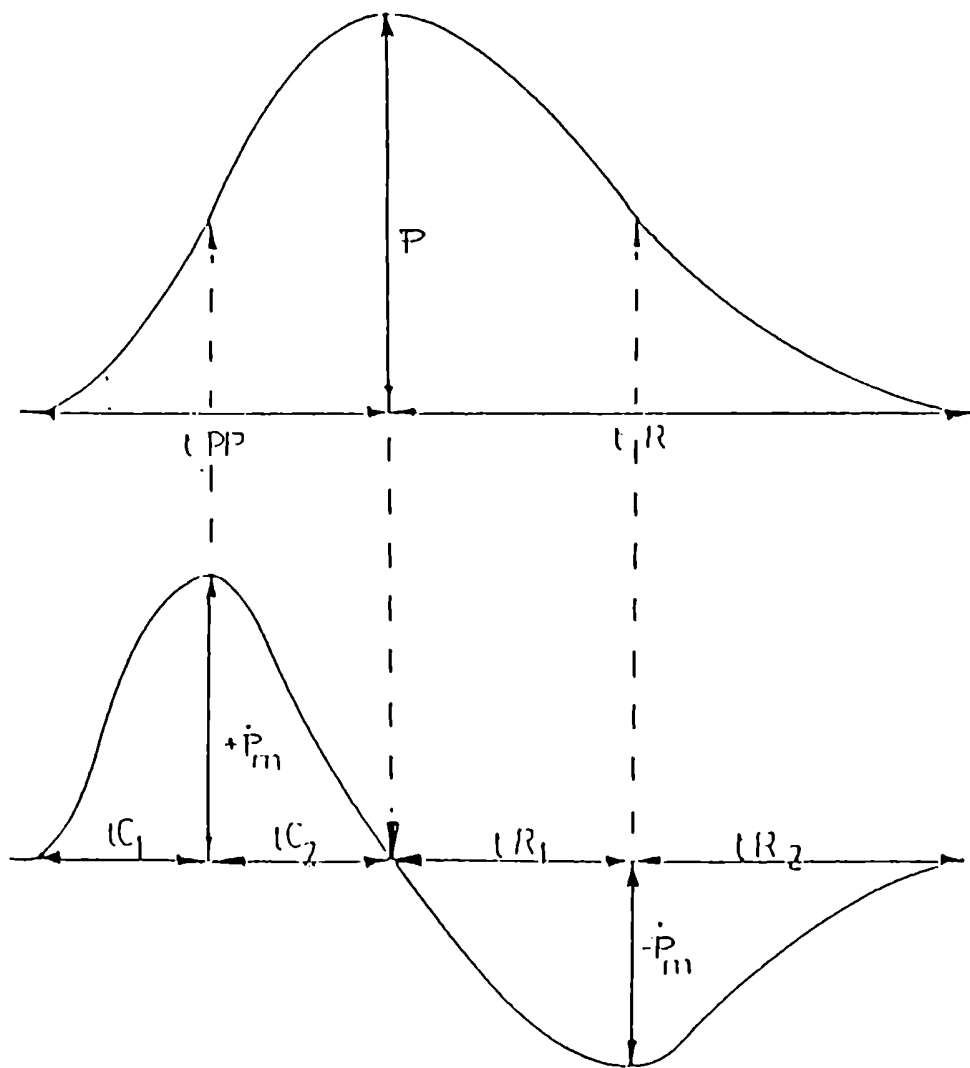


Figura 5: Representación esquemática de un trazado de presión isovolumétrica a  $l_0$ , obtenida por inflado del balón de látex intraventricular (parte superior) y su primera derivada (parte inferior), en donde se indican los parámetros mecánicos evaluados.  $P$ : presión isovolumétrica;  $+\dot{P}$ : máxima velocidad de desarrollo de fuerza;  $-\dot{P}$ : máxima velocidad de relajación;  $t_{PP}$ : tiempo a la presión pico, que incluye  $t_{C1}$  y  $t_{C2}$ ;  $t_{R}$ : tiempo de relajación, que abarca  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$ .

Los registros de la producción de calor de latidos individuales y los registros mecánicos para determinar tiempos de la contracción o la IPT fueron realizados a una velocidad de papel de  $25 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Los parámetros mecánicos promedio para contracciones obtenidas a  $[\text{Ca}]=0.5 \text{ mM}$  y frecuencia de  $0.16 \text{ Hz}$  ( $n=20$ ) fueron:  $P=26\pm 2 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ;  $\text{IPT}=9.0\pm 0.8 \text{ mN}\cdot\text{s}\cdot\text{mm}^{-2}$ ;  $+\dot{P}=250\pm 20 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $-\dot{P}=97\pm 6 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $+\dot{P}/P=9.8\pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ ;  $-\dot{P}/P=3.8\pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ . Para estos mismos experimentos se obtuvieron los siguientes tiempos de contracción:  $t_{c1}=0.10\pm 0.01 \text{ s}$ ;  $t_{c2}=0.11\pm 0.01 \text{ s}$ ;  $t_{r1}=0.21\pm 0.01 \text{ s}$ ;  $t_{r2}=0.37\pm 0.02 \text{ s}$ . El  $H'a$  obtenido en las mismas condiciones fue igual a  $14\pm 1 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ .

### 3. Soluciones

La solución que se utilizó para la perfusión en condición control contenía (en  $\text{mmol/l}$ ):  $\text{NaCl}$  120;  $\text{KCl}$  6.0;  $\text{CaCl}_2$  0.5;  $\text{MgCl}_2$  1.0;  $\text{NaHCO}_3$  25;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5 y glucosa 6.0. Las soluciones fueron continuamente burbujeadas con una mezcla gaseosa que contenía 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  (Ph 7.3 - 7.4).

En los experimentos en los que se modificó la concentración de  $\text{Ca}$  (0.3, 0.5, 1 y 2  $\text{mM}$ ) se mantuvieron constantes las concentraciones de los otros compuestos y no se hicieron correcciones por cambios en la osmolaridad. Para el análisis de los resultados, se calculó la actividad de  $\text{Ca}$  correspondiente a cada una de las soluciones utilizando el programa IONMIX (Vericat y Grigera, 1982; Humffray A, 1983). Para las concentraciones de  $\text{Ca}$  mencionadas las actividades resultantes fueron de 0.083, 0.13, 0.276 y 0.547 respectivamente

#### 4. Métodos estadísticos

Se utilizó el criterio de cuadrados mínimos tanto para los ajustes de los puntos obtenidos a partir de los registros calorimétricos temporales como para las regresiones entre dos parámetros experimentales. Para los ajustes no lineales se utilizó un programa basado en el algoritmo de Marquardt (CRISP software). Las rachas surgidas de los ajustes se estudiaron por medio de un test de signos (Documenta Geigy, 1962) y las comparaciones entre ajustes obtenidos con diferente número de componentes se hicieron con un test de Fisher (Documenta Geigy, 1962).

Para las comparaciones de tipo apareado se utilizó un test de "t" para muestras apareadas. Para las comparaciones no apareadas entre tratamientos se aplicó un test de Student en el caso de dos tratamientos, y uno de Kruskal-Wallis seguido de uno de Mann Whitney en casos de más de dos tratamientos. En todos los casos se consideró significativo el nivel de  $p < 0.05$ . Todos los resultados se expresan en forma de media ± error estándar.

Los resultados calorimétricos se expresan por gramo de tejido húmedo salvo que se indique lo contrario.

#### 5. Protocolos experimentales

Una vez montado el músculo en la cámara calorimétrica se lo llevó a la longitud óptima para la generación de presión. Luego se esperó un

mínimo de una hora para iniciar el experimento, período que asegura la reestabilización del sistema. Con el corazón en reposo mecánico se determinó entonces el Hr y se inició la estimulación a 0.16 Hz.

Cuando tanto la producción de calor como los parámetros mecánicos llegaron a un estado estacionario (a la frecuencia de estimulación de 0.16 Hz) se obtuvieron trazados de generación de calor a alta sensibilidad (1 a 10  $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-1}$ ) de modo que fuera posible registrar la respuesta calorimétrica a latidos individuales (los que de aquí en más se identificarán como "latidos estacionarios"). Estos trazados se obtuvieron para latidos estacionarios controles, "twins" o de estimulación pareada (TW) y "posttwins" (PTW) (estos últimos sólo en algunos experimentos). Este protocolo se realizó en condiciones control (0.5 mM de Ca), a diferentes concentraciones de Ca en la solución de perfusión y en presencia de cafeína.

En los latidos de tipo Tw se aplicó una separación de 200 ms entre las dos estimulaciones, esto implica que el 2º estímulo cae muy próxima al tiempo de máxima generación de presión por parte del músculo. Esto se realizó con la intención de provocar una sobrecarga de Ca en el citosol en un período en el cual los miofilamentos se encuentren al menos parcialmente ocupados por este ión. Como se puede observar en la Figura 6 la entrada de Ca provocada por la 2º estimulación no aumentó P, aunque sí incrementó IPT.

Para la obtención de los trazados de generación de calor por latidos estacionarios se corrió el papel del polígrafo a 25  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  lo cual permite obtener una resolución de un punto cada 0.04 s (debido a que la mínima división del papel en la escala temporal es de 1 mm). Como la producción de calor para un latido de este tipo está montada sobre la

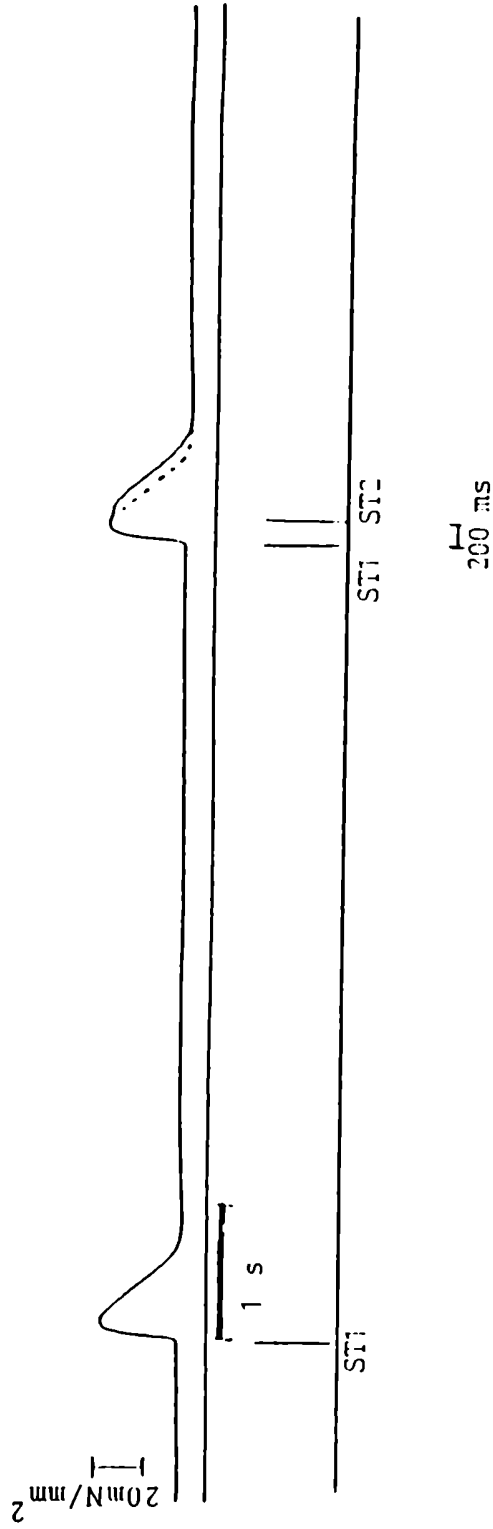


Figura 6: Registro del desarrollo de presión (en  $\text{mN/mm}^2$ ) de un latido control (C) y de un latido TW en un músculo estimulado a 0.16 Hz. En todos los experimentos en los que se estudiaron extrasistolias el análisis se realizó en forma pareada versus el control previo al estímulo extrasistólico. En el trazado correspondiente a TW se puede observar el aumento IPT respecto de C (representado por la línea punteada). En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia de estímulos (ST) para el control y el TW. La estimulación se realizó con un estimulador de onda cuadrada y un voltaje 30% superior al umbral (generalmente 3V).



pendiente de caída del latido previo, se debió obtener el trazado del curso del registro calorimétrico de un latido cuando la estimulación es suspendida a fin de utilizarlo como línea de base (Figura 7). Igual procedimiento se repitió con los latidos TW para ser utilizados como línea de base de los de tipo PTW.

Se registraron también latidos aislados (luego de un reposo mayor a 5 minutos), de modo que su línea de base resulta ser una constante (el  $\dot{H}r$ ) a 0.5 mM de Ca en la solución de perfusión. En otro grupo de experimentos se estudió el efecto de la anoxia (provocada por burbujeo con N<sub>2</sub>) sobre latidos aislados.

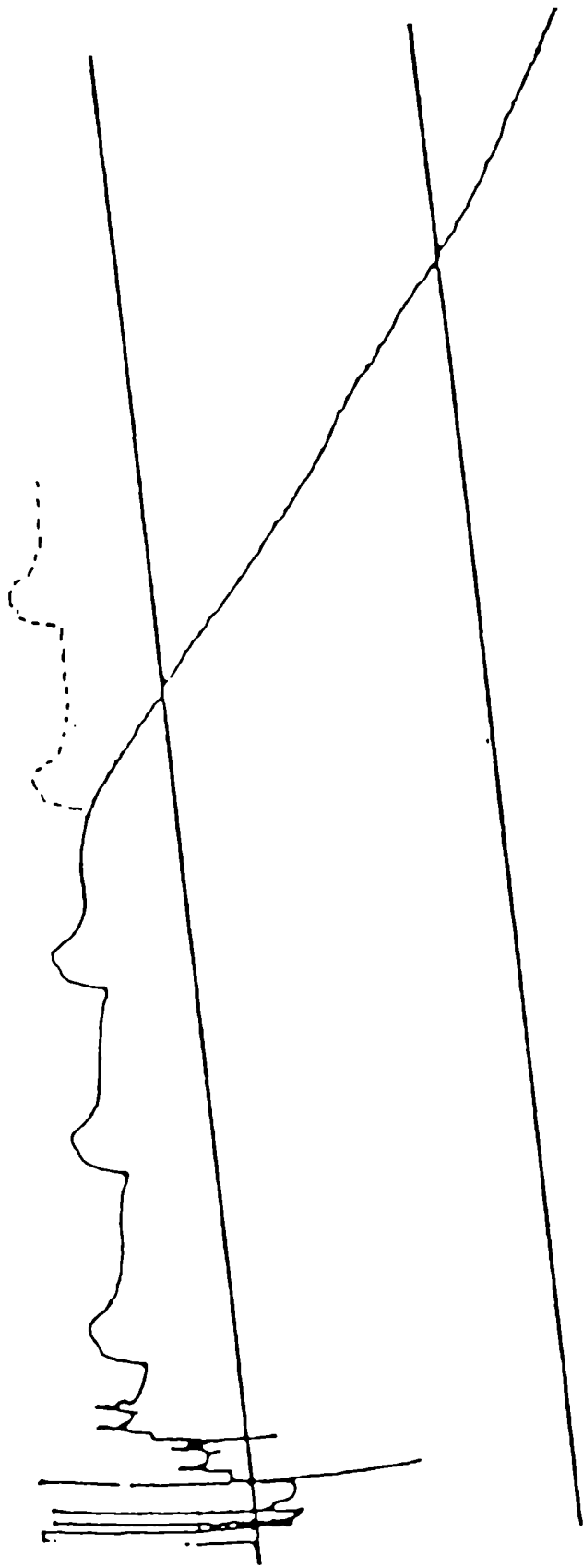


Figura 7: Registro de la producción de calor de un músculo latiendo a 0.16 Hz. Luego del tercer latido que está registrado en el trazado (en línea llena) se suspendió la estimulación a fin de obtener la línea de base sobre la cual se montan estos latidos.

## **Resultados**

En la primera parte de los Resultados se describen cualitativamente las respuestas calorimétricas asociadas a una contracción, y a continuación se analizan estas curvas con un método ya clásico en la literatura.

La segunda parte está enfocada a describir la aplicación de un modelo de análisis que permite un estudio más completo de los registros miotérmicos obtenidos.

La caracterización biológica de los componentes de calor predichos por el modelo, queda reservada a las dos siguientes secciones de estos resultados. En la tercera se analiza la posible relación de cada componente con la presión generada por el músculo y con la presencia de  $O_2$  en la solución de perfusión. En la cuarta sección se estudian las contracciones estacionarias y los efectos que la variación del Ca externo y las intervenciones que modifican la oferta de Ca al citosol, producen sobre el sistema analizado.

Finalmente, en la quinta sección se estudian las contracciones extrasistólicas y las post-extrasistólicas. Se analizarán en esta sección los efectos producidos por cambios en las concentraciones de Ca extracelular y por agregado de cafeína sobre estas contracciones en particular.

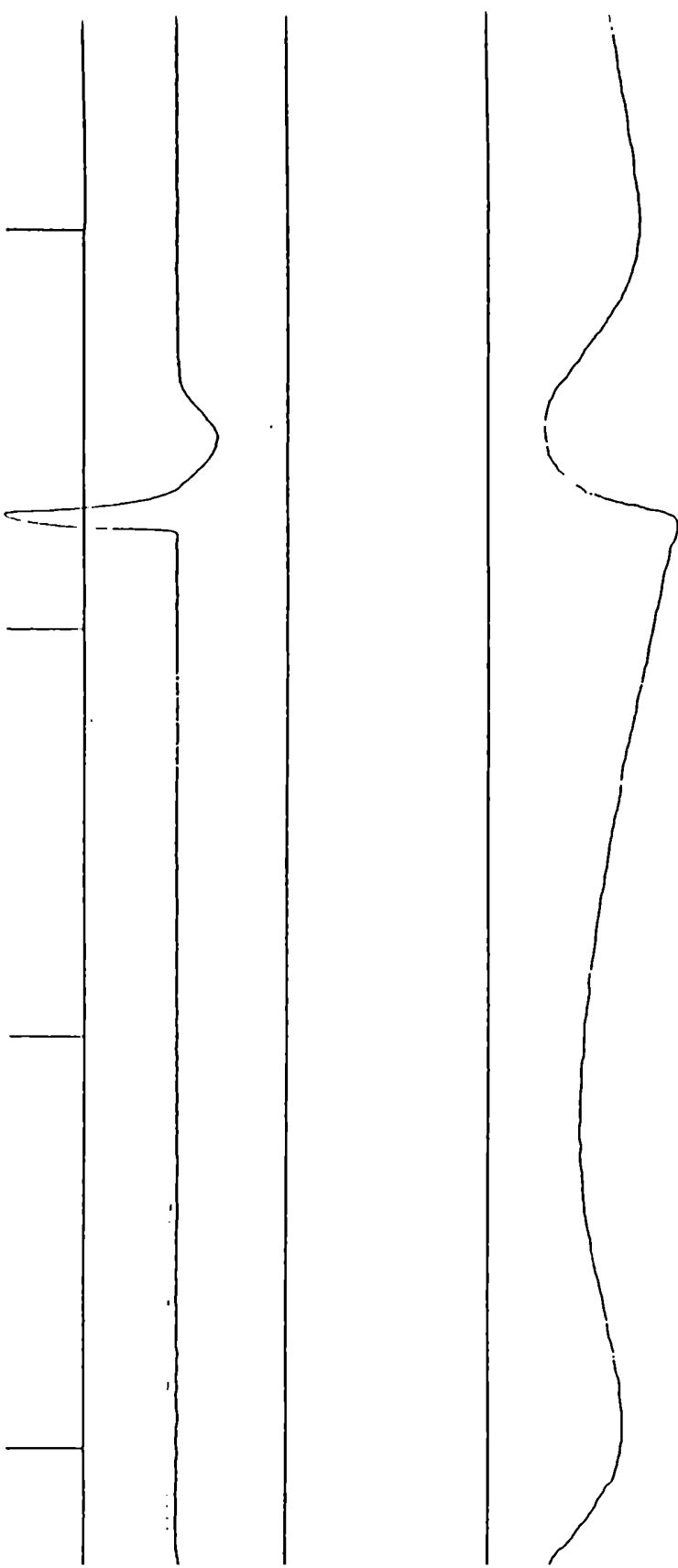
## 1 - Análisis clásicos de los registros calorimétricos de latidos controlados (estacionarios y aislados)

Se analizó la respuesta miotérmica asociada a una contracción luego de un período de reposo mecánico prolongado (de al menos 5 minutos), y a esto se lo llamó latido aislado. También se estudió la respuesta calorimétrica asociada a un latido único extraído de un tren de estimulaciones a 0.16 Hz una vez alcanzado el estado estacionario de generación de fuerza, y a este tipo de contracciones se las denominó latidos estacionarios.

El registro de la producción de calor en un latido aislado o en un latido estacionario da una respuesta compleja que, por la presencia de 2 máximos y bruscos cambios en las pendientes del registro, sugiere la existencia de varios componentes (Figuras 8 y 9). A primera vista se puede observar una subida rápida inicial que se prolonga hasta aproximadamente los 500 ms. A partir de este punto se observa un cambio brusco de pendiente que se prolonga en una fase más tardía que llega a un pico entre 1 y 2 s y, finalmente, aparece una tercera fase mucho más lenta. En latidos aislados se hace evidente además una meseta a partir de los 40 a 60 s, que aproximadamente entre los 80 a 120 s comienza a caer con la constante velocidad del calorímetro.

Las dos primeras fases de producción de calor mencionadas parecen, a primera vista, homologables a las descritas por Alpert y Mulieri (1982) en músculos papilares de conejo. Estos autores utilizaron el método de Bugnard (1934) para analizar sus registros. Por aplicación de este método a los registros experimentales obtenidos en este trabajo, tanto para latidos estacionarios como aislados (Figuras 8 y 9), se

Figura 8: Registro temporal del desarrollo de presión (en  $\text{mN/mm}^2$ ) abajo, la producción de calor (en  $\mu\text{W}$ ) en el centro y la derivada de la presión con el tiempo arriba. En el inset se muestra el trazado de generación de calor de un latido hasta su retorno a la línea de base, en el cual se puede observar claramente la existencia de una meseta previa al enfriamiento final.



llegó a los resultados que se muestran en la Tabla I. La magnitud del primer componente mencionado es comparable con la obtenida por aquellos autores. Contrariamente, la magnitud del segundo componente es inferior a lo presentado en la bibliografía. Como los estudios realizados por Alpert y Mulieri fueron hechos en papilares de conejo, mientras que en esta tesis se trabajó en ventrículo de rata, estos resultados podrían indicar una diferencia interespecie en lo que respecta a esta segunda fracción de calor.

