

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ENERGÉTICA DE LA PARTICIPACIÓN DEL Ca EXTRACELULAR EN UNA  
CONTRACCIÓN MIOCARDICA**

Tesis Doctoral

Alicia Elvira Consolini

1994

Director: Prof. Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ENERGÉTICA DE LA PARTICIPACIÓN DEL  $\text{Ca}$  EXTRACELULAR EN UNA  
CONTRACCIÓN MIOCARDICA**

Tesis Doctoral

Alicia Elvira Consolini

1994

Director: Prof. Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos

**Lugar de desarrollo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CARDIOLÓGICAS**

**Fac. de Medicina. UBA**

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

**Asesor Académico: Prof. Dr. Pablo Lufrano**

*"Cada vez que el alba aparece, el misterio está allí enteramente"*

*R. Daumal*

*a mis padres*

*a mis amigos*

*a todos los que alguna vez me  
animaron a seguir*

## AGRACECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge Ponce-Hornos, por haberme brindado su dedicación y constante enseñanza sobre la resolución científica de problemas, por estar siempre dispuesto a la discusión y al cuestionamiento y ser fundamental en mi formación científica.
- A la Dra. María Teresa Márquez, por su constante disposición a la discusión, sus oportunas críticas y su cordial ayuda en todas las etapas de este trabajo.
- Al Dr. Alberto C. Taquini, por haberme alentado siempre en mi trabajo y haberme permitido realizar esta tesis en el Instituto de Investigaciones Cardiológicas que dirige.
- A mis compañeros de trabajo, Dra. Patricia Bonazzola, Dr. Fernando Marengo, Graciela Ottaviano y Patricia Egido, con quienes compartimos muchas horas de laboratorio, discusión, charlas y afecto.
- Al Dr. Pablo Lufrano, por haberme alentado y ayudado siempre en mi carrera.
- A mis compañeros de la cátedra de Farmacodinamia, de ayer y de hoy, que estuvieron cerca con su afecto y ayuda.
- A los compañeros y personal del ININCA por su trato siempre amistoso.
- A mis familiares y amigos, por haberme querido y ayudado siempre, cediendo muchas horas del compartir.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me permitió, a través de su apoyo económico, llevar a cabo este trabajo.

## INDICE

### INTRODUCCION

#### Capítulo 1: Generalidades

1- Ca y contracción miocárdica.....	1
2- Energética cardíaca.....	4
3- Objetivos de la tesis.....	6

#### Capítulo 2: Ca y ciclo contráctil cardíaco

1- Participación del Ca extracelular y el sarcolema.....	8
2- Mecanismos de movimiento transarcolemal de Ca.....	12
a-Canales de Ca.....	12
b-Intercambiador Na/Ca.....	15
c-Bomba de Ca sarcolemal.....	20
3- Participación del retículo sarcoplásmico.....	21
4- Participación de la mitocondria.....	25
5- Unión de Ca a proteínas contráctiles.....	29

#### Capítulo 3: Energética cardíaca

1- Evolución del conocimiento de la energética cardíaca.....	33
2- Constituyentes energéticos del músculo cardíaco.....	35
a-Metabolismo basal.....	35
b-Metabolismo activo.....	37
c-Metabolismo de recuperación.....	40
3- Métodos miotérmicos.....	42
a-Método de las diferencias de temperatura arterio-venosa.....	42
b-Método de las termopilas.....	43
c-Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos.....	44
4- Otras metodologías energéticas.....	45
a- Consumo de oxígeno.....	45
b- Resonancia magnética nuclear.....	46
5- Métodos experimentales para la diferenciación de los componentes miotérmicos de un latido.....	46

### MATERIALES Y METODOS

#### Capítulo 4: Preparación biológica

1- Montaje del corazón perfundido de rata.....	50
2- Soluciones y drogas empleadas.....	51
3- Mediciones mecánicas.....	52

## Capítulo 5: Metodología microcalorimétrica

1- Descripción del sistema calorimétrico.....	53
2- Puesta en régimen del calorímetro y calibración.....	55
3- Mediciones miotérmicas.....	56

## Capítulo 6: Protocolos generales y análisis estadístico

1- Protocolos experimentales generales.....	58
2- Ajuste de funciones y métodos estadísticos.....	59

## RESULTADOS

### Capítulo 7: Análisis de la respuesta del calorímetro de flujo

1- Respuesta miotérmica de un latido.....	61
2- Respuestas calorimétricas simples estacionaria y transitoria.....	64
3- Cuantificación de la energía liberada dentro del calorímetro.....	70
4- Respuesta calorimétrica a la aplicación simultánea de varias fuentes de energía.....	74
5- Liberación creciente de calor durante períodos prolongados.....	74
6- Conclusiones.....	78

### Capítulo 8: Diferenciación de componentes energéticos en un latido cardíaco

1- Ajuste simultáneo de componentes y cálculo de energías.....	79
2- Magnitudes de los cuatro componentes energéticos de un latido.....	83
3- Conclusiones.....	84
4- Hipótesis a evaluar.....	85

### Capítulo 9: Caracterización de los componentes energéticos de un latido

1- Dependencia de los componentes energéticos con la fuerza desarrollada.....	86
2- Dependencia aeróbica de los componentes energéticos.....	87
3- Dependencia del cuarto componente con la estimulación repetida.....	93
4- Caracterización de los componentes transitorios independientes del desarrollo de fuerza.....	93
5- Conclusiones.....	98
6- Hipótesis a evaluar.....	98

### Capítulo 10: Efectos de la variación de la disponibilidad de Ca extracelular en un latido aislado

1- Fundamentos y objetivos.....	100
---------------------------------	-----



2- Efectos de la despolarización parcial y la $[Ca]_e$ sobre el calor de reposo.....	100
3- Efectos de la despolarización parcial sobre los desarrollos de fuerza y de calor activo.....	104
4- Efectos del aumento de la $[Ca]_e$ sobre el latido aislado del miocardio despolarizado.....	107
5- Conclusiones.....	120
6- Hipótesis a evaluar.....	120

**Capítulo 11: Efectos de la hipoxia en un latido del miocardio despolarizado en alta  $[Ca]_e$**

1- Fundamentos y objetivos.....	121
2- Efectos de la hipoxia sobre el calor de reposo.....	121
3- Efectos de la hipoxia sobre el cuarto componente energético de una contracción aislada.....	121
4- Efectos de la hipoxia sobre el desarrollo de fuerza y los tres primeros componentes energéticos.....	124
5- Conclusiones.....	130

**Capítulo 12: Efectos del bloqueo de los canales de Ca sobre el comportamiento mecánico-energético de un latido**

1- Fundamentos y objetivos.....	131
2- Efectos del verapamilo sobre el latido aislado en 25 mM K y 2 mM Ca.....	131
3- Efectos del verapamilo sobre el latido aislado en condición control.....	141
4- Conclusiones.....	146