TABLA I  
VALORES COMPARATIVOS DE COMPONENTES ENERGETICOS

	Bibliografía(*) (L.E.)	Este Trabajo (L.E., n=10)	Este trabajo (L.A., n=8)
1er Comp (mJ.g <sup>-1</sup> )	1.59 - 1.9	2.0±0.2	2.4±0.4
2do Comp (mJ.g <sup>-1</sup> )	4.48 - 5.06	1.8±0.2	2.3±0.5

(\*)Datos extraídos de: Circ Res 50:491,1982; Circ Res 56:78,1985;  
Basic Res Cardiol 82(2):252, 1987

L.E.: latido estacionario; L.A.: latido aislado

Es de hacer notar que en estos registros miotérmicos tanto en



latidos estacionarios como aislados se observa la aparición de un tercer componente de generación de calor cinéticamente distinguible con un máximo temporalmente posterior a los dos primeros componentes detectados hasta el presente por otros métodos miotérmicos (ver Figuras 8 y 9).

El objetivo de la próxima sección de resultados es progresar en la definición del número total de componentes que hay en la respuesta miotérmica a una contracción, y además evaluar la contribución que tiene cada uno al total del calor liberado por un latido.

## 2 - Descripción de un modelo para la evaluación de las respuestas observadas.

Para la evaluación cuantitativa de las respuestas miotérmicas se estudió en primer lugar la respuesta del calorímetro cuando se disipan cantidades conocidas de calor en la cámara interna. Esto fue llevado a cabo haciendo pasar corriente alterna o continua por resistencias de distinta geometría y músculos (en total 4) perfundidos. Por cada ventrículo o resistencia utilizados se obtuvieron varios registros. En la Figura 10 (en línea continua) se muestra la respuesta obtenida cuando la disipación de calor desde una resistencia dentro de la cámara interna es mantenida el tiempo suficiente para que el calorímetro integre la señal. Esta respuesta pudo ajustarse por un método no lineal a una ecuación de tipo difusional para lámina plana con retardo exponencial en la detección por parte de las unidades termosensibles (Crank, 1956) (Ec. 1).

$$\dot{H}_{(t)} = \dot{H}_0 \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \quad \text{Ec.1}$$

Donde:  $A_0 = (\mu \cdot 4 \cdot \pi^{-2} \cdot \beta^{-1})^{-0.5} \cdot \text{tg}[(\mu \cdot 4 \cdot \pi^{-2} \cdot \beta^{-1})^{-0.5}]$

$\mu =$  constante de velocidad de enfriamiento del calorímetro ( $s^{-1}$ ),

$\beta =$  constante de velocidad para el retardo en la detección ( $s^{-1}$ ),

$A_i = 1 / ((2 \cdot i + 1)^2 \cdot [1 - (2 \cdot i + 1)^2 \cdot \mu \cdot \beta^{-1}])$

$\alpha_i = (2 \cdot i + 1)^2 \cdot \mu$

Se hizo necesaria la suposición de un retardo en la detección debido a que si se analizaban los registros de generación de calor en la

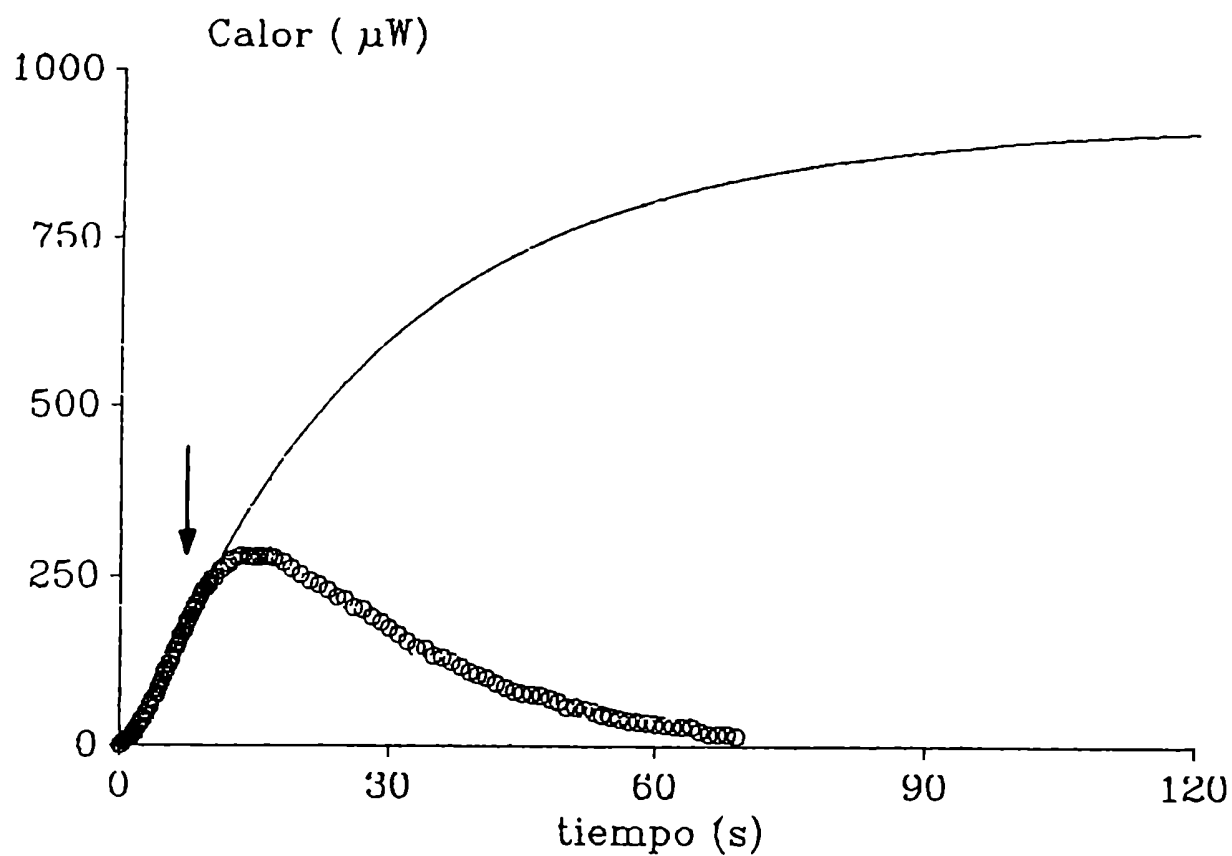


Figura 10: Respuesta calorimétrica digitalizada obtenida por disipación de cantidades conocidas de calor en la cámara interna del sistema microcalorimétrico. Disipación mantenida (línea continua); Disipación interrumpida (O). La flecha indica la finalización de la aplicación.

cámara interna (fuesen registros miotérmicos, o pulsos eléctricos en músculos o resistencias) a alta velocidad, todos presentaban un "lag" al comienzo. Este detalle no había sido detectado en los trabajos previos realizados con este calorímetro debido a que siempre se había trabajado a bajas velocidades de registro. Se utilizó una ecuación difusional para lámina plana debido a que el ventrículo, que es hueco, queda en contacto a ambos lados con las unidades de detección (que son planas). En consecuencia se puede considerar al sistema como dos láminas de espesor finito en contacto con sus respectivas unidades termosensibles. Como alternativa se realizaron ajustes de los mismos registros con una ecuación difusional suponiendo una geometría esférica de la fuente, pero se obtuvieron sistemáticamente coeficientes de correlación menores que los observados con la función para lámina plana. Esto es explicable ya que la geometría esférica implica difusión radial desde el centro de la esfera. En el caso del músculo cardíaco, aunque podría ser considerado una esfera, el hecho de ser hueco le impide la difusión radial desde el centro. Las ecuaciones para geometría cilíndrica se descartaron, ya que aparte de suponer también difusión desde el centro, no se asemeja a la forma que toma el músculo fuera o dentro de la cámara calorimétrica.

Si se toman para el ajuste los primeros puntos de las respuestas calorimétricas obtenidas tanto en resistencias como en músculos, la ecuación de ajuste predice el "plateau" de la curva, que representa la potencia aplicada. Pese a que las respuestas tardaron siempre más de 120 s en llegar a la saturación, la ecuación predijo la potencia aplicada cortando la curva experimental incluso a tiempos menores de 500 ms. Finalmente, el factor limitante resultó ser los grados de libertad que quedaban cuando se cortaban las curvas y no los tiempos de aplicación

tomados. La potencia predicha se correlacionó con la potencia aplicada con un  $r=0.999$ , pendiente=1 y ord.origen=0, para  $n=36$ . Esto permite suponer que estaríamos en condiciones de estimar la potencia generada dentro de la cámara del calorímetro para respuestas transitorias (que no llegaron a la meseta).

Si la generación de calor se interrumpe (flecha de la Figura 10) tempranamente (curva en O de la Figura 10), el registro calorimétrico se mantiene en ascenso hasta llegar a un máximo, luego de lo cual comienza a descender con la constante de enfriamiento del calorímetro. Es importante aclarar que, como muestra la Figura 10, no era posible ajustar toda la curva mediante la Ec.1 debido a que la curva experimental se desvía del comportamiento predicho por esta ecuación cuando se interrumpe el proceso de generación de calor. De este modo sólo los puntos experimentales relacionados con el tiempo en que se mantuvo el estímulo son ajustables a la ecuación difusional descrita. La respuesta transitoria fue ajustada tomando en cuenta su parte creciente, es decir hasta que el registro calorimétrico no evidenciaba ascenso, a una función del tipo de la Ec. 1 a la cual se le substrajo una fracción proporcional de lo que se está generando a todo tiempo (Ec.2).

$$\dot{H}_{(t)} = \dot{H}_0 \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-a_i \cdot t}) \cdot e^{-\tau \cdot t} \quad \text{Ec.2}$$

Donde:  $\tau$  = parámetro de ajuste que tiende a 0 cuando la generación es mantenida (tiempos prolongados, curva en línea continua de la Figura 10).

Es importante aclarar que en los procesos asociados al evento contráctil el tiempo de interrupción del proceso es justamente una de las incógnitas a develar por lo que se hace imposible aplicar la Ec. 1 y por lo tanto predecir la potencia. En cambio, la ecuación 2 define con precisión el trascurso del trazado hasta el pico.

El enfriamiento desde el pico de la curva experimental hasta  $\infty$  se ajustó a la ecuación 3 (una transformación de la ecuación 1 en una función descendente de  $\dot{H}$  con el tiempo), donde  $\dot{H}_{tp}$  es una constante igual al valor alcanzado por la curva experimental en el pico.

$$\dot{H}_{(t)} = \dot{H}_{tp} \cdot (A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} + 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \quad \text{Ec. 3}$$

De la integral analítica de la curva de generación (ecuación 2) desde  $t=0$  a  $t=tp$  (tiempo pico) más la integral analítica de la función de respuesta del calorímetro desde  $tp$  hasta  $t=\infty$  (ecuación 3) se puede estimar la energía total disipada en forma de calor dentro de la cámara interna del sistema calorimétrico (Ec. 4).

$$H = \int_0^{tp} \dot{H}_0 \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \cdot e^{-r \cdot t} + \int_{tp}^{\infty} \dot{H}_{tp} \cdot (A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} + 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \quad \text{Ec. 4}$$

Las energías calculadas de este modo se correlacionaron linealmente con las energías reales disipadas dentro de la cámara, obteniéndose una correlación altamente significativa entre energía estimada y energía entregada, con pendiente igual a 1 y ordenada al origen no diferente de 0 (Figura 11).

Como una forma de validar el método de ajuste en respuestas calorimétricas complejas (como las provenientes de latidos), se realizaron simulaciones en las cuales se aplicaron sobre una resistencia 3 pulsos de corriente. Estos fueron todos de diferente magnitud, comenzaron juntos y finalizaron a tiempos distintos (100 ms, 1-3s y más de 30 s). La respuesta calorimétrica fue digitalizada y analizada por combinación lineal (2, 3 y 4 componentes) de ecuaciones del tipo dado por la ecuación 2.

$$H_{(t)} = \sum_{j=1}^n H_{0j} \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \cdot e^{-\gamma_j \cdot t} \quad \text{Ec.5}$$

n=numero de componentes

Sólo se utilizaron para el ajuste aquellos puntos comprendidos desde el tiempo 0 hasta el tiempo en el cual la señal comenzó a caer con la constante de enfriamiento del calorímetro. Todas las simulaciones estudiadas fueron mejor descritas por 3 que por 2 componentes, mientras que el agregado de un cuarto no mejoró los ajustes. En todos los casos la magnitud de la energía calculada a partir del ajuste resultó comparable a la aplicada durante el experimento (97.5±1.0 %).

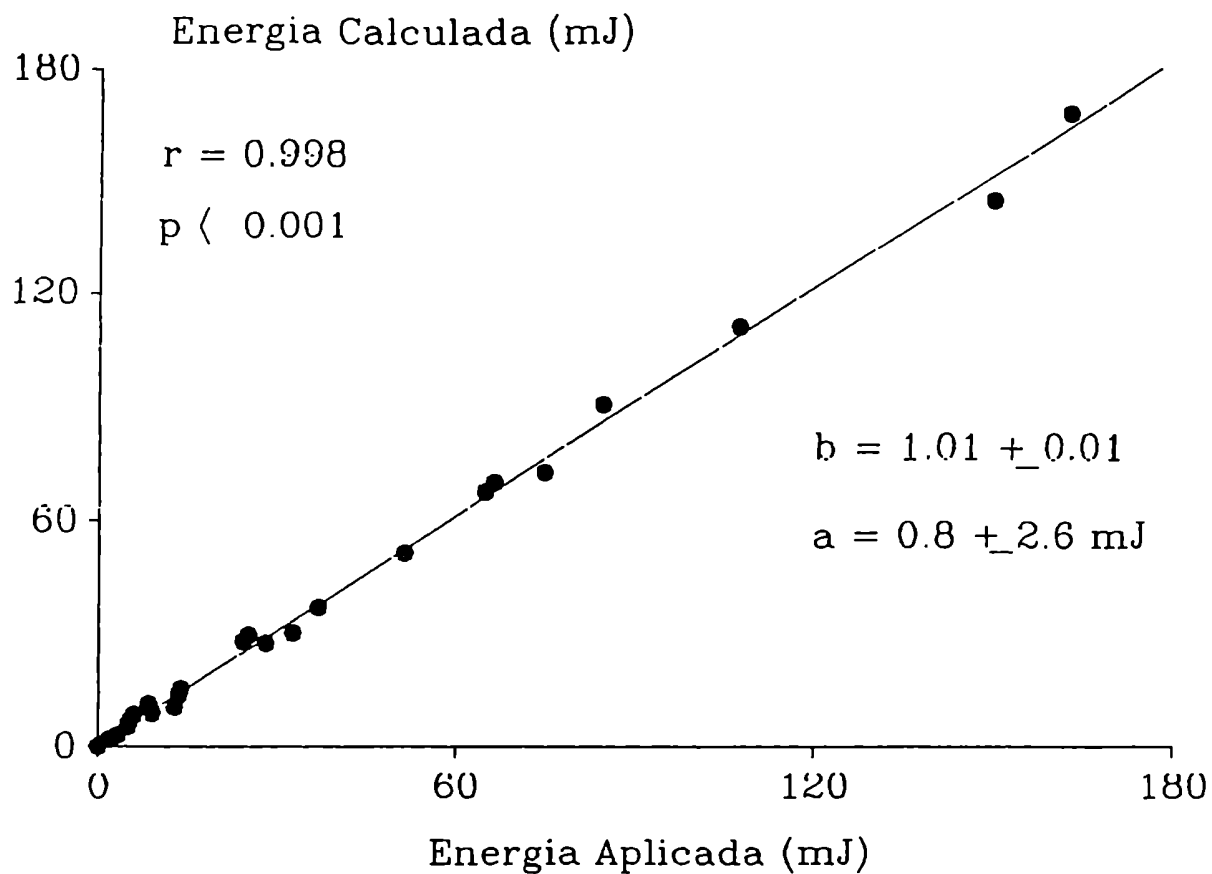


Figura 11: Energía estimada (calculada) vs. energía entregada (real) a la cámara interna del sistema microcalorimétrico utilizado.



Establecido el patrón de respuesta del sistema calorimétrico tanto para señales estacionarias como para transitorias, se ajustaron las respuestas miotérmicas obtenidas para latidos estacionarios y aislados a una función del tipo dado por la Ec. 5. Los registros calorimétricos de los latidos se ajustaron al número mínimo de componentes que no generó rachas significativas, y rechazando el agregado de componentes adicionales siempre que estos no mejoraran significativamente la bondad del ajuste (evaluada según un test de Fisher (Documenta Geigy, 1962)). Los parámetros iniciales para llevar a cabo los ajustes se estimaron ubicando los picos de los componentes según los máximos y cambios bruscos de pendiente observados en el trazado.

Los latidos obtenidos en condiciones de estimulación a 0.16 Hz (Figura 12) pudieron ser ajustados a tres componentes (H1, H2 y H3), mientras que aquellos obtenidos por estimulación luego de un prolongado reposo lo fueron a 4 componentes (H1, H2, H3 y H4) (Figuras 13 y 14).

A partir del cálculo analítico de las integrales de cada uno de los componentes (Ec. 4) se estimaron las energías asociadas a cada uno de ellos. Los valores promedios para las dos condiciones experimentales (aislado y estacionario) para una actividad de Ca extracelular de 0.138 mM se dan en la Tabla II (página siguiente).

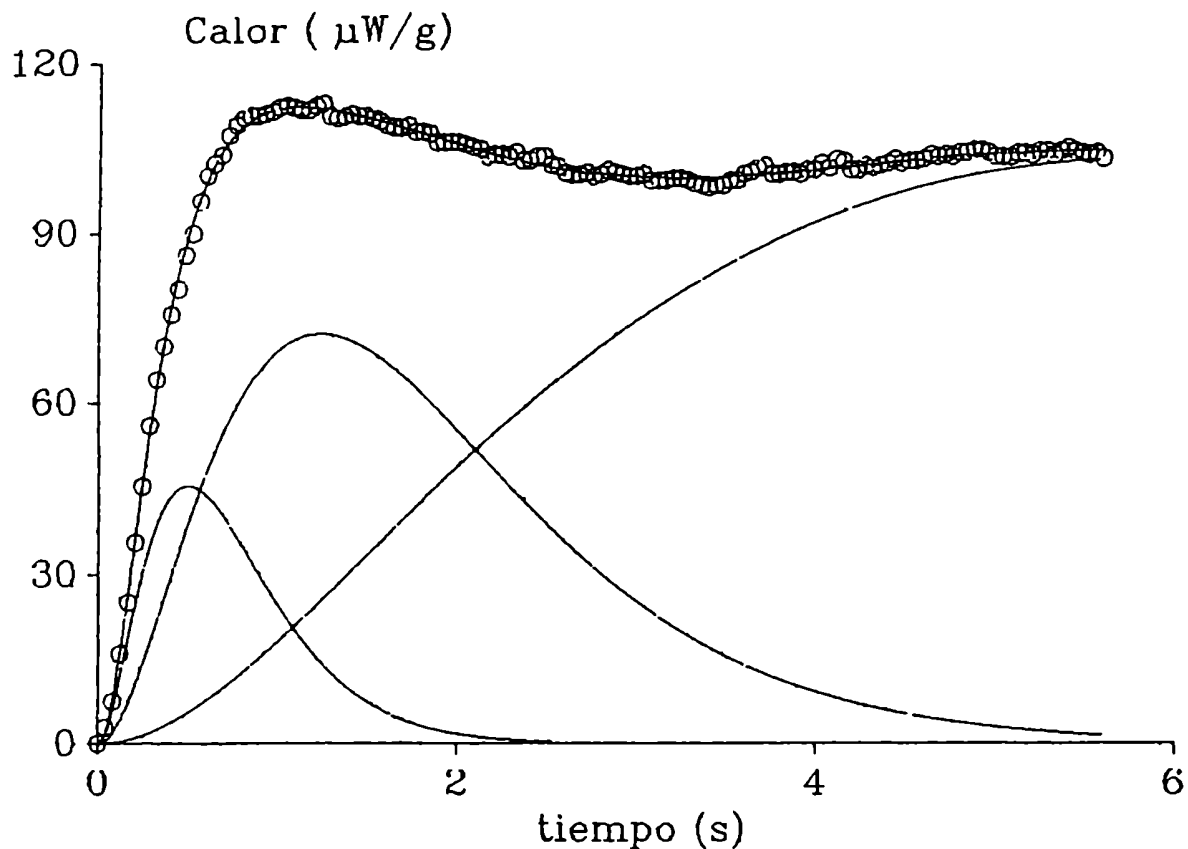


Figura 12: Digitalización de la producción de calor de una contracción perteneciente a un tren de latidos. En línea continua se muestra la evolución de cada componente ajustado, así como la suma de los tres componentes.

En todos los casos  $r > 0.995997$  para  $n > 95$ .

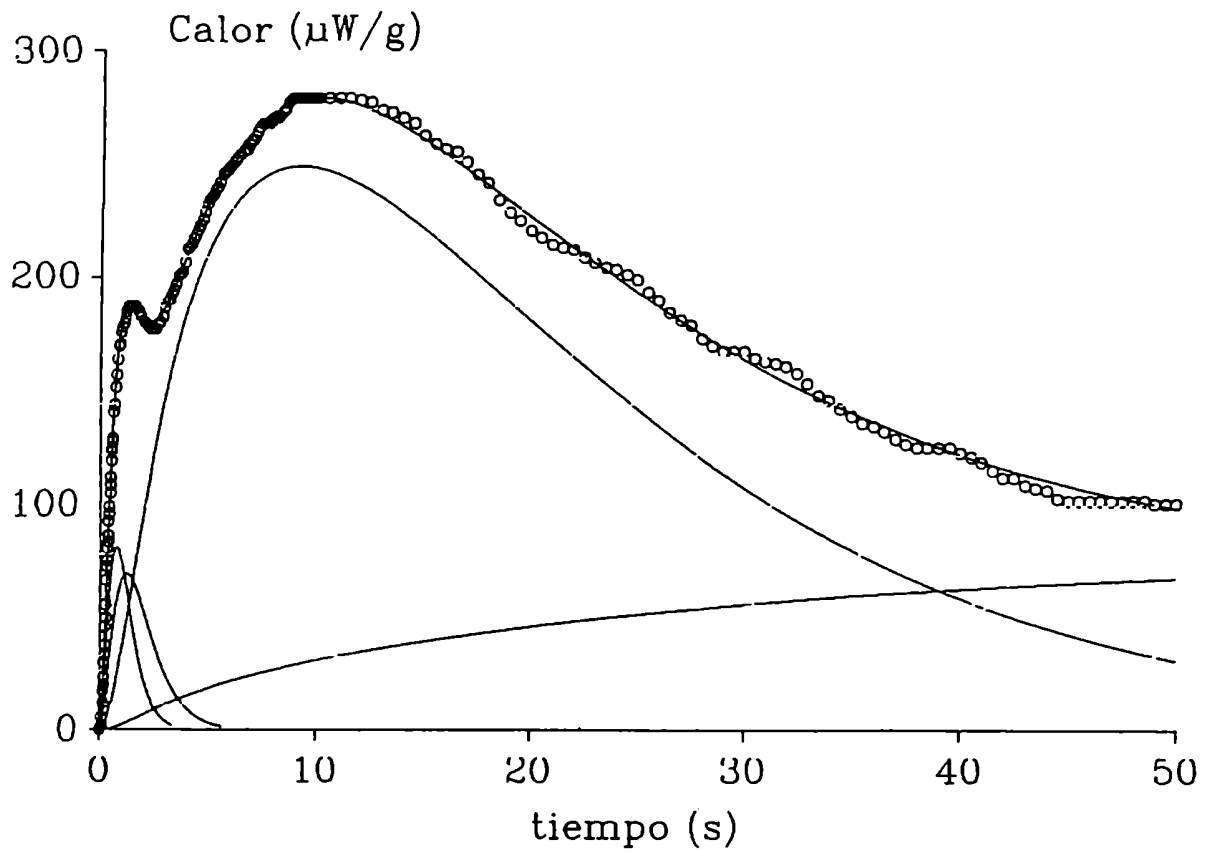


Figura 13: Digitalización de la producción de calor de una contracción aislada. En línea continua se muestra la evolución de cada componente ajustado, así como la suma de los cuatro componentes.