**DISCUSION**

**Capítulo 13: Vinculación de los componentes energéticos con mecanismos celulares de una contracción miocárdica**

.....	148
-------	-----

**Capítulo 14: Energética de la participación del Ca extracelular en la contracción miocárdica**

1- Modificaciones en la disponibilidad de Ca extracelular.....	158
a- Dependencia con la $[Ca]_e$ del calor de reposo del miocardio despolarizado.....	158
b- Ca extracelular y energías vinculadas al ciclo contracción-relajación en el miocardio parcialmente despolarizado.....	160
c- Vinculación diferencial de los componentes energéticos de un latido con la corriente de Ca.....	162
d- Hacia el origen del cuarto componente energético de una contracción.....	163
2- Efectos de la hipoxia en el miocardio parcialmente despolarizado.....	165

RESUMEN .....	168
BIBLIOGRAFIA.....	172
ANEXOS.....	188
Abreviaturas.....	188
Fe de erratas	193

## ***INTRODUCCION***

## Capítulo 1: Generalidades

### 1. Calcio y contracción miocárdica

El aumento del calcio libre citosólico ( $\text{Ca}^{12}$ ) dispara la contracción en los tres tipos de músculo: esquelético, liso y cardíaco (Ebashi, 1974; Adelstein y Eisenberg, 1980; Zot y Potter, 1987). Al igual que en el músculo esquelético, la contracción del músculo cardíaco se inicia con la unión de  $\text{Ca}^{12}$  a troponina C (Zot y Potter, 1987; Thompson y col., 1990 para una revisión). Sin embargo, desde hace más de un siglo (Ringer, 1883) se sabe que, a diferencia del músculo esquelético, el cardíaco es absolutamente dependiente de la presencia extracelular de  $\text{Ca}^{12}$  para efectuar la contracción.

El potencial de membrana (alrededor de  $-80$  mV) y la relación entre las concentraciones de  $\text{Ca}^{12}$  extra ( $[\text{Ca}]_e$ ) e intracelulares ( $[\text{Ca}]_i$ ) (de alrededor de  $10^4$ ) indican un elevado gradiente electroquímico para el ingreso de  $\text{Ca}^{12}$  al citosol de la fibra miocárdica. A pesar de ello, la baja permeabilidad de la membrana al  $\text{Ca}^{12}$  en condiciones de reposo mecánico es en parte responsable del mantenimiento de la baja  $[\text{Ca}]_i$  (Coraboeuf, 1978). Esta  $[\text{Ca}]_i$  que está en el orden de micromolar ( $\mu\text{M}$ ) o menor (Sheu y col., 1984) es mantenida por sistemas de transporte que, directamente o por su asociación con otros sistemas, utilizan energía química. Estos sistemas están ubicados tanto en la membrana celular o sarcolema (SL) (bomba de Ca asociada a SL e intercambiador Na/Ca) como en el retículo sarcoplásmico (RS) (bomba de Ca asociada a RS) y en la mitocondria (Reuter y Seitz, 1968; Caroni y Carafoli, 1980; Tada e Inui, 1983; Carafoli, 1985). Durante el evento contráctil, el músculo cardíaco está sometido a cambios rápidos en la  $[\text{Ca}]_i$  que oscila entre el nivel basal correspondiente al estado de reposo mecánico ( $<0.1 \mu\text{M}$ ) y aproximadamente  $2-50 \mu\text{M}$  durante la contracción (Fabiato, 1981). Para relajarse, el miocardio retorna a la  $[\text{Ca}]_i$  de reposo utilizando los mecanismos de remoción mencionados, capaces de regular cíclicamente en forma rápida y precisa los niveles de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico antes de que llegue el

nuevo potencial de acción (PA).

El problema de cuáles son las fuentes y destinos del  $\text{Ca}^{12}$  citosólico activador de la contracción en el músculo cardíaco es aún materia de discusión (Fabiato y Fabiato, 1979; Morad y Cleemann, 1987; Langer, 1994). Muchas y diversas son las metodologías que intentan abordarlo. Las mismas abarcan desde el estudio del tejido entero a las células, membranas u organelas aisladas. En general abordan, ya sea el análisis integral de los destinos del  $\text{Ca}^{12}$  en la célula o tejido, o el estudio específico de alguno de los sistemas de transporte con metodologías que pueden ser de naturaleza bioquímica, cinético-iónica, electrofisiológica, genética, fluorométrica, etc (Bers, 1983; Sheu y col., 1984; Morad y Cleemann, 1987; Langer y col., 1990; Porzig y col., 1993). Entre ellas, la metodología energética permite, como se describirá más adelante, abordar integralmente el problema de los destinos del  $\text{Ca}^{12}$  durante el ciclo reposo-excitación-contracción-relajación cardíaca.

Es conocido que el influjo de  $\text{Ca}^{12}$  a través del sarcolema se efectúa por canales de Ca cuya conductancia es afectada por fosforilación de sus proteínas constituyentes y por la naturaleza de los fosfolípidos y los carbohidratos que lo rodean (glicocálix) (Tsien, 1983). El  $\text{Ca}^{12}$  que entra a la célula vía canales serviría para inducir una posterior liberación de  $\text{Ca}^{12}$  desde la cisterna lateral del RS (Fabiato, 1983) o activar directamente a los miofilamentos (Langer, 1986). La participación relativa de estas fuentes de Ca varía con las especies. La liberación de  $\text{Ca}^{12}$  del RS predomina en el ventrículo de rata, el influjo de  $\text{Ca}^{12}$  extracelular es preponderante en el ventrículo de batracio y participan variables proporciones de ambas fuentes en los corazones de conejo y cobayo (Fabiato y Fabiato, 1978; Morad y Cleemann, 1987; Wang y col., 1993). Si bien los canales de Ca representan la vía más importante de influjo de  $\text{Ca}^{12}$  extracelular durante el PA, en ciertas condiciones como la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  intracelular se ha descrito la participación del intercambiador Na/Ca (Ponce-Hornos y Langer, 1980; Bers y Ellis, 1982; Bers y col., 1988).