En todos los casos  $r > 0.99721$  para  $n > 117$ ).

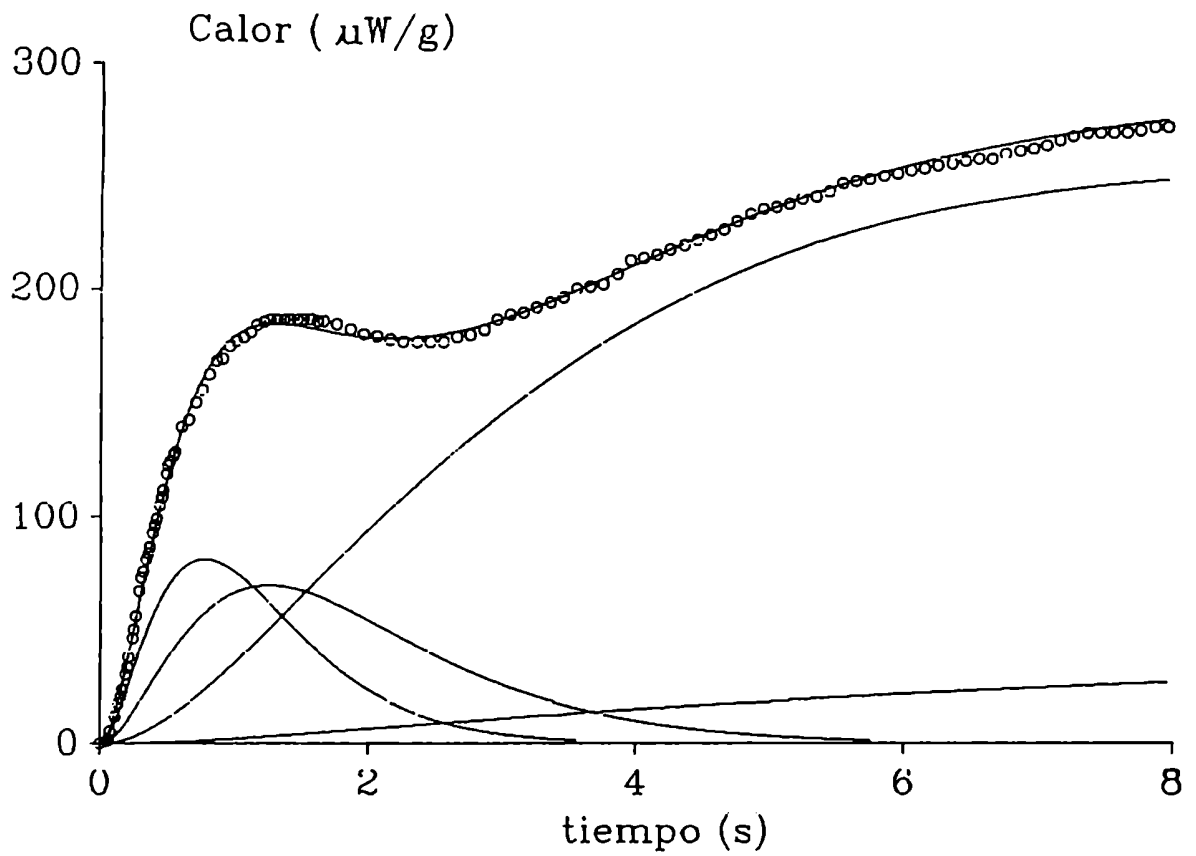


Figura 14: Ampliación de los primeros 8 segundos del trazado que se muestra en la Figura 13.

TABLA II  
 COMPONENTES ENERGETICOS DE LATIDOS ESTACIONARIOS Y AISLADOS

	Latido estacionario (n=20)	Latido aislado (n=16)
1er Componente	$1.6 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.3$
2do Componente	$3.2 \pm 0.4$	$2.3 \pm 0.3$
3er Componente	$6.3 \pm 0.5$	$9.1 \pm 0.7$
4to Componente		$16.7 \pm 1.6$
Calor total por Latido	$14.2 \pm 1.0$	$30.7 \pm 5.0$

Los datos están expresados en  $\text{mJ.g}^{-1}$  y representan valores medios  $\pm$  E.S.  
 El calor total por latido (H'a) se calcula como se indica en la pag.54

El cuarto componente es sólo cinéticamente distinguible en los latidos aislados. Sin embargo la resta del calor total por latido H'a menos la suma de los tres componentes ajustados, permite la identificación de una cuarta fracción de energía en latidos estacionarios cuya magnitud fue de  $2.7 \pm 0.6 \text{ mJ.g}^{-1}$ . Esta fracción energética no es diferenciable cinéticamente (al menos no es requerida por los ajustes) como ocurre con H4. Además su magnitud sólo representa aproximadamente una séptima parte del H4 medido en latidos aislados.

El componente H4 es de muy lenta evolución y se hace necesario para poder ajustar la meseta que aparece al final del trazado de producción de calor de cada latido aislado (Figura 8). El exponente  $\tau$  (Ec. 5) que corresponde a este componente tiende a 0, lo cual es lógico ya que la

meseta que aparece en los trazados se prolonga más allá del tiempo de integración del calorímetro (constante de velocidad=0.03 s<sup>-1</sup>). Este hecho sugiere la existencia de un proceso que es mantenido suficiente tiempo para que el calorímetro pueda integrar la respuesta, haciendo por lo tanto posible la estimación de la potencia a partir del valor asintótico ( $\dot{H}_0$ ) alcanzado en el ajuste.

Se podría postular que la cuarta fracción de energía observada en contracciones estacionarias se debe al mantenimiento de la meseta del cuarto componente (observada en latidos aislados), la que no se desactivaría si el músculo es estimulado repetitivamente. Sin embargo esta fracción de energía implica una potencia de  $450 \pm 103 \mu\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$  (calculada como los  $2.7 \text{ mJ} \cdot \text{g}^{-1}$  obtenidos para la cuarta fracción de energía de latidos estacionarios multiplicados por la frecuencia de estimulación de 0.16 Hz) que es significativamente mayor que el valor promedio de la meseta alcanzada por el cuarto componente en latidos aislados ( $183 \pm 24 \mu\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Esto sugeriría la posibilidad de que H4 sea sensible a la estimulación repetida, existiendo una transición en la magnitud de este componente entre el latido aislado y el estado estacionario. Esta hipótesis se analizará a continuación en el punto 3 de resultados de la presente tesis.

### 3 - Análisis de los procesos asociados a los componentes ajustados en latidos estacionarios y aislados

Una vez determinado el número de componentes, el paso siguiente fue intentar identificarlos con los conocidos procesos que ocurren en los miocitos durante la contracción.

El primero y el segundo componente, tanto en latidos aislados como estacionarios, resultaron independientes de la generación de fuerza y su magnitud conjunta (entre 4.4 y 4.8  $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$  dependiendo de la condición) es comparable al "calor de activación" del músculo esquelético (aprox. 4.06  $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Mulieri y Alpert, 1982) o el "calor independiente de tensión" de músculo cardíaco (aprox. 3.5  $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Gibbs, Loisselle y Wendt, 1988). Esta fracción de calor fue relacionada clásicamente, tanto en músculo esquelético como cardíaco, a los movimientos iónicos asociados a la contracción.

El tercer componente se correlacionó linealmente con la presión generada tanto en latidos aislados como estacionarios (Figura 15), lo que indicaría que esta fracción contendría la producción de calor asociada a la actividad actomiosínica. En la Figura 15 se agrupan los pares de datos ( $H_3$  vs  $P$ ) obtenidos a partir de los dos tipos de latidos, debido a que los parámetros de regresión fueron iguales en ambos casos. La recta de regresión y el intervalo de confianza representados corresponden a los latidos aislados, y se puede observar como los puntos provenientes de los latidos estacionarios se incluyen dentro del intervalo.

Finalmente, ni el cuarto componente de latidos aislados ni la cuarta fracción de energía obtenida por diferencia en latidos estaciona-

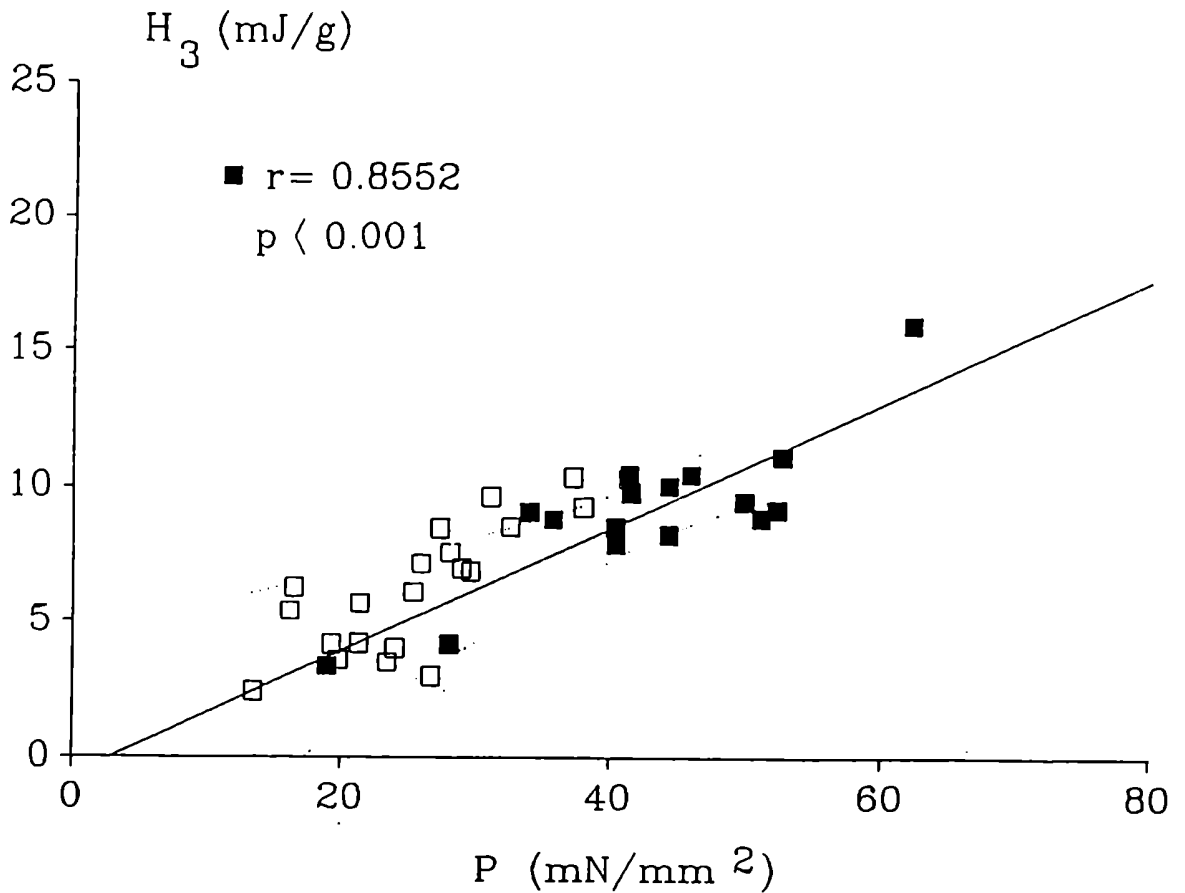


Figura 15: Correlación lineal entre  $H_3$  y  $P$  para todos los latidos aislados (■) obtenidos a  $(Ca)_0 = 0.14$  mM; ord.origen =  $-0.6 \pm 1.5$  mJ.g<sup>-1</sup> y pendiente =  $0.23 \pm 0.04$  mJ.g<sup>-1</sup>.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>). Se puede observar como los latidos estacionarios (□) obtenidos a la misma concentración de Ca se ubicaron dentro del intervalo de confianza de la regresión (95%).



rios se correlacionaron con P ( $r < 0.149$ ). Debido a la lenta evolución temporal de H4 en latidos aislados y su dependencia del Ca extracelular (este último es un resultado de nuestro laboratorio que no forma parte de la presente tesis) se podría hipotetizar un origen mitocondrial para el mismo.

Es sabido que la mitocondria posee una cinética de intercambio de Ca suficientemente lenta como para no poder contribuir al ciclo contráctil (Carafoli, 1985). Podría ajustarse en cambio a las características del cuarto componente, el cual parece activarse en el primer latido y establecer un "plateau" sobre el cual se suman los siguientes latidos. Con el objeto de poner a prueba esta hipótesis se realizaron experimentos en los cuales, luego de eliminar el O<sub>2</sub> del medio de perfusión burbujeándolo con N<sub>2</sub> (N<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%), se obtuvo una sucesión de 5 latidos aislados separados entre sí por cinco minutos. Los resultados de estos experimentos muestran (Figura 16) que el primer latido en ausencia de O<sub>2</sub> sufrió una reducción de H4 a menos del 20% de su valor en O<sub>2</sub>, mientras que los tres primeros componentes no sufrieron alteraciones significativas. Además, mientras el cuarto componente en el cuarto latido en N<sub>2</sub> se hizo no diferente de cero, los otros tres al igual que P no bajaron del 60% por ciento de sus valores en O<sub>2</sub>. En cuanto al tercer componente, como se observa en la Figura 17, en todos los experimentos realizados la falta de O<sub>2</sub> disminuyó la pendiente de la regresión lineal existente entre H3 y P a comparación de la obtenida en condiciones con-troles (Figura 15). Además, como confirmación de esto último, se observó una disminución (en forma pareada) de la relación H3/P como consecuencia del agregado de N<sub>2</sub> en todos los experimentos realizados. Estos resultados indicarían que al menos una fracción de recuperación aeróbica estaría

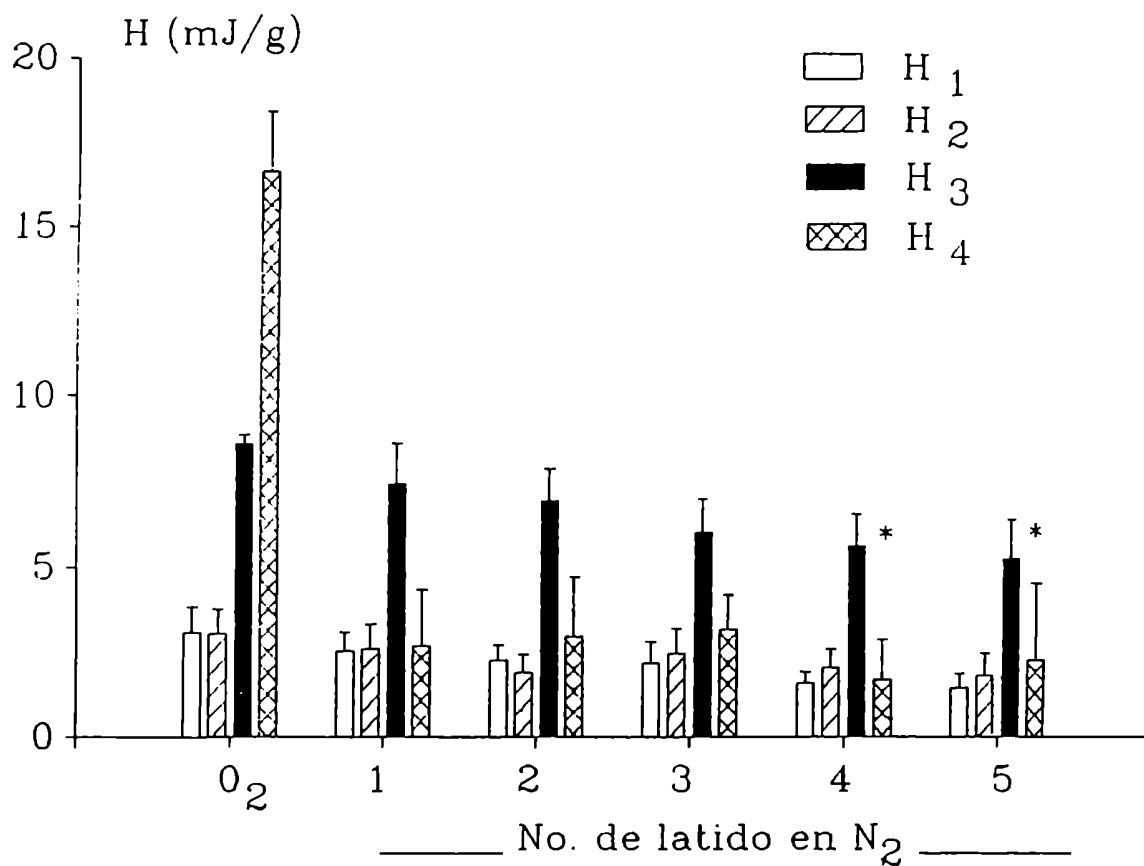


Figura 16: Magnitudes de los componentes H1, H2, H3 y H4 de latidos aislados obtenidos en presencia de O<sub>2</sub> (primer grupo de barras a la izquierda), y luego de haber eliminado el O<sub>2</sub> del medio de perfusión burbujeándolo con N<sub>2</sub>. Los latidos en presencia de N<sub>2</sub> se obtuvieron con una separación de 5 minutos entre sí.

\* representa ausencia de diferencias significativas respecto de O<sub>2</sub> n=4.

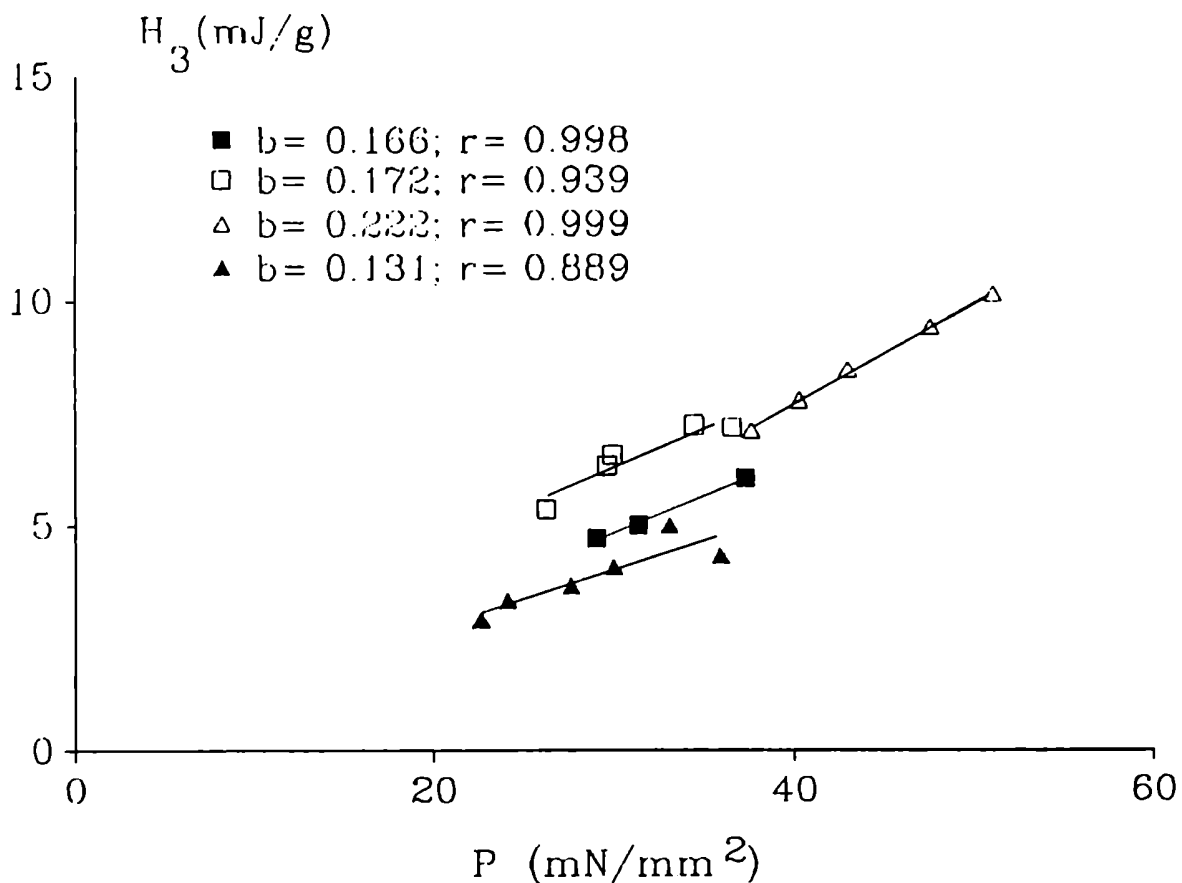


Figura 17: Representación de las regresiones lineales entre H<sub>3</sub> y P obtenidas para los 4 experimentos que se realizaron en presencia de N<sub>2</sub> en el medio de perfusión. Se puede observar como en todos los casos la pendiente de la regresión (b) resultó menor que la obtenida en condiciones controles (0.228 mJ.g<sup>-1</sup>.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>).

vinculada al tercer componente.

Como ya se describió previamente, el calor total por latido (para latidos estacionarios) resultó mayor que la suma de los tres componentes descritos. Esto sugiere que los tres componentes que se activan latido a latido en condiciones estacionarias, se suman sobre una fracción estacionaria de calor que en actividad se libera por sobre el calor de reposo. Un buen candidato para explicar el origen de esta fracción sería el  $\dot{H}_4$  observado en el latido aislado. Esto es debido a que este componente se activa en el primer latido luego de un reposo y permanece activo por más de 100 segundos estableciendo una clara meseta. A su vez no se observa una activación latido a latido de este componente en estado estacionario de generación de fuerza (recordar que los latidos estacionarios no poseen un  $\dot{H}_4$  cinéticamente diferenciable).