La elevación de la  $[Ca^{12}]_i$  a niveles cercanos a las  $K_{0.5}$  ( $[Ca]_i$  en la que se activa el 50% de los sitios específicos de unión) de los diversos sistemas celulares activa a los mismos. Así, no sólo debe ocurrir la unión de  $Ca^{12}$  a troponina C ( $K_{0.5} \approx 0.4 \mu M$ ; Potter y Gergely, 1975), sino también a los sitios específicos de los sistemas de remoción de  $Ca^{12}$  citosólico como la Ca-ATPasa del RS ( $K_{0.5} \approx 0.1$  a  $0.5 \mu M$ ; Carafoli, 1985), la Ca-ATPasa de SL ( $K_{0.5} \approx 0.3$  a  $0.5 \mu M$ ; Carafoli, 1985) y el intercambiador Na/Ca ( $K_{0.5} \approx 2$  a  $40 \mu M$ ; Carafoli, 1985; Langer y col., 1993). Además, el  $Ca^{12}$  se une a sitios específicos en proteínas citosólicas como la calmodulina (Klee y Vanaman, 1982) y a otros sitios fijos intracelulares (Peskov y col., 1992). El grado de unión de Ca a troponina C (Tn-C) determina, junto al grado de solapamiento de los miofilamentos, el grado de acoplamiento actomiosínico. Por lo tanto, ambos factores determinan la magnitud de la fuerza desarrollada (Kerrick y col., 1980). Debido a la proximidad en las afinidades, no debe tardar en establecerse una competencia cercana al equilibrio entre los sistemas reversibles de unión. El transporte activo por las Ca-ATPasas o el flujo neto de  $Ca^{12}$  a través del intercambiador Na/Ca (Langer y col., 1993) son los mecanismos que pueden desviar ese equilibrio removiendo el  $Ca^{12}$  libre citosólico y el  $Ca^{12}$  unido a Tn-C, con lo que se provoca la relajación. En ese sentido, la máxima  $[Ca^{12}]_i$  (medida por el método de la proteína sensible a Ca, aequorina) ha sido registrada en el tiempo aproximado en que el músculo alcanza su máxima velocidad de desarrollo de fuerza contráctil (Allen y Kurihara, 1980). Esto indica el temprano retorno del  $Ca^{12}$  libre citosólico a los niveles de reposo, ya sea por la inicial unión a los sitios enlazantes como por la remoción activa.

Tanto la unión de  $Ca^{12}$  a sitios enlazantes como la hidrólisis del ATP (por los sistemas de transporte activo o el acoplamiento actomiosínico) y las reacciones del metabolismo oxidativo son procesos exotérmicos (Curtin y Woledge, 1978; Imaizumi y col., 1990). Por lo tanto, las metodologías miotérmicas podrían servir para evaluar integralmente los eventos vinculados al ciclo reposo-contracción-

relajación en un tejido o célula entera. Esta evaluación requiere la identificación y cuantificación de las fracciones energéticas correspondientes a cada evento celular. Este establecimiento del patrón mecánico-energético del miocardio no ha sido hasta el momento totalmente resuelto por la literatura y constituye el objetivo general de esta tesis.

La evaluación conjunta de los mecanismos celulares del ciclo contracción-relajación (de los que la movilización de  $\text{Ca}^{+2}$  juega un papel preponderante) mediante el enfoque energético permitiría analizar a cada mecanismo interrelacionado con los otros en una condición de mantenimiento de la integridad celular. Ese objetivo es escasamente alcanzado por la extrapolación de la información obtenida a partir de los diferentes sistemas aislados a la condición de integridad celular. Por eso, mediciones efectuadas en células o tejidos enteros, como las obtenidas a través de un estudio miotérmico, pueden establecer límites a la extrapolación del conocimiento específico de cada mecanismo celular.

## 2. Energética cardíaca

Los eventos que ocurren durante el ciclo de contracción-relajación requieren energía química para la interacción actomiosínica y el mantenimiento de gradientes electroquímicos. Esto resulta en una liberación de calor, que estará cuantitativamente relacionada con el evento que lo originó. Toda esa energía química consumida debe ser repuesta por los procesos de recuperación metabólica, en su mayoría aeróbicos, que involucran consumo de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), desprendimiento de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y liberación de calor. Debido a esto, tanto la medición del calor liberado por el músculo como la del  $\text{O}_2$  consumido pueden ser instrumentos experimentales para la caracterización del estado miocárdico (Gibbs y Chapman, 1979a). Hay diferencias importantes entre ambos tipos de metodologías. La medición del calor refleja tanto los procesos físico-químicos que ocurren durante la etapa de consumo (ciclo reposo-contracción-relajación) como los de la recuperación aeróbica y anaeróbica del ATP. En cambio, el

consumo de  $O_2$  sólo registra la actividad de recuperación aeróbica, que es proporcional al consumo.

Loiselle ha definido conceptualmente el primer propósito de la energética cardíaca. Consiste en establecer correspondencias cuantitativas entre las diversas fracciones de la energía total transformada por el miocardio y los distintos eventos físico-químicos que ocurren durante el ciclo reposo-excitación-contracción-relajación (Loiselle, 1987). A partir de esto será posible evaluar la participación de eventos celulares en estados fisiológicos o patológicos.

Cabe preguntarse cómo puede ser aplicada la termodinámica clásica al estudio de un músculo. El músculo cardíaco es un sistema termodinámico abierto ya que intercambia tanto energía (en forma de calor y trabajo) como materia con sus alrededores. Sin embargo, se pueden asumir ciertas simplificaciones que permiten el tratamiento de una preparación muscular aislada como un sistema termodinámico cerrado a presión y volumen constante. En este sistema, los términos energía y entalpía son intercambiables (Wilkie, 1960; Gibbs y Chapman, 1979a). Gibbs ha explicado el comportamiento termodinámico de un músculo en el que se producen "n" moles de reacción, a partir de la primera ley de la termodinámica (Gibbs y Chapman, 1979a). Esto exige que la temperatura, presión y volumen del sistema permanezcan constantes durante la reacción. A los fines prácticos el primer punto puede asumirse, pues los cambios térmicos que acompañan al intercambio de gases respiratorios son despreciables respecto del calor liberado por las reacciones químicas, y este último es inmediatamente perdido hacia el medio o sistema calorimétrico (Wilkie, 1960; Gibbs y Chapman, 1979a). Por otra parte, las reacciones de la contracción muscular isométrica tienen lugar a presión constante (atmosférica) y con cambios de volumen despreciables. Estos cambios provienen de una desigualdad entre el número de moles de  $O_2$  extraídos del medio y el número de moles de  $CO_2$  desprendidos por el músculo. Corresponden a sólo 0.3 mol de gas por cada mol de  $O_2$  consumido, lo cual representa menos del 0.2 % del cambio de entalpía total (Opie, 1969).