Los resultados expuestos en la sección 2 de este mismo capítulo mostraron que existían diferencias significativas entre la potencia de esta fracción de calor en latidos estacionarios ( $450 \mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y el "plateau" alcanzado por  $\dot{H}_4$  en latidos aislados ( $183 \mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ). En función de investigar estas diferencias se realizaron experimentos en los que sucesivamente se obtuvieron los  $\dot{H}_4$  (a partir de la meseta que se establece al final del trazado; ver Figura 18) de trenes de 2 y 3 latidos sucesivos (a frecuencia de 0.16 Hz). Los resultados obtenidos para el  $\dot{H}_4$  en estos trenes de latidos y en estado estacionario (obtenido también de la meseta que se establece al suspender la estimulación) se compararon con el  $\dot{H}_4$  de un latido aislado realizado durante el mismo experimento. Los resultados que se muestran en la Figura 19 indican que el componente en cuestión aumenta significativamente con el agregado de latidos respecto del valor que poseía en un latido aislado. El valor de

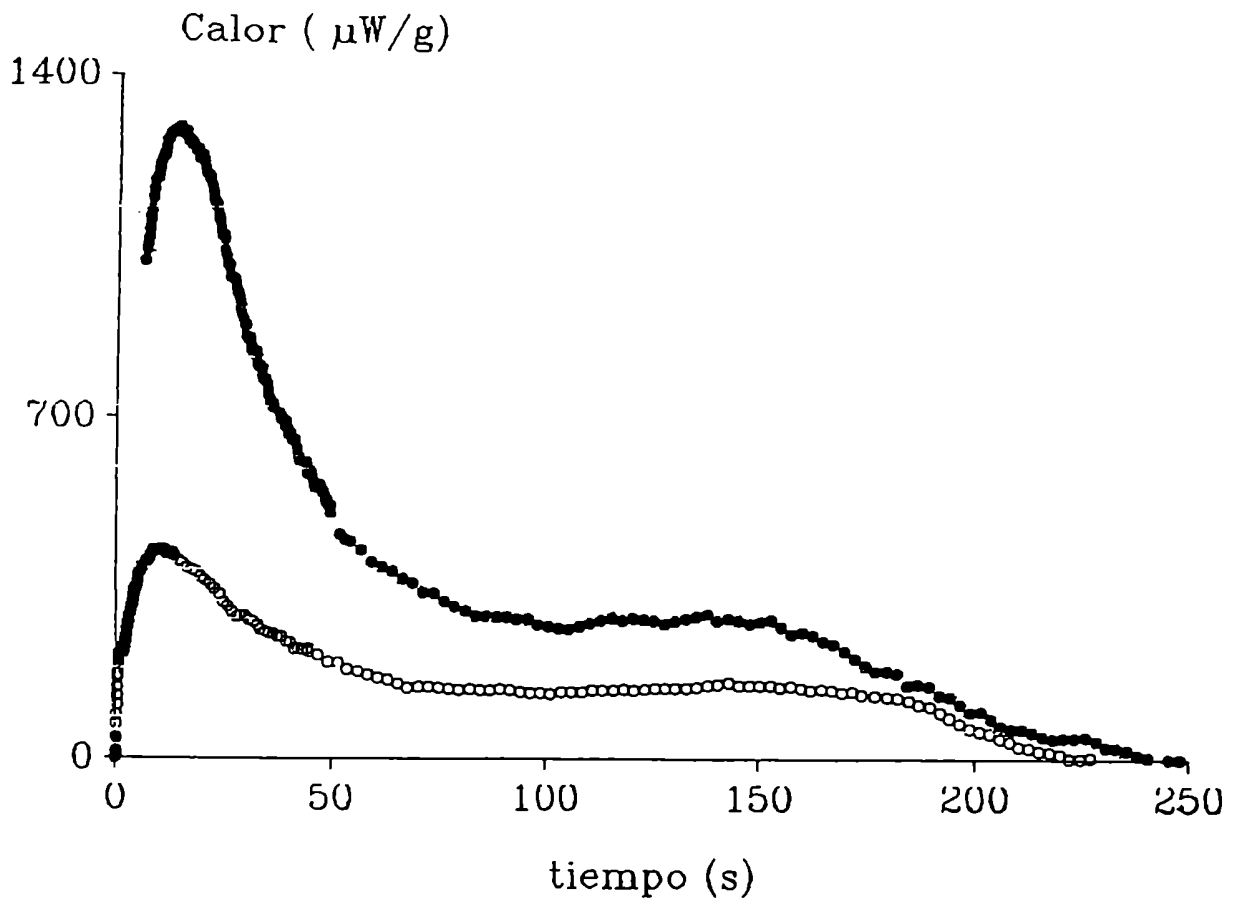


Figura 18: Superposición de los registros calorimétricos digitalizados de un latido aislado (o) y de dos latidos secuenciales con 6 segundos de separación entre ellos (●). Obsérvese que la meseta que se establece al final de los trazados es mayor para el segundo caso.

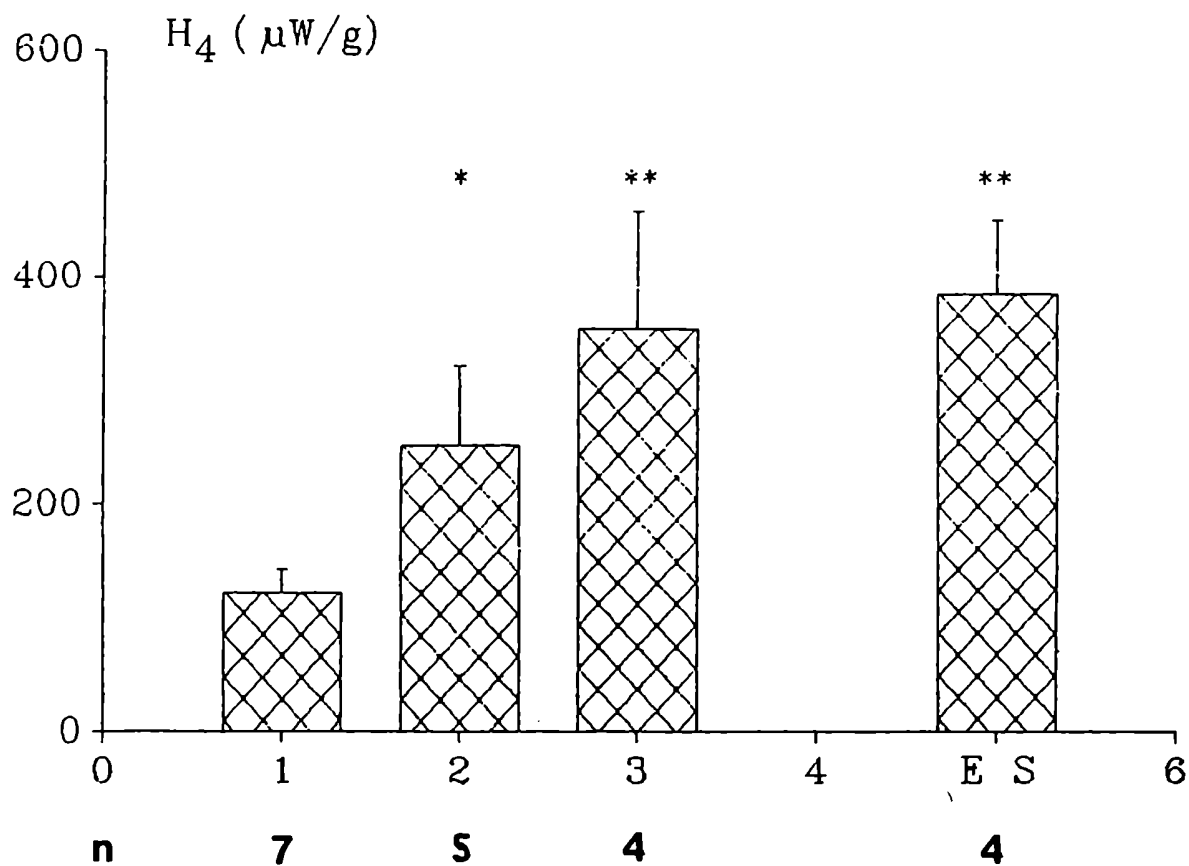


Figura 19: Magnitud de la meseta del cuarto componente en 1 latido aislado, en secuencias de 2 y 3 latidos y en el estado estacionario de generaci3n de fuerza (ES). Las barras representan media  $\pm$  error standard (\* representa  $p < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$  para la comparaci3n vs. el latido aislado). Pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney

$\dot{H}_4$  obtenido por este método parece alcanzar su máximo ya para trenes cortos (3 latidos), y su valor en estado estacionario no fue diferente, a su vez, del medido previamente por diferencia ( $386 \pm 56 \mu W \cdot g^{-1}$  vs.  $450 \pm 103 \mu W \cdot g^{-1}$ , respectivamente para el  $\dot{H}_4$  obtenido de estos experimentos y el calculado previamente por diferencia).

4 - Análisis de los procesos asociados a los componentes ajustados en latidos estacionarios. Efecto de la variación de la concentración extracelular de Ca y de la estimulación pareada.

Debido a los resultados previos, y a que de la suma de los dos primeros componentes se obtiene un valor comparable al obtenido por otros autores para el llamado calor de activación, se estudió en latidos estacionarios la posible dependencia de los mismos con la actividad de Ca extracelular.

Modificando la actividad de Ca de la perfusión ( $(Ca)_o$ ) entre 0.083 y 0.547 mM se observa que P responde en forma sigmoidea (Figura 20). Esta respuesta fue ajustable a una ecuación para unión de ligandos a macromoléculas (Barlow y Blake, 1989). Como ya se mencionó, estos ajustes se realizaron por medio de un programa para ajustes no lineales. En estos experimentos H1, H2 y H3 también tuvieron una dependencia sigmoidea con  $(Ca)_o$ , según puede observarse en las Figuras 21, 22 y 23. La asociación de H1 y H2 con el calor de activación estaría apoyada por estos resultados, ya que es sabido que esta fracción energética es altamente dependiente de la concentración de calcio (Gibbs, Loisselle y Wendt, 1988). El ajuste de todas estas curvas también se realizó por medio de la misma ecuación (Barlow y Blake, 1989) y los parámetros correspondientes se muestran junto a las figuras.

Mientras los dos primeros componentes son dependientes del Ca extracelular pero independientes de la fuerza, el tercer componente es dependiente del Ca extracelular y de la presión máxima generada. Cabría ver si la dependencia al Ca observada en H3 es debida solamente al aumento en la fuerza producido como respuesta a la variación del Ca



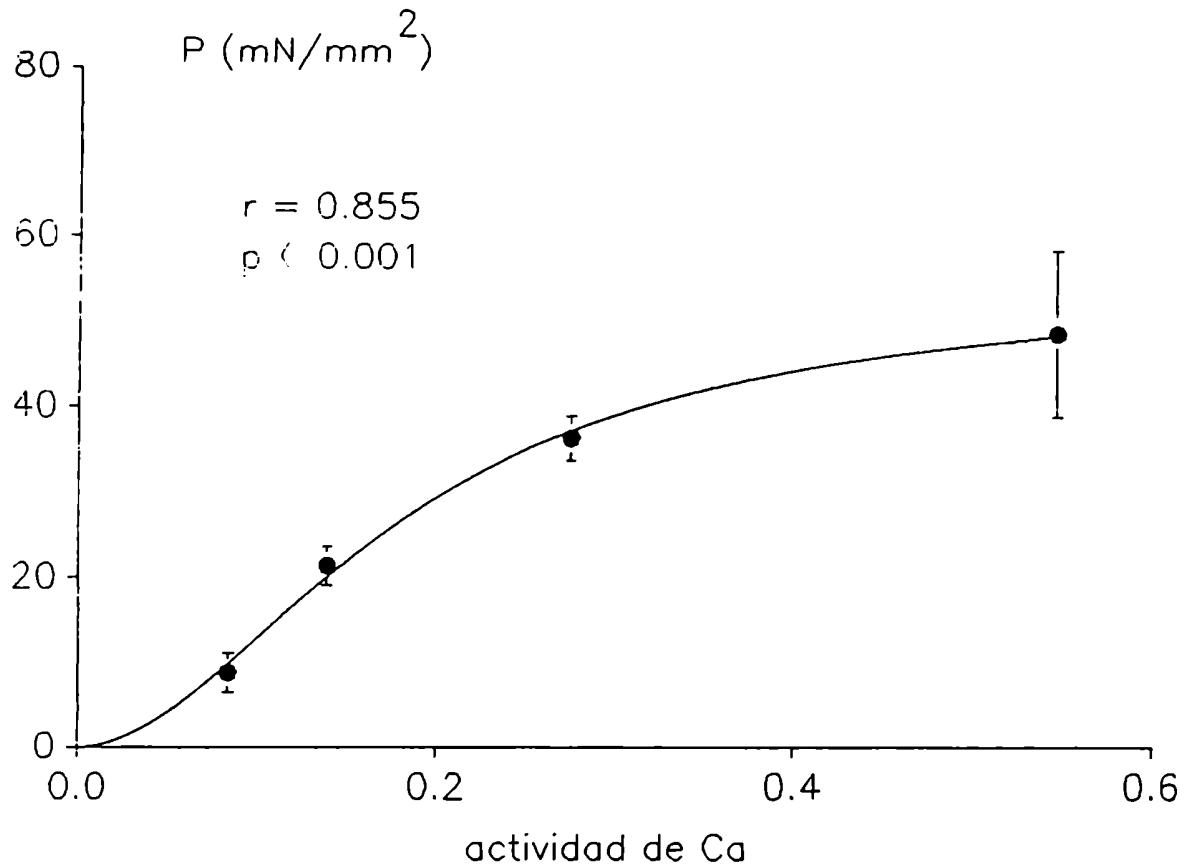


Figura 20: Dependencia de  $P$  con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$P = \frac{(Ca)^{0.9} * 54}{(0.0388 + (Ca)^{0.9})}$$

$r=0.855$  ,  $n=19$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

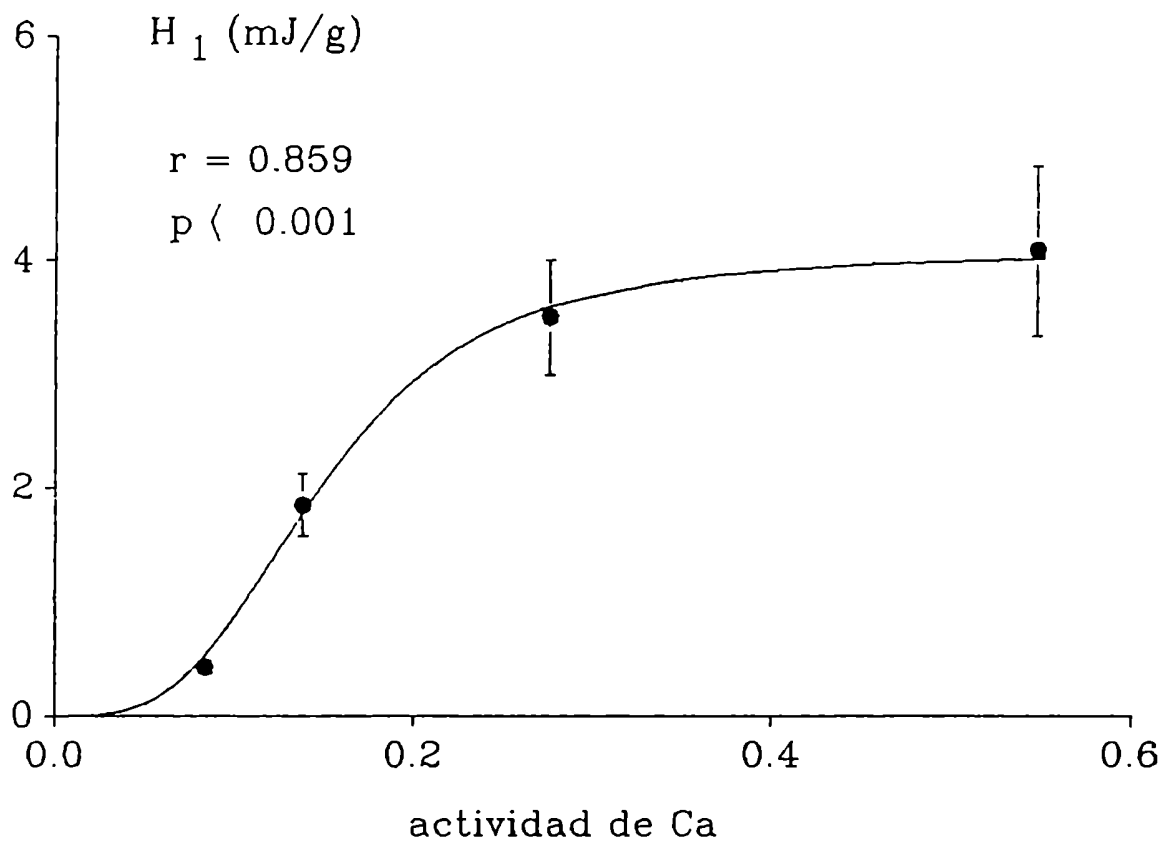


Figura 21: Dependencia de  $H_1$  con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$H_1 = \frac{(Ca)_o^{3.3} * 4.06}{(0.00185 + (Ca)_o^{3.3})}$$

$r=0.859$  ,  $n=19$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

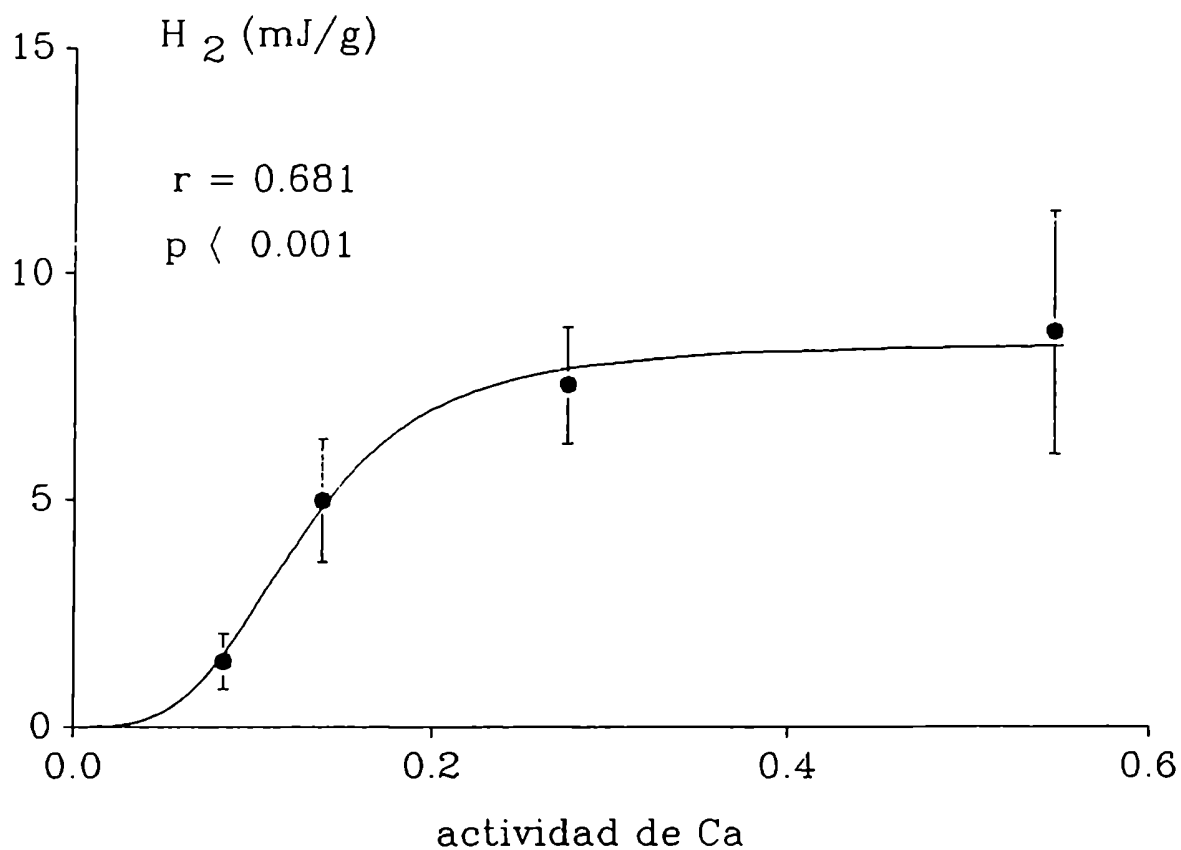


Figura 22: Dependencia de H<sub>2</sub> con (Ca)<sub>o</sub>. El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$H_2 = \frac{(Ca)^{0.4} * 8.42}{(0.00083 + (Ca)^{0.4})}$$

$r=0.681$  ,  $n=19$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

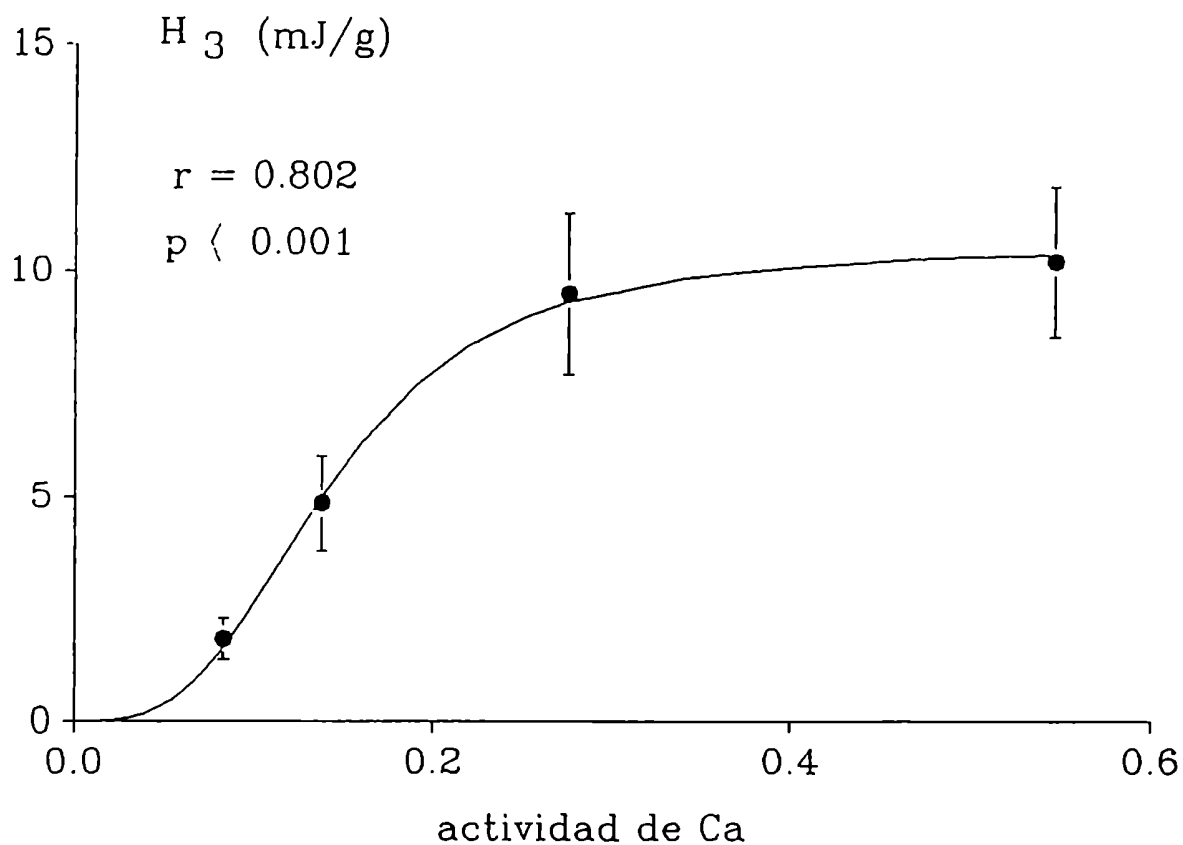


Figura 23: Dependencia de  $H_3$  con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$H_3 = \frac{(Ca)_o^{3.1} * 10.5}{(0.0023 + (Ca)_o^{3.1})}$$

$r=0.8017$ ,  $n=19$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

extracelular. Para ello se estudió la variación de H3/P con respecto a la actividad de Ca. Como puede observarse en la Fig 24 no se observa variación de H3/P con el Ca, por lo que no es posible hasta el momento asignar a H3 otro proceso además de la actividad ATPásica actomisínica y al menos una fracción de la recuperación aeróbica.