Asumidos temperatura, presión y volumen constantes, los cambios entálpicos de la reacción química igualan a la suma del calor intercambiado y el trabajo termodinámico realizado, según la siguiente relación:

$$n \cdot \Delta H = Q + w \quad (1)$$

donde  $\Delta H$  es el cambio en la entalpía molar de la reacción química en el músculo (energía a intercambiar por mol de reactivo),  $Q$  es el calor ganado por el músculo (que será negativo si la reacción es exotérmica), y  $w$  es el trabajo termodinámico externo ejercido sobre el músculo por el entorno. El signo del trabajo termodinámico externo ( $w$ ) también es negativo cuando es realizado por el músculo. En condiciones isométricas no se realiza trabajo externo, por lo que el calor liberado se asimila al cambio entálpico.

El establecimiento del nexo entre los procesos bioquímicos y biofísicos (por ej. liberación de calor) requiere de la medición exacta de: a- las entalpías molares de todas las reacciones identificadas "in vivo" ( $\Delta H$ ), b- de la extensión de los cambios químicos que ocurren en el músculo en contracción ( $n$ ), y c- de la evolución del calor liberado ( $Q$ ) y del trabajo producido ( $w$ ) bajo condiciones similares a las de la medición de los cambios bioquímicos. En el músculo cardíaco se ha encontrado compatibilidad entre los resultados provenientes de mediciones miotérmicas, de consumo de  $O_2$  y bioquímicas (Gibbs y Chapman, 1979a).

### 3. Objetivos de la tesis

Esta tesis evalúa la interrelación entre los eventos celulares implicados en el desarrollo de una contracción miocárdica isovolumétrica de rata, a través de un análisis mecánico-energético con metodología miotérmica. En particular analiza la influencia del Ca extracelular en el patrón de respuesta miotérmica de la contracción.

La hipótesis general de trabajo es que del calor total liberado por una contracción miocárdica deben poder cuantificarse e identificarse las fracciones de calor liberadas por distintos eventos celulares.

En un latido se producen eventos de muy corta duración. En consecuencia, la fracción de calor asociada también debería ser de corta duración. De allí que el primer paso fue analizar la respuesta calorimétrica a pulsos de calor transitorios. Sobre esta base se analizó la existencia de varios componentes o fracciones en el calor total liberado por el músculo sin apartarse de la condición de desarrollo de fuerza (diferencia fundamental con las metodologías tradicionales que alteran al tejido de modo de afectar diferencialmente a uno o más eventos celulares). El siguiente objetivo fue establecer asociaciones entre los diversos componentes del calor total y determinados eventos celulares que ocurren en una contracción (por ej. actividad actomiosínica, unión y ciclaje de Ca, síntesis del ATP, etc.). Finalmente, se efectuaron diferentes intervenciones que modificaron la disponibilidad de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico y permitieron evaluar cambios mecánico-energéticos utilizados en la caracterización de los componentes de calor.

## Capítulo 2: Ca y ciclo contráctil cardíaco

En este capítulo se hará una descripción de las fuentes de Ca y los mecanismos que participan en la disponibilidad de Ca citosólico, en base a estudios de origen bioquímico, iónico-cinético, electrofisiológico o termodinámico. Se analizará la información sobre el grado de participación de cada uno de esos mecanismos en el ciclo reposo-contracción-relajación miocárdico.

### 1. Participación del Ca extracelular y el sarcolema

El músculo cardíaco cesa casi inmediatamente de responder a un estímulo cuando se priva de  $\text{Ca}^{12}$  al medio de perfusión. Esta característica lo diferencia del músculo esquelético que es capaz de contraerse aún en medios libres de  $\text{Ca}^{12}$  por espacio de horas a temperatura ambiente (Chiarandini y col., 1980).

La fuente de  $\text{Ca}^{12}$  responsable del mantenimiento de la contracción cardíaca continúa siendo un problema no resuelto. En efecto, la fuerza generada disminuye rápidamente por la reducción de la  $[\text{Ca}]_e$  (Shine y col., 1971; Philipson y Langer, 1979) o por la exposición del músculo a inhibidores del influjo de Ca desde este medio (Mn, verapamil, nifedipina, etc.) (Fleckenstein, 1983). Sin embargo, se ha encontrado que el  $\text{Ca}^{12}$  que ingresa a la célula desde el medio extracelular durante la contracción sería, al menos en algunas especies, insuficiente para la generación de fuerza. La mayor parte de los estudios electrofisiológicos que estiman la entrada de  $\text{Ca}^{12}$  por la denominada corriente lenta ( $I_{sl}$ ), han generado valores que sólo pueden explicar entre el 10 y 20 % del Ca requerido para una activación máxima (Solaro y col., 1974; Chapman, 1983). Del mismo modo, las estimaciones del influjo 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, 1983; Bers, 1983).

Una evidencia de la participación del Ca sarcolemal en la contracción es la correlación encontrada para varios cationes entre su capacidad para desplazar  $\text{Ca}^{12}$  del SL y para desacoplar la excitación de la contracción (Langer y Nudd, 1983). La secuencia resultó  $\text{La}^{13} \approx \text{Cd}^{12} > \text{Mn}^{12} > \text{Mg}^{12}$  y está relacionada a la similitud de sus respectivos radios cristalinos con el de  $\text{Ca}^{12}$  (0.99 Å). A partir de esto se ha sugerido que el  $\text{Ca}^{12}$  que ingresa se halla vinculado a sitios sarcolemales. Otros cationes que compiten con el  $\text{Ca}^{12}$  por su unión a sitios sarcolemales son el  $\text{K}^1$  y el  $\text{Na}^1$  (Morad y col., 1981; Philipson y col., 1980b). Esta evidencia de que el  $\text{Ca}^{12}$  ingresado a la célula no es el  $\text{Ca}^{12}$  libre de la solución extracelular es reafirmada por el hecho de que el desplazamiento del  $\text{Ca}^{12}$  de la capa difusa por dimetionio no afecta a la respuesta contráctil (Langer, 1990).

Otras evidencias de que el  $\text{Ca}^{12}$  que ingresa a la célula para activar la contracción proviene del enlazado a SL surgieron de intervenciones en las que se variaron los contenidos de fosfolípidos aniónicos, catiónicos o neutros en vesículas de SL (Philipson y col., 1980a). Los fosfolípidos aniónicos que unen  $\text{Ca}^{12}$  electrostáticamente (por ej. liberados por tratamiento con fosfolipasas C y D) aumentaron el influjo de  $\text{Ca}^{12}$ , la actividad del intercambiador Na/Ca y la fuerza contráctil. Lo contrario sucedió con los fosfolípidos catiónicos que repelen  $\text{Ca}^{12}$  (polimixina B). El laurilacetato neutro no afectó dichos parámetros (Philipson y col., 1980a; Philipson y Nishimoto, 1984; Philipson y col., 1985; Langer y Rich, 1985). Si bien estos resultados son indicadores de un enlace externo del  $\text{Ca}^{12}$  que participa directa o indirectamente en la contracción, los fosfolípidos aniónicos que enlazan  $\text{Ca}^{12}$  se han encontrado en mayor proporción en la cara interna del SL y tienen baja afinidad (1-3mM Ca) (Post y col., 1988). Ha sido sugerido que para que el  $\text{Ca}^{12}$  unido a ellos sea desplazado por  $\text{La}^{13}$  se requeriría la existencia de un microambiente intracelular (Langer, 1990). Más recientemente se ha mostrado que al menos el 30 % del  $\text{Ca}^{12}$  desplazable por  $\text{La}^{13}$  reside intracelularmente, en una concentración de 50 a 100  $\mu\text{M}$ , en la región diádica del RS (Post y Langer, 1992). Así, el SL funcionaría como un reservorio intracelular de

$\text{Ca}^{12}$  para la contracción, en rápido equilibrio con el medio extracelular.

Valiosa información sobre la participación del Ca extracelular en una contracción ha sido brindada por técnicas que permiten controlar y cambiar rápidamente el ambiente extracelular de células simples y medir simultáneamente la respuesta contráctil. Esta metodología ha permitido eliminar y reponer el  $\text{Ca}^{12}$  del líquido de perfusión de cardiomiocitos de rata y de conejo con un tiempo de recambio del medio de 200 ms, de modo de registrar el cambio en el primer latido (Langer, 1990). Los primeros estudios mostraron que el reagregado de  $\text{Ca}^{12}$  después de 10 min de estar en un medio libre de  $\text{Ca}^{12}$  desarrolla una primera contracción cuya magnitud es del 50% de la control en el ventrículo de conejo y del 8% de la control en el de rata. La fuerza aumenta en los siguientes latidos en ambas especies con tiempos medios de 43 y 75 s, respectivamente. Estos resultados permitieron describir dos compartimientos de Ca vinculados al desarrollo de fuerza: uno rápidamente intercambiable (que soporta el 50% de la contracción en conejo y el 8% en la rata), y uno más lentamente intercambiable que aporta el Ca restante para una contracción normal (Rich y col., 1988). El compartimiento lento pudo ser asimilado al RS y el compartimiento rápido ha sido asociado a  $\text{Ca}^{12}$  enlazado al SL (Rich y col., 1988). Estos resultados confirman la mayor participación del  $\text{Ca}^{12}$  del SL en la contracción del miocardio de conejo que en el de la rata.

El análisis de intercambio de  $^{45}\text{Ca}$  con técnicas de perfusión ultra-rápida de células ventriculares ha demostrado la existencia de un compartimiento de Ca vinculado al SL en el miocardio de rata adulta o neonata (Langer y col., 1990). Se describieron cuatro compartimientos intracelulares de Ca intercambiables con el medio extracelular, de los que el sarcolemal representa alrededor del 40% del Ca total. Los tiempos medios y la capacidad de los mismos varían según se trate de células adultas o neonatas, aisladas o cultivadas (Langer y col., 1987; Kuwata y Langer, 1989; Langer y col., 1990). En células ventriculares aisladas de rata las características de los compartimientos son: un componente de

intercambio rápido ( $t_{1/2} < 1$  seg, 2.6 a 3 mmoles.kg<sup>-1</sup> seco de células), dos intermedios ( $t_{1/2} = 3.5$  y 19 s, 2.1 mmoles.kg<sup>-1</sup> seco de células), uno de intercambio lento ( $t_{1/2} = 3.6$  min, 1.6 mmoles.kg<sup>-1</sup> seco de células) y uno no intercambiable en los tiempos de estudio (250  $\mu$ moles.kg<sup>-1</sup> seco de células) (Langer y col., 1990). El Ca<sup>12</sup> del componente rápido es desplazable por La<sup>13</sup>, por lo que se lo vinculó a sitios sarcolemales o en rápido equilibrio con el SL (Post y Langer, 1992). En este compartimiento se encontró una fracción correspondiente al intercambio Na/Ca con  $t_{1/2} = 0.53$  s y capacidad de 350  $\mu$ mol/kg seco de células (Langer y Rich, 1992). En células de rata neonata, el compartimiento dependiente del intercambio Na/Ca ha sido localizado en la región subsarcolemal de la díada (Post y Langer, 1992; Post y col., 1993). Los componentes intermedios resultaron desplazables por cafeína y sensibles a rianodina por lo que se vincularían al RS (Langer y col., 1990). El componente intercambiable más lento no estaría involucrado en la contracción, y ha sido vinculado a la mitocondria por incrementarse específicamente por adición de fosfatos (Langer y col., 1990).

Estudios con electrodos extracelulares para Ca (Bers, 1983) o colorantes sensibles al Ca (Hilgeman y Langer, 1984) han proporcionado información acerca de cuánto del Ca<sup>12</sup> unido a sarcolema se pone en juego en el proceso de excitación-contracción. Se encontraron disminuciones del Ca extracelular equivalentes a influjos de 11-20 nmol Ca.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo por latido en el conejo, que son inferiores a los niveles estimados para una contracción óptima. Se ha estimado que los niveles de Ca para una contracción óptima son equivalentes a los que desarrollan una contracción semimáxima en fibra pelada (fibra a la que se le ha eliminado el SL), oscilando entre 40 y 50 nmoles Ca.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo por latido en ventrículo de mamífero (Solaro y col., 1974; Fabiato, 1983). Se deduce entonces que el Ca extracelular en rápido equilibrio con el sarcolemal aportaría un influjo insuficiente durante la contracción, aunque el llenado de los diversos compartimientos dependa del medio extracelular.

En resumen, el Ca está altamente compartimentalizado en la célula miocárdica y en intercambio

con el medio extracelular. Cada uno de esos compartimientos participa en diferente grado en la regulación del  $\text{Ca}^{12}$  citosólico según las distintas especies animales o las diversas condiciones fisiopatológicas.

## 2. Mecanismos de movimiento transarcolema de Ca

Necesariamente, la dependencia del proceso contráctil respecto de la presencia de  $\text{Ca}^{12}$  en el medio extracelular implica la existencia de mecanismos que se hallen involucrados en los movimientos de  $\text{Ca}^{12}$  transarcolemales. Hasta la actualidad se han descrito tres mecanismos: a. los canales de calcio, b. el intercambiador Na/Ca asociado al sarcolema y c. la bomba de calcio del sarcolema.

### a. Canales de calcio

El corazón exhibe una heterogénea actividad electrofisiológica con diferencias en la configuración de los PA en diversas regiones anatómicas, especialmente entre aquéllas pertenecientes al sistema de conducción y al miocardio contráctil. Sin embargo, en todas ellas los PA pueden ser explicados por la existencia de corrientes iónicas. Estas fluyen a través de canales sarcolemales que proveen caminos energéticamente favorables para que ciertos iones se muevan según su gradiente electroquímico. Las diferentes propiedades moleculares del canal son las que le confieren sus características de selectividad y cinética. En el corazón, el influjo de  $\text{Ca}^{12}$  a través de canales es esencial, tanto para la actividad eléctrica normal como para el acoplamiento excitación-contracción (Coraboeuf, 1978).