El calor de activación, llamado también calor independiente de tensión, ha sido vinculado a los movimientos iónicos producidos durante la contracción, y fundamentalmente a los movimientos de Ca. Debido a la secuencia temporal de los picos de los componentes se puede especular que H1 se asocie fundamentalmente a procesos de binding de Ca a sitios citosólicos, por ser el primer evento que ocurre luego de la entrada de Ca a la célula. A su vez H2 podría estar más vinculado con la recaptación de Ca por los sistemas de transporte. Componentes de liberación de calor asociados con estos dos procesos ya fueron postulados por otros autores (Mulieri y Alpert, 1982). Una diferencia notable con los experimentos presentados en esta tesis es que Mulieri y Alpert, con el fin de anular la generación de fuerza, trataron a los músculos con soluciones hiperosmóticas (Mulieri y Alpert, 1982), lo cual en primer lugar aleja más al preparado de la condición fisiológica, y en segundo lugar presupone igual comportamiento de los componentes de activación en presencia como en ausencia de generación de fuerza.

Otro enfoque utilizado en esta tesis con el objeto de proseguir con la caracterización de estos componentes fue buscar una intervención que produjese una sobrecarga de Ca en el medio intracelular sin alterar la concentración extracelular de este ion. Para esto se sometió al preparado a una estimulación doble (200 ms entre ambos estímulos) y se estudió al latido resultante de este tratamiento (TW) (estos experimen-

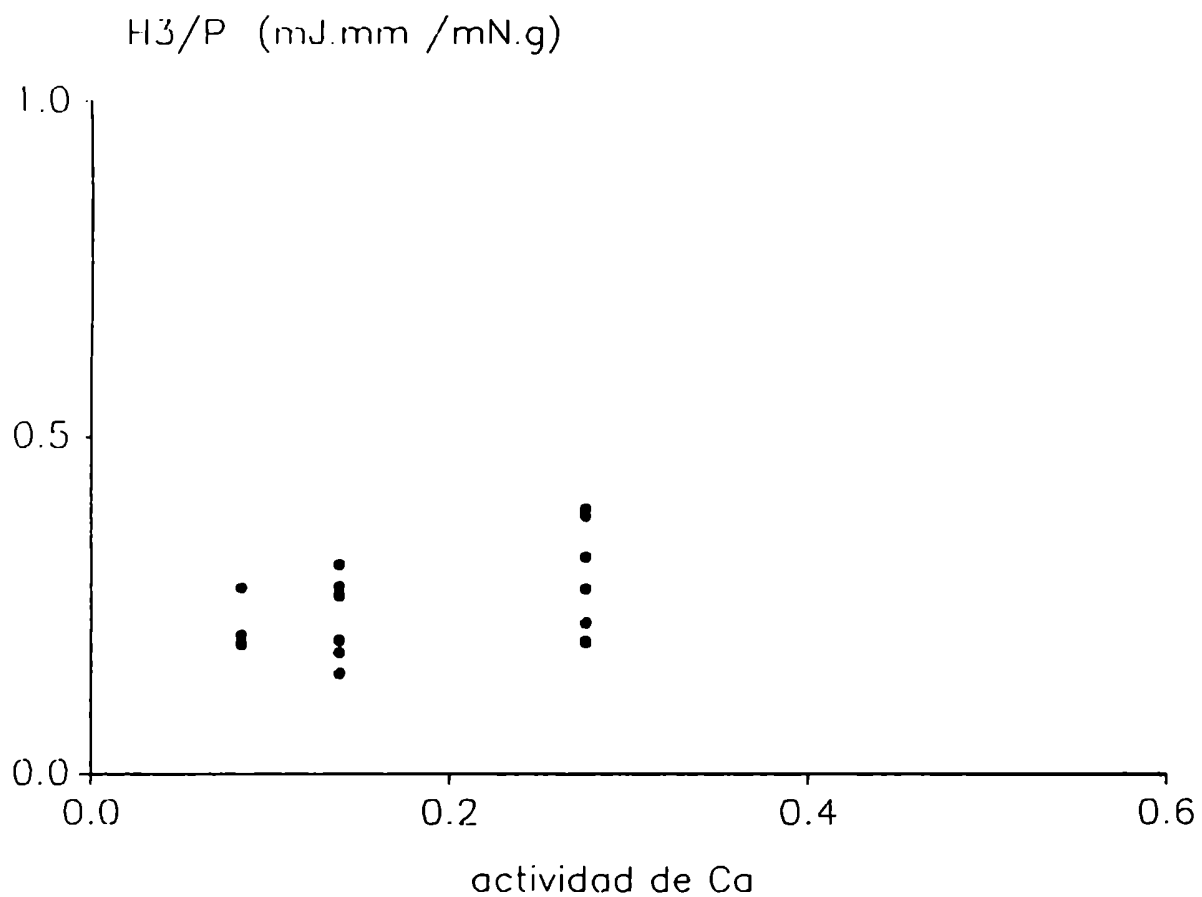


Figura 24: Falta de correlación entre H3/P y (Ca) (r=0.0211).

tos se realizaron a  $(Ca)_o=0.138$  mM). Se eligió este tiempo entre las dos estimuciones del TW para que el segundo estímulo cayera próximo a la presión pico, de modo que encontrase a los miofilamentos ocupados aún con Ca. La figura 25 muestra que en TW el trazado de presión es idéntico al control previo hasta pasar apenas la presión al pico, luego al llegar la segunda estimulación la presión es mantenida un breve lapso y finalmente el músculo se relaja con la misma  $-\dot{P}$  que el control. De esto resulta que la estimulación doble, tal como se aplica en este trabajo, no modifica P aunque sí aumenta la integral presión-tiempo (IPt) (Tabla III). De este comportamiento mecánico se puede inferir que la segunda estimulación no produjo una unión extra de Ca a los miofilamentos sino un mantenimiento del Ca ya unido durante más tiempo.

TABLA III

COMPORTAMIENTO MECANICO DEL VENTRICULO EN LATIDOS CONTROLES Y TW

	P(mN/mm <sup>2</sup> )	IPt((mN/mm <sup>2</sup> )*s)
C	26.2±1.9	8.7±0.7
TW	26.7±1.8	11.5±1.0 *

Los valores representan MEDIAS ± ES para n=17

C: controles a  $(Ca)_o=0.138$  mM; TW: twins a  $(Ca)_o=0.138$  mM

\* P<0.0005

Para estudiar el efecto de la segunda estimulación sobre la producción de calor, se le restó a la curva de calor correspondiente a TW el trazado del latido control previo, obteniéndose así una curva

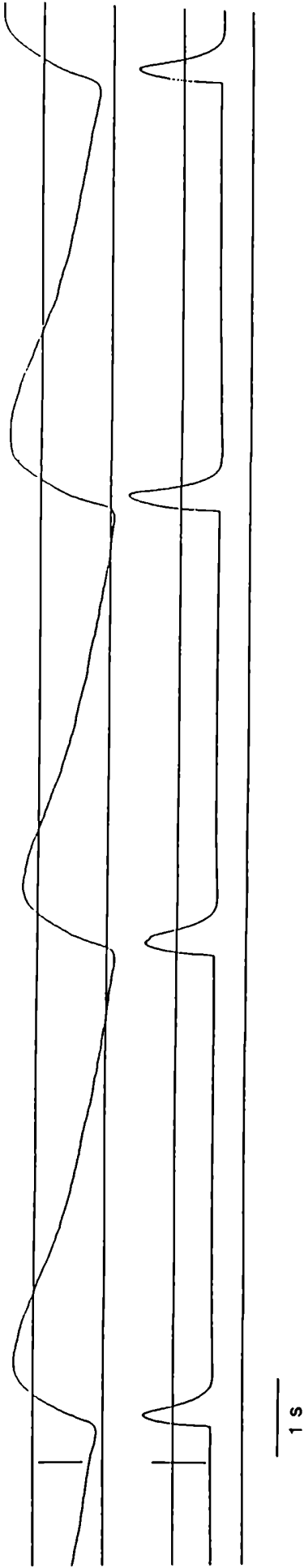


Figura 25: Trazado de un experimento tipo donde se pueden observar el desarrollo de presión (abajo) y la producción de calor (arriba) en un latido control, un latido TW y un latido PTW. Las barras verticales representan  $25 \text{ mN}\cdot\text{mm}^2$  (para la generación de fuerza) y  $40 \mu\text{W}$  (para la producción de calor).



diferencia (CD) como se muestra en las Figuras 26 y 27. Esta curva diferencia fue ajustable sólo a dos componentes ( $0.723 \pm 0.067$  y  $2.24 \pm 0.387$   $\text{mJ.g}^{-1}$  respectivamente,  $n=17$ ), pues el agregado de un tercero no mejoraba los ajustes y aumentaba notablemente los errores de los parámetros de ajuste de los componentes (Fig 27). Por su evolución temporal los dos componentes ajustados corresponden al segundo y al tercero observados previamente, ya que sus tiempos al pico no difieren de los correspondientes a los mismos en latidos controles. Si bien H1 se hizo necesario en algunos ajustes (3 en un total de 17), la magnitud que presentó fue en promedio despreciable ( $0.03 \pm 0.02$   $\text{mJ.g}^{-1}$ ) y sólo representaba un 2% del valor de este componente en condiciones controles. La ausencia del primer componente en CD es compatible con que en el tiempo que cae la segunda estimulación (próxima a la fuerza máxima generada) no se unan cantidades adicionales de Ca a la troponina C (TnC), lo cual se refleja en la falta de variación de P respecto al control.

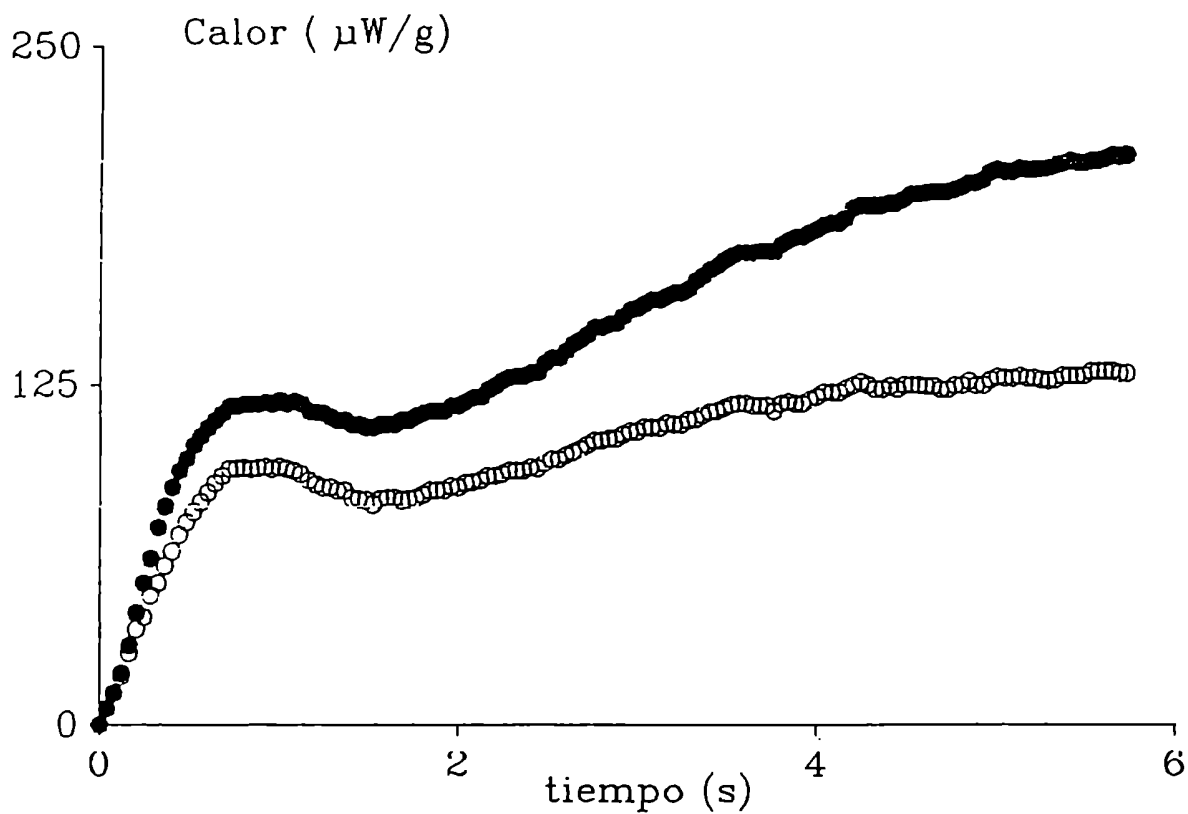


Figura 26: Digitalización de la producción de calor de un latido control y de un latido Tw. Restando punto a punto estos dos trazados se obtiene la curva diferencia de la Figura 27.

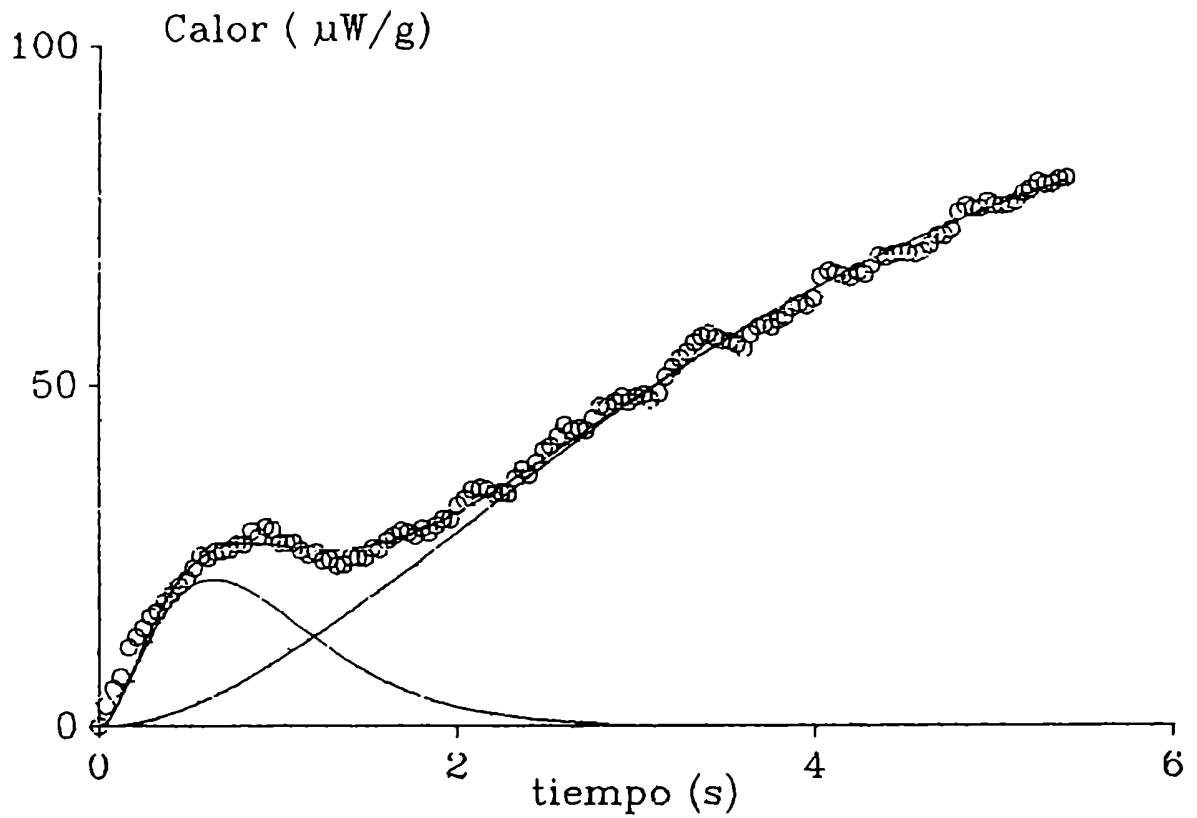


Figura 27: Calor adicional producido por la segunda estimulación, calculado como la diferencia entre las dos curvas de la Figura 26. En línea continua se muestra la evolución temporal de cada componente ajustado, así como la suma de los tres componentes (en todos los casos  $r > 0.8896$  para  $n > 53$ ).

## 5 - Análisis mecánico-energético de las contracciones extrasistólicas y postextrasistólicas.

Como ya se mencionó en la sección anterior una estimulación extrasistólica próxima a la presión pico produjo un incremento en la integral presión tiempo de  $2.4 \text{ mN.mm}^{-2}.\text{seg}$ . Este aumento se debe exclusivamente a una prolongación del  $tR1$  ( $0.07 \pm 0.007 \text{ seg}$ ;  $n=17$  y  $p < 0.0005$ ) respecto de la contracción control (C), ya que no hubo modificaciones en P ni en los demás tiempos asociados al ciclo contráctil. Desde el punto de vista calorimétrico la estimulación extrasistólica originó la aparición de 2 componentes de calor activo cuyas características cinéticas coinciden con las de H2 y H3 de los controles. El componente de tipo H3 y el incremento de IPT que aparecen en las extrasistolias se correlacionaron entre sí por medio de una regresión lineal con ordenada al origen no diferente de 0 y una pendiente que no difirió de la que presenta la regresión de los mismos parámetros en latidos controles. En la Figura 28 se muestra la recta de regresión que existe entre H3 e IPT para los controles (cuyos puntos se representan como (●)); en la misma figura se puede observar como los puntos correspondientes a las extrasistolias (○) se incluyen dentro del intervalo de confianza de la regresión representada.

La pregunta que necesariamente surge es cuál es la fuente de Ca que contribuye a los eventos que se desarrollan durante la extrasistolia. La resolución de esta pregunta tiene una importancia doble. En primer lugar es relevante del punto de vista mecanístico y en segundo término, siendo la extrasistolia un fenómeno patológico, es importante fisiopatológicamente. Para contestar a esta pregunta se decidió en primer término

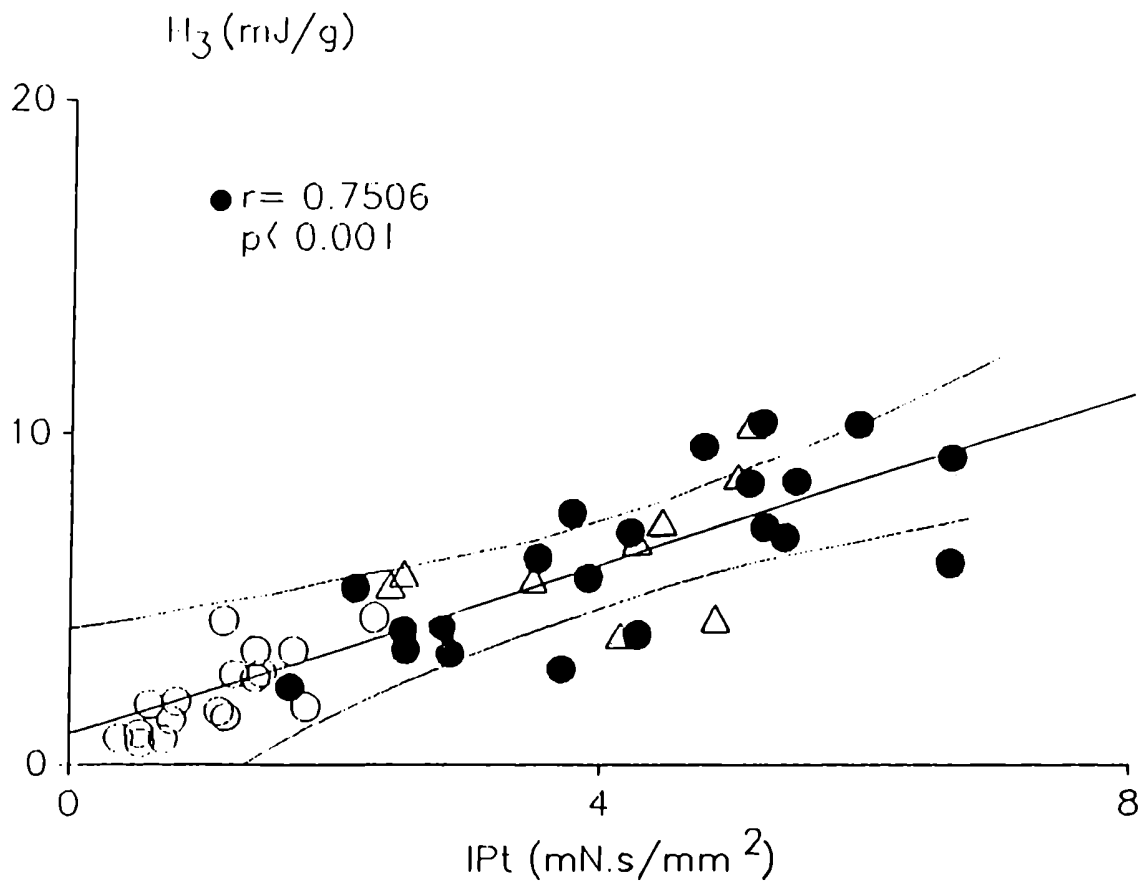


Figura 28: Correlación lineal entre H3 e IPT para los latidos controles estacionarios (●) obtenidos a  $(Ca)_o = 0.13843$  mM; ord.origen=  $1 \pm 1.68$  mJ.g<sup>-1</sup> y pendiente=  $0.57 \pm 0.12$  mJ.g<sup>-1</sup>.mN<sup>-1</sup>.mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Se puede observar como tanto las extrasistolias (○) como los latidos PTW (△) obtenidos a la misma concentración de Ca se comportaron en forma similar a los controles.

estudiar la contribución del Ca extracelular a los eventos mecánicos y energéticos observados. Para esto se realizaron experimentos en los cuales se modificó la actividad de Ca entre 0.083 y 0.547 mM y se estudiaron sus efectos sobre la extrasistolia y el latido inmediatamente posterior (postextrasistolia o PTW). Se puede observar en las figuras 29, 30, y 31 que tanto la IPT asociada a la extrasistolia ( $IPT_{TW-C}$ , tomada como diferencia entre TW y C), como los dos componentes de calor de la curva diferencia se correlacionaron con la (Ca), por medio de una relación sigmoidea. Las ecuaciones de ajuste utilizadas se muestran en las figuras correspondientes. De estos resultados puede inferirse que la extrasistolia, al menos en parte, dependería de la entrada de Ca del extracelular.

La P y la IPT de los latidos PTW resultó potenciada respecto al control correspondiente a todas las concentraciones de Ca utilizadas, como se muestra en la tabla IV. Al igual que los controles, estos latidos fueron ajustados a 3 componentes. Los parámetros de la regresión de H3 vs IPT para PTW no difirieron de los presentes en la regresión control. En la figura 28 se observa como los puntos obtenidos para este tipo de latidos (representados como  $\Delta$ ) se comportan en forma similar a los correspondientes a latidos controles. Los componentes H1, H2 y H3 de PTW resultaron potenciados respecto a los controles correspondientes aunque no a todas las concentraciones de Ca (Tabla IV). La potenciación observada, tanto en parámetros mecánicos (P, IPT) como energéticos (H1, H2 y H3), expresada como porcentaje de C ( $[(PTW-C) \cdot 100] / C$ ), disminuye con el aumento de (Ca) (Figura 32). Sin embargo si se analiza la variación de la potenciación absoluta de PTW en función de la (Ca), se puede observar (Tabla IV) que el pico de potenciación para los cinco

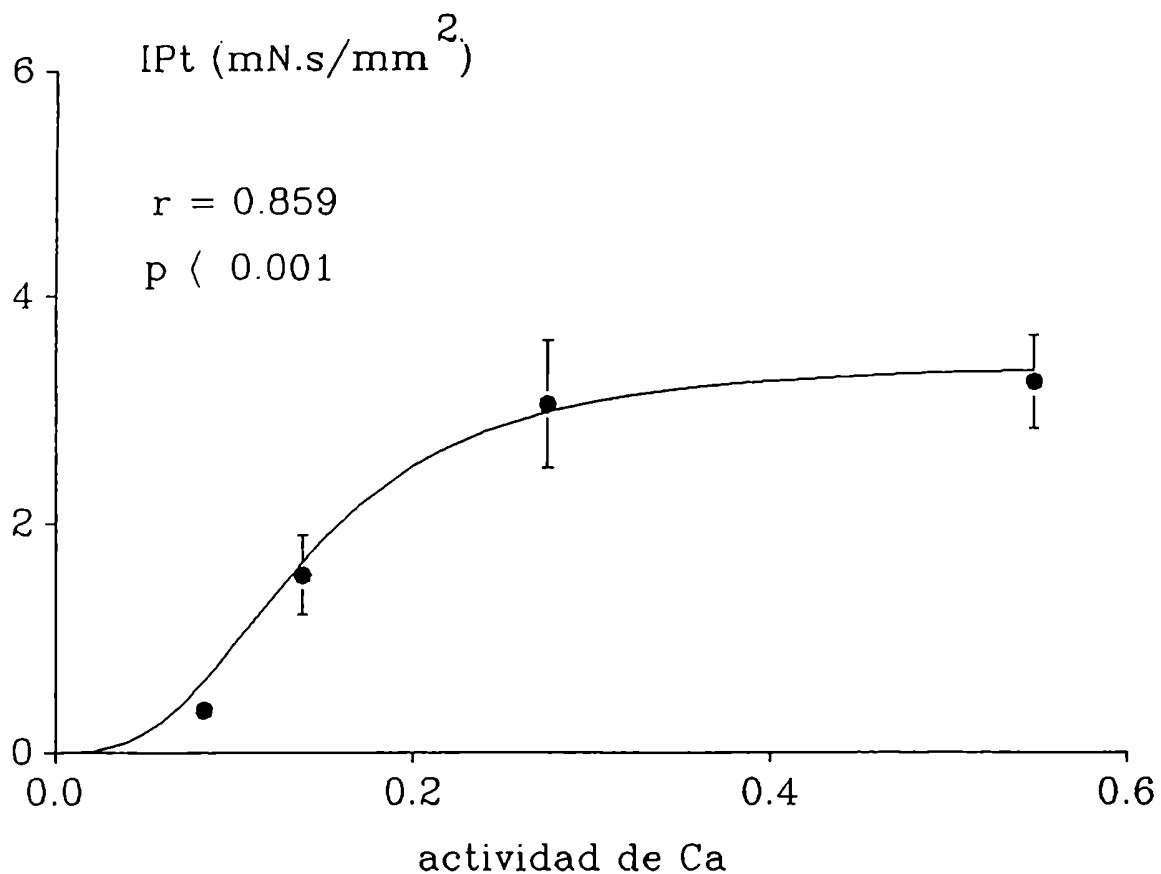


Figura 29: Dependencia de  $IPT_{TW-C}$  con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$IPT = (Ca)o^{2.8} * 3.41 / (0.0035 + (Ca)o^{2.8})$$

$r=0.8586$ ,  $n=17$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

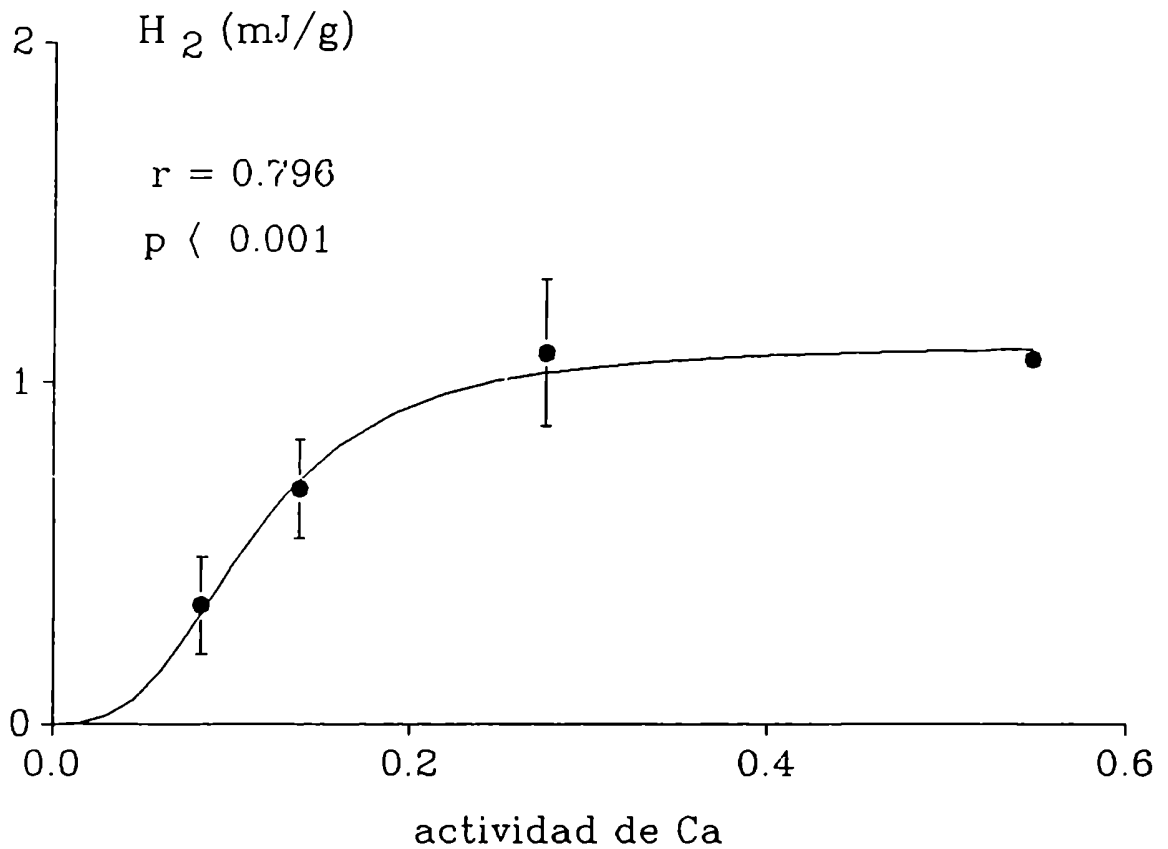


Figura 30: Dependencia de  $H_2$  (para CD) con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$H_2 = \frac{(Ca)^{0.2} * 1.10}{(0.00181 + (Ca)^{0.2})}$$

$r=0.7963$ ,  $n=17$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.



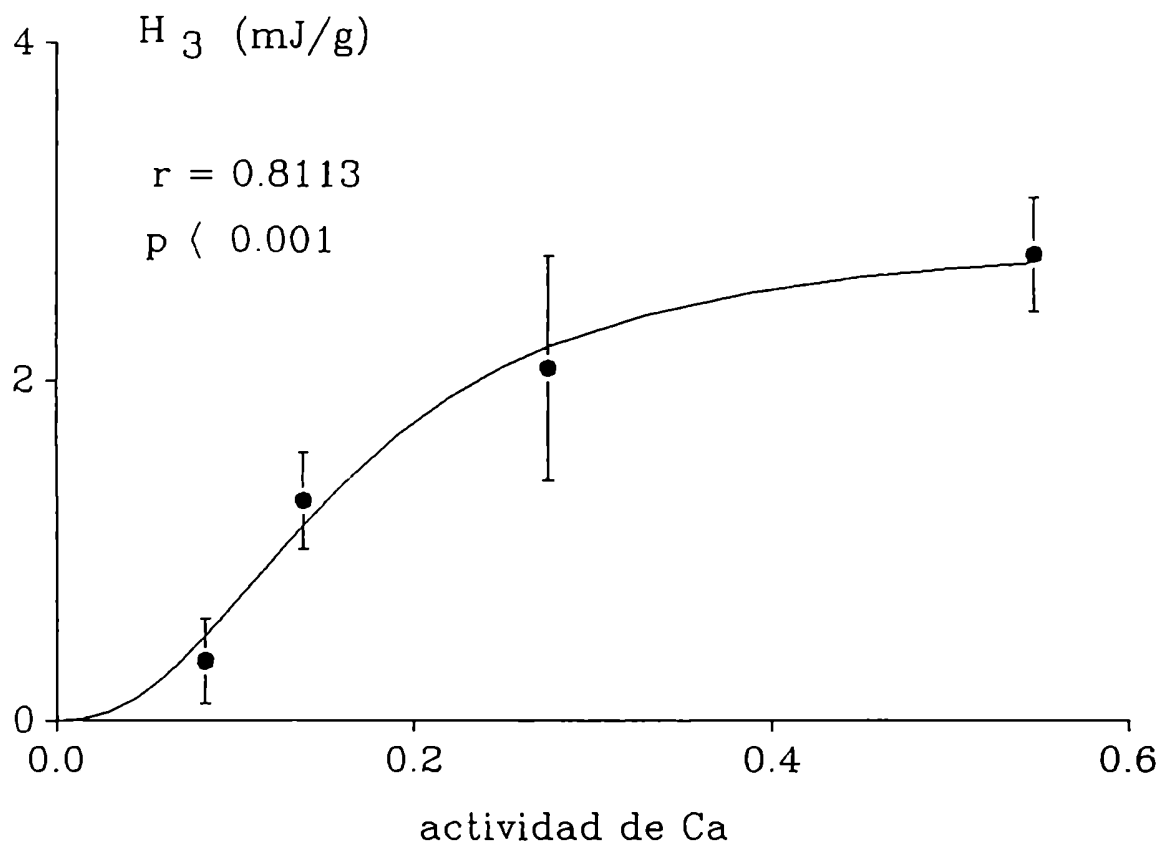


Figura 31: Dependencia de  $H_3$  (para CD) con  $(Ca)_o$ . El ajuste se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$H_3 = \frac{(Ca)^{0.2} * 2.87}{(0.0156 + (Ca)^{0.2})}$$

$r=0.8113$ ,  $n=17$ , los puntos llenos representan los promedios a cada actividad.

### Incremento (%) de PTW

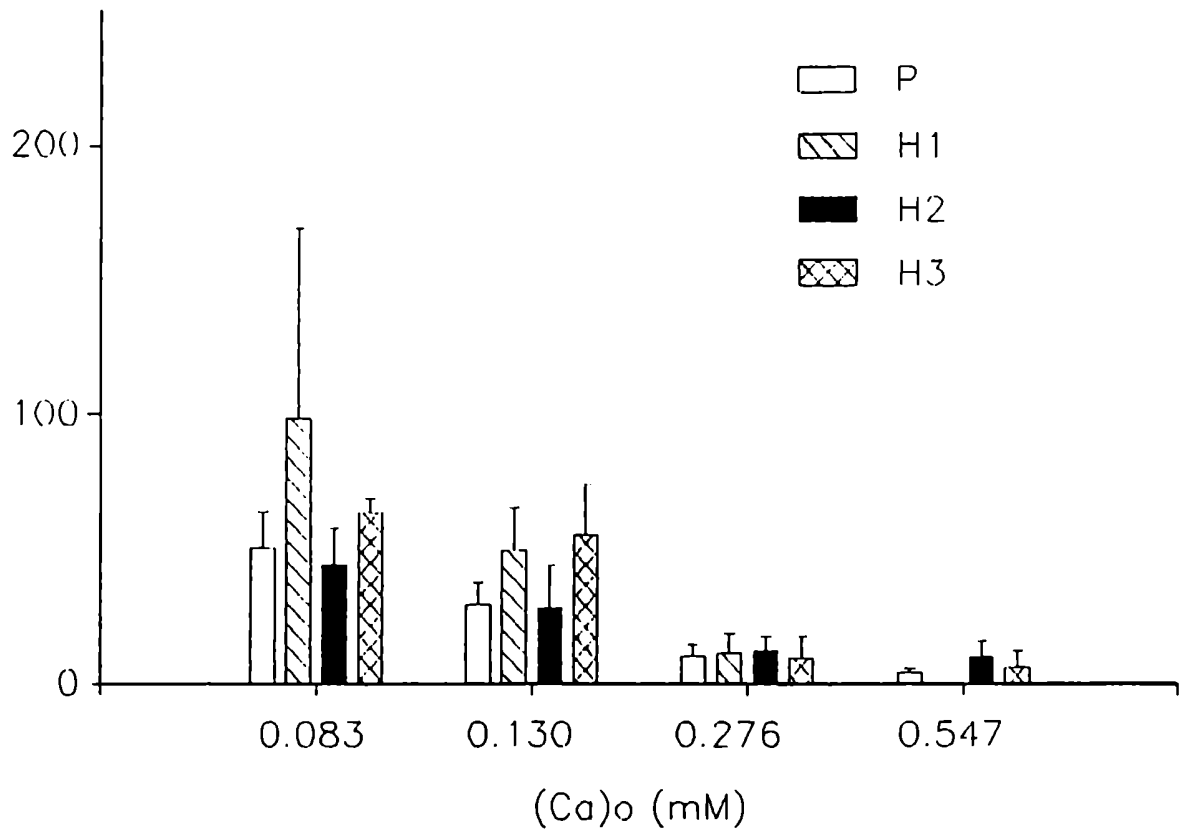


Figura 32: Incrementos porcentuales de P, H1, H2 y H3 en PTW respecto de C a diferentes actividades de Ca en el medio de perfusión.

TABLA IV  
 MECANICA Y ENERGETICA EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD DE CALCIO  
 DIFERENCIAS ENTRE PTW Y C

(Ca) (mM)	0.083	0.130	0.276	0.547
$\Delta P$	3.44±0.85*	6.33±1.49#	4.00±1.44**	2.33±0.69*
$\Delta IPT$	0.98±0.18#	2.11±0.39#	1.42±0.53*	0.72±0.57
$\Delta H1$	0.41±0.23	0.90±0.25#	0.29±0.20	-0.20±0.27
$\Delta H2$	0.65±0.25*	0.79±0.33*	0.73±0.25*	1.01±0.47
$\Delta H3$	1.19±0.32#	2.90±1.10*	1.00±0.33*	0.9±0.46
n	5	6	6	4

Los valores representan MEDIAS ± ES; todas las diferencias se toman como TW-C

\*P<0.05; #P<0.01

P: mN/mm<sup>2</sup>; IPT: mN.s.mm<sup>-2</sup>

H1; H2 y H3: mJ.g<sup>-1</sup>

parámetros analizados se produce a una actividad de Ca de 0.13 mM, y luego los valores disminuyen sistemáticamente con el aumento de la  $(Ca)_o$ . Estos resultados parecerían indicar que a las máximas  $(Ca)_o$  utilizadas quedaría poco margen disponible para la potenciación, probablemente porque nos aproximamos a la saturación del sistema. Por lo tanto la potenciación postextrasistólica no se relaciona con  $(Ca)_o$  de la misma manera que la extrasistolia, ni mecánica ni energéticamente. A su vez es lógico pensar que la potenciación que se observa en PTW sea consecuencia del Ca extra que entró a la célula durante la extrasistolia. Entonces cabría preguntarse cómo y dónde se almacena esta fracción extra de Ca, ya que si fuera extruída totalmente al extracelular y el miocito retornara a un estado similar al existente luego de cualquier contracción control no debería esperarse potenciación alguna. Se podría pensar, por lo tanto, que durante la extrasistolia entra a la célula una determinada cantidad de Ca que genera la diferencia en IPT observada y que a su vez provoca el sobrellenado de un compartimiento celular que intervendrá en la contracción siguiente. Como consecuencia esto provocaría que dicho compartimiento intervenga con una mayor fracción de Ca en el latido siguiente y, por lo tanto, origine la potenciación observada en PTW.

A continuación se evaluó la posibilidad de que el compartimiento que origina la potenciación sea el retículo sarcoplásmico, ya que está demostrado que esta organela, en ventrículo de rata, tiene una participación fundamental tanto en la liberación como en la recaptación del Ca durante el evento contráctil (Fabiato y Fabiato, 1978). Para ello se realizó una serie de experimentos en los cuales se agregó cafeína al medio de perfusión. Estas experiencias se llevaron a cabo una vez que el

efecto de la cafeína llegó a su estado estacionario (aproximadamente 30 minutos). Esto último es importante, ya que esta droga a las concentraciones utilizadas provoca el progresivo vaciamiento en Ca del retículo sarcoplásmico y por lo tanto su inactivación como fuente de dicho ión (Weber y Herz, 1968; Bers, 1985). Estos experimentos se realizaron a una  $[Ca]_i$  de 0.13 mM, debido a que fue la condición tomada como control desde el comienzo de estos estudios (por ser la más favorable para el estado del músculo) y porque fue en la que se obtuvo la mayor potenciación absoluta en PTW. Con el agregado de la droga desapareció completamente la potenciación postextrasistólica ( $\Delta P$ :  $0.11 \pm 0.13$  mN.mm<sup>-2</sup> ;  $\Delta IPT$   $0.44 \pm 0.27$  mN.s.mm<sup>-2</sup>; n=5), aunque se mantuvo el efecto de la extrasistolia sobre la IPT del TW (Figura 33). Esto indicaría que si bien durante la extrasistolia contribuiría al menos una importante fracción de Ca extracelular, la potenciación postextrasistólica estaría provocada enteramente por el RS. Es interesante notar que  $IPT_{TW-C}$  no se reduce en presencia de cafeína con respecto a los valores obtenidos durante los mismos experimentos en solución sin droga ( $2.32 \pm 0.42$  vs  $2.40 \pm 0.37$  mN.s.mm<sup>-2</sup>), mientras que el valor de IPT para latidos controles experimenta una notable disminución en presencia de la droga ( $49.3 \pm 6.5\%$ ; n=5). Este resultado parecería indicar que el Ca que llega al citosol durante la extrasistolia provendría principalmente del extracelular.

Con respecto a los registros calorimétricos, la droga abolió completamente la potenciación postextrasistólica en los componentes independientes y dependiente de la fuerza que fue observada en condiciones controles ( $0.10 \pm 0.06$ ,  $0.09 \pm 0.04$  y  $0.46 \pm 0.61$  mJ.g<sup>-1</sup>, para  $\Delta H1$ ,  $\Delta H2$  y  $\Delta H3$  respectivamente).

Los experimentos con cafeína también proporcionaron interesante

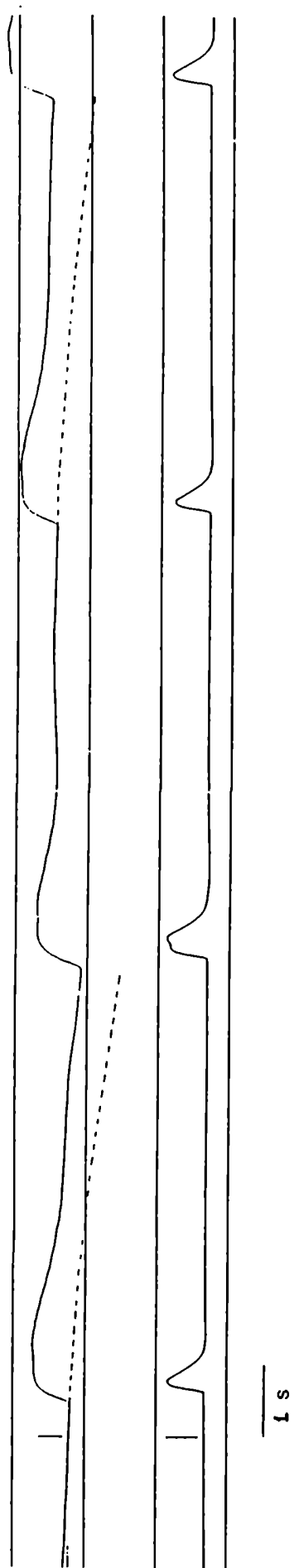


Figura 33: Trazado de un experimento tipo donde se pueden observar el desarrollo de presión (abajo) y la producción de calor (arriba) en un latido control, un latido TW y un latido PTW en presencia de cafeína 1 mM. Las barras verticales representan 10 mN·mm<sup>2</sup> (para la generación de fuerza) y 20  $\mu$ W (para la producción de calor).

información acerca de la extrasistolia, ya que en tres de los cinco experimentos realizados esta provocó un aumento en P en TW (Figura 33) de  $1.33 \pm 0.11 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ , lo cual es coherente con la parcial inhibición que provoca esta droga en el mecanismo de relajación. En estos casos particulares fue necesario el agregado de un primer componente en los ajustes de las curvas diferencias ( $0.58 \pm 0.18 \text{ mJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Un aumento de P supone una mayor ocupación de los miofilamentos por Ca. Estos últimos resultados apoyan la hipótesis que plantea que el componente H1 sería el resultado del "binding" de Ca a sitios de unión intracelulares.

## **Discusión**



A fin de avanzar en la definición de los eventos físicos, químicos y biológicos que ocurren tanto durante un latido cardíaco normal como en el proveniente ciertas situaciones patológicas (extrasístoles y postextrasístoles), se evaluó el comportamiento mecánico y energético de contracciones musculares cardíacas bajo diferentes condiciones experimentales

En general los registros mecánicos y calorimétricos totales obtenidos en este trabajo de tesis resultaron comparables con los que se encuentran en la literatura. A una concentración de Ca de 0.5 mM (correspondiente a una actividad de 0.13) los latidos estacionarios desarrollaron en promedio  $25.5 \pm 1.5 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  de presión, mientras que Gibbs y col., en músculo papilar de conejo a 0.625 mM de Ca, obtuvieron  $22.9 \pm 3.7 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$  (Gibbs, Loisselle y Wendt, 1988). Con respecto al calor por latido, en este trabajo de tesis se informó un valor de  $14.2 \pm 1.0 \text{ mJ} \cdot \text{g}^{-1}$  para latidos estacionarios, mientras que la mayoría de las estimaciones del calor por latido se encuentran entre 7 y 16  $\text{mJ} \cdot \text{g}^{-1}$  (Ponce-Hornos, 1990). Finalmente, se registró un calor de reposo promedio de  $4.15 \pm 0.24 \text{ mW/g}$ , el cual está dentro de los valores que se encuentran clásicamente en la literatura (Loisselle, 1987).