Los primeros estudios acerca de la corriente de  $\text{Ca}^{12}$  se realizaron mediante técnicas de "voltage-clamp" para preparaciones multicelulares. Reuter demostró la existencia de una corriente lenta hacia el interior y dependiente de Ca ( $I_{\text{Si}}$ ) en músculo cardíaco (Reuter, 1967). A partir de éste y otros estudios se demostró que la  $I_{\text{Si}}$  podía ser registrada en ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular, es tetrodotoxina-insensible,

dependiente de la  $[Ca]_e$ , y activable por despolarizaciones en niveles de potencial de membrana ( $E_m$ ) en que la corriente de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) está completamente inactivada (-50 a -60 mV). La  $I_{Si}$  puede ser bloqueada por cationes como  $La^{+3}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Ni^{+2}$  y compuestos orgánicos como verapamil y D-600, y es modulada por catecolaminas y acetilcolina (Reuter, 1983). Respecto de la selectividad, la  $I_{Si}$  exhibió una relación corriente-voltaje (I-V) en forma de campana, con potencial umbral entre -50 y -40 mV y potencial pico entre -10 y +10 mV (Campbell y Giles, 1990). El canal también es permeable a iones monovalentes habiéndose estimado, a través de relaciones de permeabilidad, que un 38% de la  $I_{Si}$  correspondería a  $Na^+$ , un 35% a  $K^+$  y el resto a  $Ca^{+2}$  (Campbell y Giles, 1990). Las cinéticas de activación e inactivación del canal son el resultado de los cambios en el  $E_m$  que se producen durante el PA. Se ha sugerido que un cambio en el  $E_m$  causaría la reorientación de un sensor con propiedades de dipolo (parte del canal) y en consecuencia desencadenaría un cambio en el flujo de iones a través del canal (Reuter, 1983).

Posteriormente, mediciones "voltage-clamp" en miocitos cardíacos simples demostraron que la  $I_{Si}$  es mucho más sensible al  $Ca^{+2}$ , más grande en amplitud, y más rápida en sus cinéticas de apertura e inactivación que lo originariamente descrito. Actualmente se la denomina  $I_{Ca}$ , su umbral de activación es de -60 a -50 mV, se activa en menos de 10 ms y se inactiva completamente en 100-150 ms (Isenberg y Klockner, 1982). El flujo de iones monovalentes a través del canal sólo resultó significativo en ausencia de Ca y EGTA, calculándose que el 96% de la  $I_{Ca}$  en un miocito auricular es transportado por  $Ca^{+2}$  (Campbell y Giles, 1990). La inactivación del canal se produce por lo menos por dos mecanismos: la inactivación dependiente del voltaje de la membrana y un proceso de inactivación por  $Ca^{+2}$  proporcional al flujo de  $Ca^{+2}$  a través del canal (Campbell y Giles, 1990). La inactivación dependiente de  $Ca^{+2}$  ha sido estudiada en miocitos (Kokubun e Irisawa, 1984) y resultó mucho más rápida en la rata que en el conejo (Wang y col., 1993).



Evidencias experimentales recientes, utilizando técnicas de "patch-clamp" para células enteras, sugieren que la  $I_{Ca}$  sería acarreada por este ión a través de dos tipos de canales voltaje-dependientes: los llamados canales de Ca de tipo L y los canales de Ca de tipo T (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y col., 1988). Estos dos tipos de canales poseen características diferenciales que han permitido su separación y parcial caracterización. Las corrientes de tipo T sólo pueden observarse a  $E_m$  de hasta -50 a -60 mV, mientras las de tipo L se desarrollan entre -20 y -40 mV. Ambas se diferencian en sus cinéticas de inactivación, en sus conductancias (mayor en el L), en su estructura de poro (las corrientes varían con la especie catiónica en el L pero no en el T). Ambos tipos de canal difieren también en sus propiedades farmacológicas: el tipo L es modulado por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y es sensible a antagonistas (nifedipina, verapamil) y agonistas (BAY K 8644) cálcicos (Mc Donald y col., 1980; Tytgart y col., 1988; Hosey y Lazdunski, 1988; Campbell y Giles, 1990; Hadley y Lederer, 1992). El tipo T es insensible a dichos agentes. Mientras el L es más sensible al bloqueo por Cd, el T lo es por Ni. En cuanto a su distribución, mientras todas las células miocárdicas tienen canales de Ca tipo L, solamente células específicas de algunas especies parecen tener canales T. Aún en las células en las que existe esta corriente, su magnitud máxima no es mayor que el 5-10% de la corriente L, excepto en fibras de Purkinje en que ambas son iguales. Aunque pareciera que las corrientes tipo T no tienen un papel fundamental en la generación del PA o en el acoplamiento excitación-contracción, se activarían en el final de la despolarización diastólica espontánea de marcapasos (Mitra y Morad, 1986; Hosey y Lazdunski, 1988; Campbell y Giles, 1990).

Ha sido propuesto un modelo para explicar las características de selectividad del canal (Hess y Tsien, 1984) sobre la base de la dependencia a la presencia de  $Ca^{12}$ . El modelo postula que el canal tendría 2 sitios de unión de alta afinidad catiónica con diferentes  $K_{0.5}$ . En condiciones fisiológicas, la ocupación por solamente un  $Ca^{12}$  extracelular conduce al bloqueo. Si el canal es ocupado por dos  $Ca^{12}$ ,

se estarían repeliendo electrostáticamente entre sí de modo de reducir la afinidad del sitio opuesto. De esa manera, el pre-requisito para la conducción es la ocupación de los dos sitios. Es así como mediante un análisis de simulación se ha predicho que la hiperpolarización progresiva aumenta la probabilidad de encontrar canales en condiciones de conducción, es decir ocupados sólo en el interior. Potenciales parcialmente despolarizados aumentarían la probabilidad de tener canales bloqueados por la unión de  $\text{Ca}^{12}$  sólo en el sitio externo. El aumento en la  $[\text{Ca}]_e$  conduciría al aumento de la conducción por mayor probabilidad de ocupación doble del canal (Campbell y Giles, 1990).