#### 1. Métodos de evaluación de registros miotérmicos.

La evaluación energética se realizó calorimétricamente. El registro calorimétrico de un latido (ya sea aislado o estacionario) muestra un comportamiento complejo que evidencia la existencia de varios componentes energéticos. La primera parte de este trabajo de tesis se abocó a desarrollar las metodologías experimental y de análisis que permitiesen

diferenciar y cuantificar estos componentes.

Antes de encarar el análisis de las respuestas miotérmicas se estudió la respuesta del calorímetro al pasaje de pulsos de corriente eléctrica a través del músculo o de diversas resistencias. Los resultados muestran que, siempre y cuando se conozca la duración del pulso, por medio de la aplicación de la Ec.1 es posible estimar la potencia entregada. A partir del producto de la potencia estimada por el tiempo de aplicación se puede conocer también el total de energía liberada. Esto es potencialmente útil para condiciones en las cuales la señal es mantenida durante un período conocido, como ocurre por ejemplo en las contracturas o en las tetanizaciones. Desafortunadamente, durante una contracción simple la duración de cada proceso que libera energía es una de las incógnitas.

La respuesta calorimétrica a un proceso liberador de energía de corta duración (como sería el caso de un latido) posee un valor máximo que es normalmente posterior al máximo de la señal. Como se muestra en la Figura 10, una respuesta calorimétrica de este tipo puede ser ajustada hasta el valor máximo por medio de la Ec.2. Seguidamente, de la integral del ajuste hasta el pico de la respuesta más el área debajo de la curva de enfriamiento del sistema calorimétrico puede estimarse la energía total liberada en el proceso.

Todo esto implica que este tipo de análisis permite conocer la potencia y la energía de un proceso mantenido por un tiempo conocido. Si en cambio el proceso liberador de energía es de duración desconocida y menor que el tiempo de integración del calorímetro sólo es posible estimar la energía total involucrada.

Dado que el objetivo estaba puesto en poder analizar curvas de

producción de calor en las que indudablemente intervenía más de un componente (como es el caso de una contracción muscular), se estudió la respuesta calorimétrica a tres pulsos de corriente de diferente duración. Las curvas de producción de calor resultantes se analizaron por la aplicación de combinaciones lineales de la Ec.2 (Ec.5). Estas curvas fueron mejor descritas por 3 que por dos componentes, y el agregado de un cuarto componente no mejoró los ajustes. Los resultados obtenidos para los ajustes de estas simulaciones apoyan la utilización de la Ec.5 en la diferenciación de componentes de producción de calor de respuestas miotérmicas complejas. Es decir, fue posible no solo estimar la energía total liberada sino que también fue posible determinar el número de componentes involucrados y sus magnitudes individuales

Se utilizó, entonces, la Ec.5 para analizar la curva de calor liberado en un latido a fin de determinar el número y la magnitud de los componentes que la integran.

Hasta el presente, el método que permitió la determinación de un mayor número de componentes calóricos durante una contracción cardíaca fue el método de Bugnard (1934). Una desventaja de este método (Alpert y Mulieri, 1982) es que se debe asumir previamente un número dado de componentes energéticos basándose en los picos o cambios de pendiente observados en el trazado. En el método presentado en este trabajo, en cambio, se toma el mínimo número de componentes que da el mejor ajuste, es decir que si se agregan más componentes la bondad del ajuste no mejora. Otra ventaja es que este método asume que todos los componentes comienzan a tiempo cero, lo cual resulta más representativo de los modelos de excitación-contracción-relajación vigentes (ver Introducción). Una vez que el Ca ingresó a la célula, el período

transcurrido desde que se inicia el "binding" del ión a TnC y a ATPasas-Ca-dependientes hasta la activación de la hidrólisis de ATP por miofilamentos y sistemas de remoción de Ca debe ser necesariamente muy pequeño. Es esperable al menos que sea menor a 100 ms, que es tiempo en el que aproximadamente se producen la máxima velocidad de contracción y el pico del transitorio de Ca medido con fura (Callewaert, Cleemann y Morad, 1989). En contraposición el método aplicado por Alpert asumía que un componente comenzaba cuando el anterior llegaba al máximo (aproximadamente 400 ms). Esto es en realidad el resultado de una limitación de la metodología de análisis aplicada por estos autores. Este esquema o bien implica que cada proceso en el músculo comienza cuando finaliza el anterior, o bien se debe asumir que es incapaz de separar componentes energéticos identificados a procesos relativamente puros. Finalmente, hay que agregar que el método aplicado en la presente tesis resultó más sensible, ya que permitió la diferenciación cinética de un mayor número de componentes (Figuras 12, 13 y 14).

## 2. Componentes de latidos aislados y estacionarios. Significado de los mismos.

Como surge de los registros miotérmicos presentados en las Figuras 13 y 14 ha sido posible la determinación de cuatro componentes cinéticamente diferenciables de liberación de calor en latidos aislados. En cambio, en latidos estacionarios pudieron distinguirse cinéticamente sólo tres componentes (Figura 12) , mientras que una cuarta fracción de calor se obtuvo por la diferencia entre el calor total asociado a un latido menos la suma de los tres componentes ajustados.

Los resultados presentados en las figuras 8, 13 y 18 muestran que el componente H4 se activa durante el latido aislado y alcanza una meseta (aproximadamente de  $180 \mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) luego de los 50 segundos, para finalmente desactivarse después de los 100 s cuando la señal comienza a caer con la velocidad de enfriamiento del calorímetro. En cambio, en latidos estacionarios la diferencia existente entre  $H'a$  y la suma de los tres componentes ajustados sugiere que H4 alcanzaría una potencia significativamente mayor (alrededor de  $450 \mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ). La diferencia de valores obtenidos entre estas dos condiciones extremas se evaluó estudiando la evolución que  $\dot{H}4$  muestra durante la transición entre ellas. En estos experimentos se demostró que la meseta que se establece al final del latido aislado (o de los trenes de latidos), y que fue tomada como una medida de  $\dot{H}4$ , se incrementa con la aparición de una segunda contracción, y a su vez se vuelve a incrementar con el agregado de una tercera. Sin embargo el  $\dot{H}4$  obtenido luego de tres contracciones sucesivas fue prácticamente idéntico al obtenido en latidos estacionarios (Figura 19). Cabe destacarse que el valor de  $\dot{H}4$  para latidos estacionarios obtenido en estos últimos experimentos no difirió del hallado previamente (como la diferencia entre  $H'a$  y la suma de los tres componentes multiplicada por la frecuencia de estimulación). Por lo expuesto, los resultados indican que H4 corresponde a un proceso que es activado cuando se estimula al músculo luego de una pausa prolongada, y se incrementa durante los tres primeros latidos de un tren, estableciendo finalmente un "plateau" sobre el cual se adicionan los otros tres componentes identificados.

Como se mencionó en la sección 3 de resultados, H4 resultó independiente de la P generada tanto en latidos aislados como estacionarios.

rios. Por otra parte, como se ilustra en la Figura 16, este componente desaparece en las condiciones anóxicas que son provocadas por burbujeo de la solución de perfusión con  $N_2$ . A su vez en experimentos en progreso realizados en nuestro laboratorio (que no se muestran en la presente tesis), H4 se mostró dependiente de la concentración de Ca en latidos aislados. La dependencia de este componente con la concentración de Ca del medio y su eliminación en ausencia de  $O_2$ , indican un probable origen mitocondrial. Otro elemento a tener en cuenta es la lenta evolución temporal de este componente, lo cual podría vincularse con la lentitud característica que tiene la mitocondria para la captación del Ca.

La alta dependencia que manifiesta H4 respecto de la presencia de  $O_2$ , no es suficiente para adscribir a este componente al proceso de recuperación metabólica. De hecho, la magnitud de H4 no se correlaciona ni con el número de contracciones (sólo aumenta durante las tres primeras contracciones luego de un período de reposo) ni con la presión desarrollada. Además si bien para un latido aislado la relación  $H4/(H1+H2+H3)$  resultó igual a 1.24 (valor razonable para una relación recuperación/consumo), para latidos estacionarios esta disminuyó a 0.24. La distinta contribución que presenta H4 en el calor total de un latido aislado vs. un latido estacionario explica la diferencia observada entre el calor total de ambos tipos de latidos (Tabla II).

La disminución (que en promedio corresponde al 75% del valor obtenido en condiciones controles) de la pendiente de la regresión entre H3 y P en ausencia de  $O_2$  (Figura 17) implica que al menos una fracción de la recuperación se ubicaría en el tercer componente. Pero, ¿dónde se ubica, entonces, el resto de la recuperación? El calor de recuperación de una contracción debe representar alrededor del 50% del calor total

liberado. Sin embargo hay que tener en cuenta que el burbujeo con  $N_2$  no asegura el total desplazamiento del  $O_2$  de la solución de perfusión (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982). El tal caso, el  $O_2$  remanente podría ser suficiente para mantener una fracción de recuperación que no es eliminada en presencia de  $N_2$ . Por lo tanto no ha podido identificarse su ubicación en los componentes energéticos. Por otro lado, como en estos experimentos no se inhibió la glucólisis anaeróbica sería de esperar que esta estuviese aumentada en ausencia de  $O_2$  por efecto Pasteur (Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer, 1982). Por lo tanto el  $O_2$  remanente en la solución y una glucólisis aumentada podrían ser suficientes para recuperar los bajos requerimientos de energía del músculo durante estos experimentos (alrededor de una contracción cada 5 minutos).

Los componentes H1, H2 y H3 se activan latido a latido, y son diferenciables tanto en latidos aislados como estacionarios.

El único componente de liberación de calor que se correlacionó con P e IPT fue H3 (Fig 15 y 28). Esta correlación se observó tanto en latidos aislados como estacionarios. De este hecho se concluye que esta fracción de calor debe representar el calor asociado a la generación de fuerza, y por lo tanto debería contener la hidrólisis de ATP a nivel de los puentes actomiosínicos. Si expresamos a H3 y a P en la mismas unidades (usando 1.05 como la densidad del músculo (Hill, 1965), la pendiente que se obtiene para la correlación entre ambos parámetros (0.24) es adimensional. La inversa de esta pendiente es 4.17 y representaría el coeficiente isométrico de calor, el cual ha sido muy utilizado como índice de la economía de la contracción (Mulieri y Alpert, 1982; Ponce-Hornos, Musi y Bonazzola, 1990). El valor que se presenta en esta tesis para el coeficiente mencionado es comparable al informado por

Gibbs ( $\approx 3.7$ ) y mucho menor al obtenido por Mulieri y Alpert ( $\approx 8.8$ ) (Mulieri y Alpert, 1982). La diferencia entre los resultados de estos dos autores ha sido tentativamente explicada a través de la supuesta inclusión en los valores de Gibbs del calor de recuperación. Mulieri y Alpert (1982) calcularon que si se eliminaba al calor de recuperación, el coeficiente subiría de 3.7 a 6.7. Si se aplica el mismo criterio a los resultados presentados en esta tesis (asumiendo que H3 incluye la recuperación de la energía gastada para la generación de fuerza) el coeficiente isométrico de calor subiría a 7.5.

El componente H3 se relacionó con (Ca), en forma similar a P (Figuras 20 y 23), mostrando ambos parámetros una relación sigmoide con la actividad extracelular de este ión. Tanto es así que la relación de H3 con P, a Ca variable, se comporta linealmente ( $r:0.847$ , ordenada al origen:  $0.45 \pm 2.41 \text{ mJ.g}^{-1}$ , pendiente:  $0.23 \pm 0.07 \text{ mJ.mm}^2.\text{mN}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ,  $n=23$ ) en el rango de las concentraciones utilizadas.

Como se mencionó previamente, desde los trabajos de A.V. Hill se sabe que existe una fracción de calor activo que no es dependiente de la generación de fuerza, al cual se llamó calor de activación. Este calor a sido clásicamente vinculado a los movimientos de Ca en la célula. En el presente trabajo, de los cuatro componentes de calor, tres de ellos resultaron independientes de P. El H4 además de lo puntualizado respecto a su origen mitocondrial tiene una evolución temporal que lo descarta como parte del llamado calor de activación. En efecto, el calor de activación en músculo esquelético es de rápida evolución, ubicándose dentro del primer segundo de la respuesta calorimétrica (Mulieri y Alpert, 1982). Del mismo modo, en el corazón, el calor independiente de tensión descrito está ubicado dentro de los primeros dos segundos de



evolución (Mulieri y Alpert, 1982). Todo esto indicaría que en los trazados obtenidos en este trabajo el calor de activación estaría ubicado en los dos primeros componentes, H1 y H2. Estos dos componentes energéticos resultaron independientes de todos los parámetros contractiles (P, IPT, -P y +P). Este es un punto particularmente importante, ya que estos componentes energéticos independientes de la generación de fuerza se determinaron en condiciones más fisiológicas que las utilizadas por otros autores. Hasta el presente para obtener fracciones de calor independientes de la fuerza generada se debió recurrir a imponer al músculo condiciones de no generación de fuerza, lo cual asume que este componente de calor posee la misma magnitud tanto si el músculo está generando fuerza como si no lo está. Los experimentos realizados bajo condiciones de no generación de fuerza asumen también que la intervención que se utiliza para tal efecto no afecta a los procesos comprendidos en el calor de activación. Las intervenciones más utilizadas fueron el acortamiento del músculo por debajo de la longitud óptima de generación de fuerza, el sometimiento del tejido a soluciones hipertónicas y el método de "quick release" (Gibbs, Losselle y Wendt, 1988; Mulieri y Alpert, 1982). En músculo esquelético y cardíaco, Mulieri y Alpert (1982) obtuvieron también dos componentes independientes de P, los cuales fueron asociados por los autores con diferentes etapas del ciclaje de Ca en el miocito. Estos autores muestran que de la suma de estos dos componentes, en el músculo esquelético se obtienen valores comparables ( $0.87 \text{ mcal.g}^{-1}$ ) al calor de activación aceptado en la literatura. Sin embargo los valores que obtuvieron para el calor de activación de músculo cardíaco resultaron excesivamente bajos (aproximadamente el 20% del obtenido en músculo esquelético). Cabe destacarse que

estos autores realizaron estos experimentos en condiciones muy alejadas del estado fisiológico del tejido, ya que además de las inevitables isquemias durante las mediciones que exige el método de las termopilas, con el objeto de minimizar el desarrollo de fuerza debieron someter al preparado a soluciones 815 mOsm (obtenidas por agregado de manitol). En la presente tesis H1 y H2 resultaron dependientes de la  $(Ca)_o$ , en forma sigmoidea (Figuras 21 y 22), lo cual está de acuerdo con la hipótesis que relaciona a estas fracciones con el calor de activación, el cual es altamente dependiente de la concentración de este ión (Gibbs, Loisselle y Wendt, 1988). En los experimentos presentados en esta tesis para latidos estacionarios a 0.5 mM de Ca se obtuvieron valores de 1.6 y 3.2  $mJ.g^{-1}$  respectivamente, que sumados dan 4.8  $mJ.g^{-1}$ , un valor que está en el orden de los presentes en la literatura para el calor de activación (Gibbs, Loisselle y Wendt 1988). Debido que H1 y H2 representan a dos componentes diferenciables cinéticamente sería esperable que estuvieran asociados al menos a dos procesos distinguibles. Ya que los dos forman parte del calor independiente de tensión que es activable latido a latido y ambos son dependientes de  $(Ca)_o$ , se puede hipotetizar que representan diferentes etapas del ciclado de Ca durante una contracción. Como se especificó anteriormente, por ser el de evolución más rápida H1 podría ser asociado, en primera instancia, con los eventos iniciales que ocurren en una contracción. La contracción se inicia con la entrada masiva de Ca al citosol, tal que independientemente de que provenga del medio extracelular o de compartimientos intracelulares resulta en un incremento de la concentración citosólica de Ca. Como consecuencia de esto se produce el pegado de Ca a diferentes sitios de "binding" intracelulares. Es sabido que la asociación del ión Ca a la TnC es un

proceso exotérmico (Imaizumi, Tanokura y Yamada, 1990). La desaparición de H1 durante la extrasistolia (Figura 27) refuerza la hipótesis presentada sobre el origen de H1. Se debe recordar aquí que la extrasistolia se provoca en un tiempo muy próximo a la presión pico y no se observan variaciones en P originadas por este tratamiento, con lo cual es realmente esperable no tener variaciones en la cantidad de Ca unida a los miofilamentos en forma simultánea. A esto se suma que en presencia de cafeína 1 mM, en ciertos experimentos, aumentó la P asociada a TW respecto a su control, y para estos casos en particular reapareció H1 en los trazados de calor. Esto también apoya la hipótesis sostenida sobre el origen de H1, ya que es esperable que el aumento de P registrado esté provocado por un aumento en el "binding" de Ca a TnC. Los trazados de calor asociados a la extrasistolia presentaron un componente que debido a sus características (tiempo al pico,  $\lambda$ ) fue asociado a H2. Esto nos muestra que contrariamente a H1, H2 representaría una fracción de calor que no es dependiente de la ocupación de los sitios de "binding" de Ca intracelulares. Los resultados presentados sugieren que H2 es un componente asociado a movimientos de Ca (como podría inferirse por su dependencia con la concentración de este ión), aunque es independiente de la generación de fuerza y no parece estar asociado a procesos de "binding" de Ca. El principal evento exotérmico Ca dependiente que quedaría es la recaptación del Ca citosólico por medio de los sistemas activos. Sin embargo no se cuenta con evidencias experimentales unívocas sobre el origen de H2. Estas interpretaciones se encuentran apoyadas por los resultados de Mulieri y Alpert (1982), ya que estos autores también asociaron a sus componentes independientes de tensión secuencialmente con el "binding" de Ca a TnC y recaptación de este ión, respectivamente.

La suma de H1 y H2 es similar al calor de activación obtenido por Homsher ( $1.02 \text{ mcal.g}^{-1}$ ) (Homsher, Mommaerts, Ricchiuti y Wallner, 1972) y por Mulieri y Alpert ( $0.87 \text{ mcal.g}^{-1}$ ) (Mulieri y Alpert, 1982) para músculo esquelético. El modelo propuesto, en el cual H1 representaría el "binding" de Ca a TnC y H2 la remoción del Ca del citosol (y que resulta coherente con los dos componentes descritos para el calor de activación de músculo esquelético) se puede contrastar con datos extraídos de la literatura. Usando una relación de  $1 \mu\text{mol Ca.g}^{-1}$  de miofibrillas, una entalpía para el binding de Ca a TnC entre  $-32$  y  $-26 \text{ kJ.mol}^{-1}$  Ca (Imaizumi, Tanokura y Yamada, 1990; Mulieri y Alpert, 1982) y asumiendo un contenido de miofibrillas de  $0.1 \text{ g.g}^{-1}$  (Mulieri y Alpert, 1982), el calor asociado al componente H1 indicaría que alrededor del 60% al 73% de la TnC está saturada por Ca. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Hoffman y Fuchs (1987). Estos autores calcularon que para alcanzar niveles de P como los registrados en este trabajo ( $25.5$  y  $33.2 \text{ mN.mm}^{-2}$ , para latidos estacionarios y aislados respectivamente) sería necesario ocupar entre el 60% al 70% de la TnC. Para remover el Ca que se libera al citosol en una contracción a través de los sistemas de bombeo del sarcolema o del retículo sarcoplásmico debe hidrolizarse ATP (según el sistema interviniente se remueven 1 o 2 Ca por ATP respectivamente) y por lo tanto debe liberarse calor. Debido a que además de la troponina C existen varios sitios intracelulares que unen Ca con alta afinidad, es esperable que el Ca liberado durante una contracción sea mayor que la fracción unida a TnC. Por lo tanto la energía requerida para remover todo el Ca liberado debería ser mayor que la esperable para bombear la fracción asociada a TnC. Si se usa  $44 \text{ kJ.mol}^{-1}$  como entalpía de hidrólisis de creatina fosfato y una relación Ca/ATP intermedia de

1.5 es esperable que para la remoción del Ca unido a TnC (calculado a partir de H1) se liberen alrededor de  $1.92 \text{ mJ.g}^{-1}$ . Esta cantidad de calor está contenida en los valores obtenidos para H2, quedando un resto de energía en este componente que puede contener la remoción de Ca no unido a TnC y el transporte de Na y K asociado al evento mecánico (Ponce-Hornos, 1990). Por otro lado, asumiendo que todo H2 esté asociado al ciclado de Ca resulta (utilizando nuevamente una relación Ca/ATP de 1.5 y el promedio de H2 entre latidos aislados y estacionarios) que la magnitud de este componente pronostica la remoción de aproximadamente  $0.1 \mu\text{mol Ca.g}^{-1}$ . Mulieri y Alpert (1982) calcularon que el músculo esquelético (a  $0^\circ\text{C}$ ) removía  $0.18 \mu\text{mol Ca.g}^{-1}$ . Hay que tener en cuenta que estos autores consideraron para el cálculo todo el calor de activación (componentes rápido y lento) (Mulieri y Alpert, 1982). Las diferencias en el preparado experimental y en los cálculos que existen entre este trabajo y el publicado por Alpert y Mulieri explican ampliamente la disimilitud en los valores obtenidos.

Se debe destacar que es la primera vez que se mide el calor de activación del músculo cardíaco en presencia de la generación de fuerza, que se obtuvieron valores muy similares a los medidos clásicamente en el músculo esquelético y que pudieron ser identificados dos componentes de activación. La importancia de esta medición es aún más relevante si se tiene en cuenta que previamente sólo se había logrado diferenciar dos componentes en el calor de activación si se sometía al músculo a soluciones altamente hiperosmóticas con el fin de anular el desarrollo de fuerza, y que la magnitud obtenida en estos estudios previos resultaba exageradamente pequeña.

### 3. Contracciones extrasistólicas y postextrasistólicas.

El agregado de un segundo estímulo a 200 ms del primero provoca una prolongación en el mantenimiento de la fuerza sin afectar la máxima velocidad de relajación. Como consecuencia se induce un aumento del área bajo la curva de presión intraventricular. Energéticamente, el resultado de este segundo estímulo es la aparición de dos componentes de calor que comienzan luego de los 200 ms. Los dos componentes energéticos mencionados fueron asociados a H2 y H3 debido a que poseen tiempos al pico similares a los observados en latidos aislados y estacionarios. Los valores de H3 en la extrasistolia se comportaron respecto de IPT en forma similar a los latidos estacionarios controles (Figura 28), lo que implica que el gasto energético realizado por el músculo al generar fuerza no se modificaría durante la extrasistolia.