En resumen, la corriente de Ca resultó ser más sensible al  $\text{Ca}^{12}$  y más grande en su amplitud y velocidad de activación que lo que inicialmente se creía. De los dos posibles tipos de canales, sólo el L parece encontrarse en el miocardio contráctil, siendo sensible al  $\text{Cd}^{12}$  y a los bloqueantes orgánicos. Su activación depende del voltaje y de la  $[\text{Ca}]_e$ , y su inactivación depende principalmente del voltaje, del tiempo y de la  $[\text{Ca}]_i$ . Recientes mediciones de la  $I_{Ca}$  en células aisladas de rata indican que esta aporta influjos del 5 % del Ca necesario para alcanzar el 70 % de la fuerza máxima (Wang y col., 1994).

#### b. Intercambiador Na/Ca

Las primeras observaciones sobre un intercambio entre  $\text{Na}^1$  y  $\text{Ca}^{12}$  con el medio extracelular en corazón fueron realizadas en batracio (Luttgau y Niedgerke, 1958) encontrándose que la tensión desarrollada era función de la relación  $[\text{Ca}]_e/[\text{Na}]_e^2$ . La misma correlación fue hallada en corazón de mamífero, excepto a bajas  $[\text{Na}]_e$  (Reuter y Seitz, 1968). Evidencias posteriores indicaron que la estequiometría más probable del intercambiador es  $3 \text{ Na}^1 : 1 \text{ Ca}^{21}$  (Blaustein y Russell, 1975) y se explicó la relación 2:1 por competencia a nivel de los sitios sarcolemales. De acuerdo a la estequiometría 3:1, el intercambiador Na/Ca exhibe la capacidad para generar un  $E_m$  o ser conducido por él. Esto ha

sido confirmado más recientemente en vesículas sarcolemales cardíacas (Bers y col., 1980; Philipson, 1985).

La dirección del movimiento neto de  $\text{Ca}^{12}$  debida al intercambiador Na/Ca sarcolemal está determinada por el gradiente electroquímico para ambos iones y por el  $E_m$ . Dependiendo de ambos, el sistema puede, en principio, participar tanto en la entrada como en la remoción de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico. Así, para la reacción de intercambio se puede plantear:



Donde: n=relación de acoplamiento para el intercambio  
i y e= compartimientos intra y extracelular respectivamente

El sistema de intercambio Na/Ca producirá la salida de  $\text{Ca}^{12}$  desde el citosol acoplada con el influjo de  $\text{Na}^1$  siempre que se cumpla:

$$\frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{(\text{Na}^1)_i^n \cdot (\text{Ca}^{12})_e}{(\text{Na}^1)_e^n \cdot (\text{Ca}^{12})_i} + E_m \cdot (n-2) < 0 \quad (2)$$

Donde:

R= constante universal de los gases

T= temperatura absoluta

F= constante de Faraday

$E_m$ = potencial de membrana

$(\text{Na}^1)_i$  y  $(\text{Na}^1)_e$ = actividades intra y extracelulares de sodio respectivamente

$(\text{Ca}^{12})_i$  y  $(\text{Ca}^{12})_e$ = actividades intra y extracelulares de calcio respectivamente

n=relación de acoplamiento para el intercambio

Diferentes protocolos experimentales han sido utilizados para determinar la estequiometría del intercambiador Na/Ca. La medición de flujos netos o de trazadores es uno de ellos. La estequiometría  $3 \text{Na}^1 : 1 \text{Ca}^{12}$  surgió por medición del eflujo de  $^{45}\text{Ca}$  dependiente de la  $[\text{Na}]_e$  y del influjo de  $^{22}\text{Na}$  dependiente de la  $[\text{Ca}]_i$  en vesículas sarcolemales cardíacas (Pitts, 1979) y en células cultivadas cardíacas (Wakabayashi y Goshima, 1981). Otras líneas han estudiado las corrientes eléctricas que se generan junto al desarrollo de fuerza cuando se disminuye la  $[\text{Na}]_e$  y se aplica un pulso de voltaje fijo despolarizante

en miocardio de mamífero (Eisner y Lederer, 1985). La repolarización provoca una corriente hacia el interior coincidente con la relajación, posible manifestación del intercambiador Na/Ca en modo de influjo de 3 Na<sup>+</sup>/eflujo de Ca<sup>2+</sup> (Eisner y Lederer, 1985). En células auriculares de batracio fue encontrado que ambas corrientes (provocadas por pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes) interceptaban al eje de voltaje en el mismo E<sub>m</sub> por lo que se sugirió un mecanismo común de generación (Hume y Uchida, 1986). En miocitos ventriculares de cobayo internamente dializados se identificó la corriente asociada al intercambiador Na/Ca bloqueando otras corrientes conocidas (Kimura y col., 1987). En estas condiciones, y a [Na]<sub>e</sub> y [Ca]<sub>i</sub> fisiológicas el potencial de reversión de esta corriente (E<sub>Na/Ca</sub>) arrojó un n=3 según la relación:  $(n-2) E_{Na/Ca} = n E_{Na} - 2 E_{Ca}$ , donde E<sub>Na</sub> y E<sub>Ca</sub> representan los potenciales de equilibrio de Nerst para Na y Ca (Kimura y col., 1987). Los cambios en la [Ca]<sub>i</sub> resultaron correlacionarse con la corriente identificada (Barcenás Ruiz y col., 1987).

En el músculo ventricular de rata en reposo, en el que E<sub>m</sub> es alrededor de -80 mV, las [Na]<sub>e</sub> y [Ca]<sub>e</sub> fisiológicas son de 140 y 1.5 mM respectivamente y las (Na)<sub>i</sub> y (Ca)<sub>i</sub> medidas tienen valores de 5 a 12.7 mM y <0.1 a 0.3 μM respectivamente (Bers y Ellis, 1982; Chapman, 1986; Barcenás Ruiz y col., 1987; Shattock y Bers, 1989). Es posible calcular la dirección en la que el intercambio procede asumiendo la estequiometría 3 Na<sup>+</sup>:1 Ca<sup>2+</sup>. Tomando valores promedio para las [Na]<sub>i</sub> y [Ca]<sub>i</sub> de 8 mM y 0.1 μM respectivamente, a 37 °C, el valor del potencial de reversión o equilibrio del intercambiador (primer sumando de la ecuación 2) es de -2 mV. Como el E<sub>m</sub> medido (≈ -80 mV) es más negativo que el E<sub>Na/Ca</sub> calculado, el intercambiador operará en la dirección de ingresar cargas positivas. Por lo tanto, en condiciones de reposo, el sistema de intercambio Na/Ca extruirá Ca<sup>2+</sup> desde el citosol utilizando el gradiente electroquímico transmembrana de Na<sup>+</sup>. A pesar de esta generalización, se han encontrado diferencias interespecie en la participación relativa de ambos sentidos de funcionamiento del intercambiador. Las mismas se derivan de variaciones en la determinación de la (Na)<sub>i</sub>. En la rata, la

determinación de una  $(Na)_i$  de 12.7 mM ha proporcionado una estimación de  $E_{Na/Ca}$  similar o más negativa que el  $E_m$ , por lo que se podría favorecer el ingreso de  $Ca^{12}$  durante el reposo (Shattock y Bers, 1989). En conejo, una  $(Na)_i$  de 7.2 mM favorecería el eflujo de  $Ca^{12}$  durante el reposo, resultado hallado con microelectrodos selectivos al Ca extracelular (Shattock y Bers, 1989).