Pero, ¿cual es la fuente de Ca que interviene en la extrasistolia? Contestar a esta pregunta, como ya se dijo en Resultados, tiene importancia mecanística, ya que puede contribuir a la comprensión de los movimientos de Ca durante la contracción y a la evaluación de las participaciones relativas de las fuentes celulares de dicho ión. Por otro lado, conocer la respuesta a esta pregunta es importante desde el punto de vista fisiopatológico debido a que las extrasistolias son un fenómeno frecuente en el corazón humano. Tanto los dos componentes energéticos como la  $IPT_{TW-C}$  asociada a la extrasistolia siguieron una cinética de saturación con la actividad de (Ca). Esto significa que la contracción en sí misma (medida por IPT y H3) y la fracción de calor asociada a movimientos iónicos durante la contracción siguieron una relación creciente con el Ca extracelular. Por otro lado la cafeína, un

conocido inhibidor de la participación del retículo sarcoplásmico en la contracción, no modificó el valor de  $IPT_{TW-C}$ . Estos resultados tomados en conjunto conducen a pensar en un origen extracelular del Ca asociado a la extrasistolia. Hay trabajos en la bibliografía que muestran la existencia de un influjo de Ca asociado a la extrasistolia (Morad y Cleemann, 1987). Esto último es totalmente esperable, ya que es sabido que la señal que activa la contracción en el músculo cardíaco es la entrada de Ca desde el medio extracelular. Sin embargo los resultados aquí presentados sugieren una participación casi exclusiva del Ca extracelular durante la extrasistolia, ya que la  $IPT_{TW-C}$  asociada a ella no se modificó inhibiendo la función del retículo sarcoplásmico con cafeína. Esto último es importante, ya que indicaría que la liberación de Ca desde el retículo sarcoplásmico tendría un período refractario de por lo menos 200 ms.

La aplicación del estímulo extrasistólico produce, además de los efectos mecánico-energéticos mencionados, la potenciación de la fuerza en el latido siguiente. Este fenómeno, llamado potenciación post-extrasistólica, es conocido desde hace tiempo en la literatura (Hoffman, Bindler y Suckling, 1956). Sin embargo el mecanismo involucrado en este proceso es un problema aún no resuelto. En los experimentos presentados en esta tesis se mostró que además de P e IPT se potenciaron los tres componentes energéticos activables latido a latido (es decir H1, H2 y H3). El comportamiento manifestado por H3 respecto a IPT en esta condición experimental no se modificó respecto de los valores controles (Figura 28). De esto resulta, al igual que en las extrasistolias, que el gasto energético para generar fuerza es el mismo que en un latido normal. Como resultaron incrementados H1 y H2 (ambos componentes

dependientes de los movimientos de Ca), puede interpretarse que la potenciación de la fuerza (y de la fracción de calor dependiente de la fuerza) puede deberse a un aumento de la oferta de Ca al citosol durante PTW. Cuando se modificó el contenido de Ca del extracelular, contrariamente a lo que ocurrió en la extrasistolia, en la postextrasistolia la potenciación en valores absolutos de todos los parámetros mecánicos y energéticos estudiados mostró un pico a una  $(Ca)_o$  de 0.13 mM. A su vez, esta potenciación medida en porcentajes respecto al control previo se redujo con el aumento de  $(Ca)_o$ . Probablemente, estos últimos resultados son debido a la progresiva saturación, con el aumento del Ca extracelular, de uno o más de los mecanismos que intervienen en la contracción. Dicho de otra manera, a medida que el sistema se aproxima a la saturación queda menos margen para la potenciación.

Si la potenciación de la maquinaria contráctil durante PTW se debe a un aumento en la oferta de Ca al citosol, surge necesariamente la pregunta de cual es la fuente de Ca que interviene en este mecanismo. Es sabido que el retículo sarcoplásmico tiene una participación muy importante en el proceso contráctil del corazón de los mamíferos (Morad y Cleemann, 1987). La cafeína inhibe la participación de esta organela a través del vaciamiento del contenido de Ca de la misma (Bers, 1985). La completa desaparición de la potenciación de P, IPt, H1, H2 y H3 en presencia de cafeína 1 mM indica que el retículo sarcoplásmico tiene una participación preponderante en este proceso. Se sabe que la cafeína disminuye la captación de Ca por el retículo sarcoplásmico (Weber y Herz, 1968; Shine y Langer, 1971) e induce la liberación del mismo ión desde esta organela (Thorpe, 1973; Fabiato y Fabiato, 1978). Estos dos efectos conducen a una depleción del contenido de Ca de la organela



(Bers, 1985). Debe tenerse en cuenta que la cafeína, además de sus efectos sobre el retículo sarcoplásmico, 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). Sin embargo a las concentraciones de la droga utilizadas en este trabajo se observa un marcado efecto inotrópico negativo ( $P$  disminuye al 50%), lo que indica que prevalece la acción sobre el retículo sarcoplásmico. La droga también aumenta la sensibilidad al Ca de los miofilamentos (Fabiato, 1981b; Wendt y Stephenson, 1983), aunque este efecto ha sido observado recién a dosis superiores a 10 mM (Blayney, Thomas, Muir y Henderson, 1978; Wendt y Stephenson, 1983). Por lo tanto hay razones suficientes para pensar que en los experimentos presentados en esta tesis la cafeína ha actuado fundamentalmente como inhibidor de la participación del retículo sarcoplásmico en la contracción. Además, es sabido que esta organela tiene una importante participación en el ciclo contráctil del ventrículo de rata (Fabiato y Fabiato, 1978; Bers, 1985) y particularmente en lo que se refiere a los fenómenos inotrópicos frecuencia dependientes como lo es la potenciación post pausa (Bers, 1985; Marengo, Márquez y Aramendía, 1991). Los resultados presentados en este trabajo están de acuerdo con lo hallado previamente por Morad y Cleeman (1987) en ventrículo de gato. Estos autores hallaron que mientras la fuerza se potenciaba en la post-extrasistolia, la duración del potencial de acción y el influjo de Ca a la célula (medido como depleción de Ca extracelular) no se modificaban.

Los resultados presentados permiten postular el siguiente mecanismo: durante la extrasistolia ingresaría a la célula una fracción extra

de Ca proveniente del medio extracelular que provocaría un retardo en la remoción del Ca unido a TnC (que provoca el retardo observado en la relajación y el consecuente aumento en IPT). Esta fracción de Ca se almacenaría en el RS (casi completamente, ya que no se observaron diferencias entre la  $IPT_{TW-C}$  y la  $IPT_{PTW-C}$ ), y se liberaría durante PTW conjuntamente con la fracción de Ca reciclada constantemente latido a latido. La liberación de Ca desde RS, aumentada durante la postextrasistolia, generaría entonces la potenciación observada. En presencia de cafeína, como la recaptación por parte del RS se halla inhibida por la droga (Weber y Herz, 1968; Bers, 1985), la fracción de Ca que entra a la célula durante la extrasistolia no puede almacenarse en la organela y desaparece la potenciación de PTW.

## **Resumen**

El conocimiento de los procesos energéticos que ocurren en el ciclo contráctil del músculo cardíaco es de suma importancia para el establecimiento de un modelo de excitación-contracción-relajación más completo y perfeccionado que el existente. A su vez, tener un modelo bien establecido de los componentes energéticos que se activan durante una contracción facilitaría el estudio comparativo del comportamiento del músculo cardíaco de diferentes especies y/o estados patológicos en una misma especie. Este tipo de estudios comparativos podrían llevarse a cabo simplemente determinando la magnificación, reducción o desaparición de un componente energético particular que esté identificado a un evento que ocurre durante el ciclo contráctil.

Hasta el momento otros autores habían logrado determinar como máximo dos componentes energéticos diferenciables cinéticamente más un tercero obtenido por diferencia con el calor total por latido. A su vez estas mediciones siempre se realizaron en condiciones poco fisiológicas que incluían isquemias transitorias y, para medir el calor de activación, la necesidad de trabajar en un estado de no generación de fuerza (logrado a través de soluciones hipertónicas, preacortamiento del músculo o "quick release").

En este trabajo de tesis se utilizaron ventrículos de rata arterialmente perfundidos, y se evaluó con un sistema microcalorimétrico el comportamiento mecánico y energético (Ponce-Hornos, 1982) de contracciones obtenidas luego de un largo reposo o a la frecuencia de estimulación de 0.16 Hz bajo diferentes condiciones experimentales.

Tanto los registros mecánicos como los energéticos globales se ubicaron dentro de los valores que registra la literatura ( $25.47 \pm 1.53$  mN.mm<sup>-2</sup> y  $14.2 \pm 1.0$  mJ.g<sup>-1</sup> respectivamente, para latidos obtenidos a 0.16 Hz y 0.5 mM Ca).

Con la aplicación de un sistema de ecuaciones de difusión para lámina plana ha sido posible la determinación de cuatro componentes de liberación de calor ( $H1=2.1 \pm 0.3$ ,  $H2=2.3 \pm 0.3$ ,  $H3=9.1 \pm 0.7$ ,  $H4=16.7 \pm 1.6$  mJ.g<sup>-1</sup>) en los latidos obtenidos luego de un largo reposo (siempre mayor a 5 minutos). En cambio, en latidos obtenidos en un músculo estimulado de 0.16 Hz se manifestaron sólo tres de los cuatro componentes hallados previamente ( $H1= 1.6 \pm 0.1$ ,  $H2= 3.2 \pm 0.4$ ,  $H3= 6.3 \pm 0.5$  mJ.g<sup>-1</sup>). Se muestran evidencias que indican que estos tres componentes se liberan sobre una fracción de calor (entre 380 y 450  $\mu$ W.g<sup>-1</sup>) que se adiciona al calor de reposo durante la actividad contráctil del músculo. Los resultados sugieren que este calor adicional proviene del componente H4 (el de más lenta evolución), que se activa en el primer latido luego de un reposo y sólo aumenta durante las dos contracciones subsiguientes, alcanzando un valor estacionario de potencia que no se diferencia del observado para latidos estacionarios. Este componente se inhibe en ausencia de O<sub>2</sub> y es sensible a la concentración de Ca del medio de perfusión, resultados que sugieren un origen mitocondrial del mismo, probablemente asociado al transporte de Ca por esta organela.

El componente H3 fue el único dependiente de la generación de fuerza, comportamiento que se repitió tanto en latidos a frecuencia de 0.16 Hz, latidos luego de un largo reposo, extrasistolias y postextra-

sistolias.

Los componentes H1 y H2 resultaron independientes de la generación de fuerza y dependientes de la concentración de Ca del medio. Es la primera vez que se logra una evaluación del calor independiente de la fuerza en presencia de la misma. La suma de los dos es muy similar al calor de activación de músculo esquelético, y por separado sus magnitudes respectivas explican satisfactoriamente la liberación de calor esperable para el "binding" de Ca a sitios intracelulares y para la remoción del Ca que activaría la contracción.

El agregado de una estimulación extrasistólica a 200 ms del estímulo que inicia la contracción provoca, en condiciones controles, la prolongación del tiempo de la contracción (y consecuentemente el aumento de la integral de la presión respecto del tiempo) sin modificar la presión máxima de la contracción. El mismo tratamiento en presencia de cafeína provocó (en 3 de los 5 casos analizados) además del aumento del área bajo la curva de la contracción, un aumento de la presión máxima generada. En los casos donde no aumentó la presión máxima, la curva de liberación de calor asociado a la extrasistolia mostró la desaparición de H1; mientras en los casos en que se registró un aumento de la presión máxima las curvas se ajustaron a los tres componentes (H1, H2 y H3). Estos resultados apoyan la vinculación de H1 con los procesos de "binding" de Ca a sitios en el citosol, ya que un aumento en la presión máxima implica que entren en juego sitios de troponina C adicionales y esto debería manifestarse calorimétricamente.

Los dos componentes energéticos y la integral de la presión respecto del tiempo asociados a la extrasistolia siguieron una cinética de saturación con la actividad de  $(Ca)_o$ . Esto significa que la contracción extrasistólica en sí misma (medida por IPT y H3) y la fracción de calor asociada a movimientos iónicos durante esta contracción siguieron una relación creciente con el Ca extracelular. Por otro lado la cafeína, un conocido inhibidor de la participación del retículo sarcoplásmico en la contracción, no modificó el valor de la integral de la presión respecto del tiempo de la contracción extrasistólica. Estos resultados tomados en conjunto conducen a pensar en un origen extracelular del Ca asociado a la extrasistolia.

La aplicación del estímulo extrasistólico produce la potenciación de la fuerza en el latido siguiente (potenciación post-extrasistólica). El mecanismo involucrado en este proceso es un problema aún no resuelto. En los experimentos presentados en esta tesis se muestra que además de P e IPT se potenciaron los tres componentes energéticos activables latido a latido (H1, H2 y H3). Del incremento de H1 y H2 (ambos dependientes de los movimientos de Ca), puede interpretarse que la potenciación de la fuerza (y de la fracción de calor dependiente de la fuerza) puede deberse a un aumento de la oferta de Ca al citosol durante PTW. La potenciación postextrasistólica de P, IPT, H1, H2 y H3 desapareció en presencia de cafeína 1 mM. Esto indica que el retículo sarcoplásmico tiene una participación preponderante en este proceso.

Los resultados presentados permiten postular el siguiente mecanismo: durante la extrasistolia ingresaría a la célula una fracción extra

de Ca proveniente del medio extracelular que provocaría un retardo en la remoción del Ca unido a TnC. Esta fracción de Ca se almacenaría en el RS, y se liberaría durante PTW conjuntamente con la fracción de Ca reciclada constantemente latido a latido. La liberación de Ca desde RS, aumentada durante la postextrasistolia, generaría entonces la potenciación observada.

La tesis en su conjunto demuestra como modelando la respuesta energética del músculo es posible analizar los eventos que ocurren durante el ciclo contráctil, y a su vez estudiar alteraciones desencadenadas sobre estos eventos por una situación patológica como lo es la aparición de una extrasistolia.



## **Bibliografía**

Affolter H, Carafoli E. The  $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{Na}^{+}$  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.

Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle.

*J Physiol (London)* 327:79-94, 1982

Alpert NR, Mulieri LA. Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. *Circ Res* 50:491-500, 1982.

Armstrong CM. Bezanilla FM. Horowicz P. Twitches in the presence of ethylene glycol bis (B-aminoethylether)-N,N' tetraacetic acid. *Biochim Biophys Acta* 267: 605-608, 1972.

Barcena-Ruiz L, Bauckelman DJ, Wier WG. Sodium-calcium exchange in heart: membrane currents and changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Science* 238:1720-1722, 1987.

Barlow R, Blake JF. Hill coefficients and the logistic equation. *TIPS* 10: 440-441, 1989.

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, Bridge JHB. *Circ.Res.* 65: 334-342, 1989.

Bers DM, Langer GA. Uncoupling calcium 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, Thomas H, Muir J, Henderson A. Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrils, 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 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.

Bridge JHB, Smolley JR, Spitzer KW. The relationship between charge movements associated with  $I_{Ca}$  and  $I_{Na-Ca}$  in cardiac myocytes. *Science* 248:376-378, 1990.

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

Bugnard L. The relationship between total and initial heat in single muscle twitches. *J Physiol (London)* 82:509-519, 1934.

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

Callewaert G, Cleemann L, Morad M. Caffeine-induced Ca release activates Ca extrusion via Na-Ca exchanger in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 257:C147-C152, 1989.

Campbell DL, Giles W. Calcium currents. de "Calcium and the Heart", pags. 27-84, ed. GA Langer, Raven Press, 1990.

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

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

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

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.

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

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.

Crank J. *The mathematics of diffusion*. Oxford Univ. Press. London, 1956.

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  $\text{Ca}^{2+}$  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 production in rabbit papillary muscle. *Circ Res* 27:601-610, 1970.

Chapman JB, Gibbs CL, Loisel 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.  $K^+$ , 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  $NaxCa$  exchange in squid axons. *J Gen Physiol* 84:895-914, 1984.

Documenta Geigy Scientific Tables, 6th Edition. Ardsley, NY, Konrad Diem Ed. Geigy Pharmaceuticals division of Geigy Chemical Corporation, 1962.

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.

Eckert R, Chad JE. Inactivation of Ca channels. Prog Biophys Mol Biol 44:215-267, 1984

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 cell from the adult rat or rabbit ventricle. 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 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 Whinkle, CRC Press INC, Boca Raton, Fl, USA, 1986.



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  $Ca^{2+}$  transport. *Federation Proc* 39:2432-2436, 1980.

Fozzard HA, Beeler JW jr. The voltage clamp and cardiac electrophysiology. *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. 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. Energy production of rat soleus muscle. *Am Physiol* 223:864-871, 1972.

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

Gibbs CL, Momaerts WFHM, 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 N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemakers potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol London* 395:233-253, 1988.

Hamoir G, Focart B, Disteché 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.

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.

Hoffman BF, Bindler E y Suckling EE. Postextrasystolic potentiation of contraction in cardiac muscle. *Am J Physiol* 185:95-102, 1956.

Hoffman PA, Fuchs F. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am J Physiol* 253:C541-C546, 1987.

Homsher E, Mommaerts WFHM, Ricchiuti NV, Wallner A. Activation heat, activation metabolism and tension related heat in frog semitendinous muscles. *J Physiol* 220: 601-625, 1972.

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.

Humffray A. *J Phys Chem* 87: 5521, 1983

Imaizumi M, Tanokura M, Yamada K. Calorimetric studies on calcium and magnesium binding by troponin C from bullfrog skeletal muscle. *J Biochem* 107: 127-132, 1990.

Johnson JD, Khabbaza EJ, Bailey BL, Briehop TJ. Calcium-binding proteins in the regulation of muscle contraction. En: "Cardiac muscle: the regulation of excitation and contraction", ed. Nathan R, Orlando, FL: Academic Press, 297-313, 1986.

Kapel'ko VI, Gorina MS, Novikoma 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.

Katizawa 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.

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

Kushmerick MJ. Energetics studies of muscles of different types. *Basic Res Cardiol* 82 (2): 17-30, 1987

Kuwata JH, Langer GA. Rapid, non perfusion-limited calcium exchange in cultured neonatal myocardial cells. *J Moll Cell Cardiol* 21: 1195-1208, 1989.

Lai FA, Anderson K, Rousseau E, Liu Q-Y, Meissner G. Evidence for a Ca channel within the ryanodine receptor complex from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 151:411-449, 1988.

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

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. 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. 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. A discrete Na-Ca exchange-dependent Ca compartment in rat ventricular cells: exchange and localization. *Am J Physiol* 262: C1149-C1153, 1992.

Langer GA, Rich TL, Orner FB. Ca exchange under non-perfusion-limited conditions in rat ventricular cells: identification of subcellular compartments. *Am J Physiol* 259:H592-H602, 1990.

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

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

Lee KS, Tsien RW. Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. *Nature* 297:498-501, 1982.

Lee KS, Tsien RW. High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea pig. *J Physiol* 354:253-272, 1984.

Letarte M, Quackenbush EJ, Baumal R, Michalak M. Correlation 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.

Lewartowski , Wolska, Zdanowski. *J Mol Cell Cardiol* 24:967-976, 1992.

Lochner W, Dudziak R. Sillstandumsatz und Ruheumzatz 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  $\text{Na}^{\text{+}}\text{-Ca}^{\text{++}}$  exchanger of calf heart sarcolemma with the help of specific antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 145 (3):1059-1063, 1987.

Marengo FD, Márquez MT y Aramendía P. Mechanisms underlying post-rest potentiation in isolated left rat atria. *APPTLA* 41: 241-251, 1991.

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.

Morad M y Cleemann L. Role of Ca channel in development of tension in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 19:527-553, 1987.

Movsesian MA, Thomas AP, Selak M, Williamson JR. Inositol triphosphate does not release  $\text{Ca}^{\text{2+}}$  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  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  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.

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 SG, Niedergerke 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.

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

Philipson KD, Nishimoto AY. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> exchange in inside -out cardiac sarcolemmal vesicles. J Biol Chem 257(9):5111-5117, 1982.

Philipson KD, Ward R. Ca<sup>2+</sup> transport capacity of sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 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 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> 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. Calcium Energetics, de "Calcium and the Heart", pags. 27-84, ed. GA Langer, Raven Press, 1990.

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, Nudd 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, Bonazzola P. Influence of extracellular K on the energetics of resting heart muscle. *Am J Physiol* 262: H1081-H1087, 1992.

Ponce-Hornos JE, Musi EA, Bonazzola P. Role of extracellular calcium on heart muscle energetics: effects of verapamil. *Am J Physiol* 258: H64-H72, 1990.

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

Rall JA. Effects of temperature on tension, tension-dependent heat, and activation heat in twitches of frog skeletal muscle. *J Physiol* 291:265-275, 1979.

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

Ricchiuti 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 in 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 <sup>45</sup>Ca flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys J* 50:1009-1014, 1987.

Rusy BF, Cuolson 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 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.

Shattock MJ, Bers DM. Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256: C813-C822, 1989.

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

Shine KI, Serena DS, 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, Schumman H, Endo M. Calcium and monovalent ions in smooth muscle. *Federation Proc* 41:2883-2890, 1982.

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.

Standen NB, Stanfield P. A binding-site model for calcium channel inactivation that depends on calcium entry. *Proc R Soc Lond [Biol]* 217:101-110, 1982.

Stanfield PR. Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *British Medical Bulletin* 42: 359-367, 1986.

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 Y, 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 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.

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.

Trautwein W, Pelzer D. Voltage-dependent gating of single calcium channels in the cardiac cell membrane and its modulation by drugs. En: Marme D, ed. "Calcium and cell physiology". Berlin: Springer-Verlag, pags 53-59, 1985.

Tsien RW. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45: 341-358, 1983.

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.

Vericat F y Grigera JR, *J Phys Chem* 86:1030, 1982.

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.

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

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

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.

**FCE y N BIBLIOTECA**

FE DE ERRATAS

<u>Página</u>	<u>Línea</u>	<u>Dice</u>	<u>Debe decir</u>
2	17	rápido	fásico
5	3	reintroducido	repuesto
13	20		(Mullins, 1979; Langer, 1982)
14	6	Mm	mM
14	7	Mm	mM
19	16	contracción	acortamiento celular
26	16	liberado	movilizado
36	10	calor específico	capacidad calorífica
43	22	del calor inicial	de "un calor inicial"
45	1	en la Figura 3b,	a la derecha de la Figura 3
49	18	Statham	Gould Statham P23 Db
53	7	calor	potencia
68			unidades de $\mu$ y $\beta$ : $s^{-1}$
81	13	presión generada	presión máxima generada
89	3	$386 \pm 56 \mu W \cdot g^{-1}$	$0.39 \pm 0.06 mW \cdot g^{-1}$
89	4	$450 \pm 103 \mu W \cdot g^{-1}$	$0.45 \pm 0.10 mW \cdot g^{-1}$
90	17	corr-espondiente	corres-pondientes
102	22	del	desde el
109		.... como TW-C	.... como PTW-C
114	3	proveniente ciertas	proveniente de ciertas
115	16	al máximo	a la finalización