Durante el proceso contráctil, la generación de un PA hace que el  $E_m$  cambie abruptamente desde su valor de reposo hasta alrededor de +10 mV en un tiempo de 2 ms o menos. A este cambio está asociada la entrada de  $Na^+$  a través de los canales rápidos. Tal cambio en el  $E_m$  alcanzaría para revertir la relación dada por la ecuación (2), de tal forma que el intercambiador actuaría favoreciendo el influjo de  $Ca^{12}$  desde el espacio extracelular. Cuando la  $[Ca]_i$  se eleva posteriormente hasta 1-2  $\mu M$ , la relación expresada en la ecuación (2) nuevamente se revierte y el sistema de intercambio Na/Ca funcionaría retirando  $Ca^{12}$  del citosol. Esto puede suceder aún durante la fase meseta del PA (Philipson y Ward, 1986) y, evidentemente, durante la repolarización en que se suma un gradiente eléctrico favorable. También aparecen diferencias entre rata y conejo durante el PA. Así, se ha indicado que mientras en el conejo se produciría un modesto influjo de  $Ca^{12}$  durante toda la fase de meseta del PA, en la rata predominaría el eflujo de  $Ca^{12}$  a continuación de la espiga de despolarización (Shattock y Bers, 1989).

El intercambiador Na/Ca es un sistema de transporte de baja afinidad. Se han descrito valores de  $K_{0.5}$  de 15-40  $\mu M$  Ca en vesículas sarcolemas (Philipson, 1985). Sin embargo, la distribución de fosfolípidos aniónicos "in vivo" le imponen asimetría a las afinidades del intercambiador. Mediciones de "patch-clamp" en célula entera arrojaron  $K_{0.5}$  de 0.35 a 1.38 mM para Ca extracelular (Wakabayashi y Goshima, 1981; Kimura y col., 1987) y  $K_{0.5}$  de 0.6 a 1  $\mu M$  para Ca intracelular (Kimura y Miura, 1988). En cuanto a su afinidad por el Na, se describieron  $K_{0.5}$  de 20-80 mM con simetría en vesículas y células (Philipson, 1985; Kimura y col., 1987). El  $Na^+$  y el  $Ca^{12}$  interactúan competitivamente por sitios de unión sobre ambas superficies del intercambiador (Philipson y Nishimoto, 1982) con

estequiometría  $2 \text{ Na}^+/\text{Ca}^{12}$ . Debido a esto, los cambios en la actividad del intercambiador con la  $[\text{Na}]_e$  sin cambios en la relación de unión a los sitios sarcolemales se evalúan manteniendo la relación  $[\text{Na}]_e^2/[\text{Ca}]_e$  constante (Ponce-Hornos y col., 1987). Fisiológicamente, este sistema sería regulado por otros ligandos distintos del Na y Ca intracelular tales como Mg, Mg-ATP, Pi y K. El intercambiador Na/Ca podría operar en regímenes de alta o baja velocidad dependiendo de las concentraciones intracelulares de estos ligandos (DiPolo y Beaugé, 1984). Los fosfolípidos aniónicos aumentan su actividad por incrementar su afinidad por el  $\text{Ca}^{12}$  (Philipson y Nishimoto, 1984).

¿Cuánto participa el intercambiador Na/Ca durante una contracción? Este sistema es capaz de transportar un alto flujo de  $\text{Ca}^{12}$ , pues las estimaciones proporcionan  $V_{\max}$  comprendidos entre 40 a 75  $\text{nmol Ca.g}^{-1} \text{ tejido húmedo.s}^{-1}$  (Carafoli, 1985) y 100 a 200  $\text{nmol Ca.g}^{-1} \text{ tejido húmedo.s}^{-1}$  (Philipson, 1985; Philipson, 1990). Su participación en la relajación muscular está condicionado por el gradiente electroquímico favorable. Recientemente, Langer y Rich han caracterizado en células miocárdicas de rata a un compartimiento de Ca asociado al intercambiador Na/Ca y ubicado en la región de la dífida, en el que se midieron eflujos de 75  $\text{nmoles Ca.g}^{-1} \text{ tejido húmedo.s}^{-1}$  en condiciones estacionarias a 1 mM de Ca extracelular (Langer y Rich, 1992). Por otra parte, su participación como sistema que media la entrada de Ca desde el espacio extracelular no ha sido definitivamente establecida en condiciones fisiológicas (Carafoli, 1985; Philipson y Ward, 1986). Sería energéticamente posible, como se mencionó para el miocardio de rata en reposo (Shattock y Bers, 1989) y existen evidencias de que participa en el influjo de  $\text{Ca}^{12}$  en condiciones de sobrecarga de  $\text{Na}^+$  intracelular (Ponce-Hornos y Langer, 1980; Bers y Ellis, 1982; Bers y col., 1988). Las predicciones de su grado de participación en el flujo de  $\text{Ca}^{12}$  ingresado durante un latido son muy variables, dependiendo de las actividades iónicas y del  $E_m$  considerados. Su participación durante el reposo diastólico se ha calculado energéticamente. Se ha estimado que la energía vinculada a la actividad del intercambiador Na/Ca podría representar un 4 a 8

% de aquella vinculada con el mantenimiento del reposo en el miocardio de la rata (Ponce-Hornos, 1990).

### c. Bomba de Ca sarcolemal

Este mecanismo de extrusión de Ca fue descubierto en eritrocitos y durante mucho tiempo se creyó que no existía en corazón. En 1980, Caroni y Carafoli describieron un sistema de eflujo de Ca ATP-dependiente en corazón de perro cuando vesículas sarcolemales invertidas fueron cargadas con  $\text{Ca}^{12}$  por el agregado de ATP al medio y descargadas por aumento de la  $[\text{Na}]$  extravesicular. Esto indicó que ambos sistemas, bomba e intercambiador Na/Ca, estaban presentes en la misma membrana (Caroni y Carafoli, 1980). La bomba de Ca fue posteriormente aislada, purificada, reconstruida dentro de liposomas y caracterizada (Caroni y Carafoli, 1980). Debido a sus altas afinidades por Ca ( $K_{0.5} < 1 \mu\text{M}$ ), la bomba de Ca del sarcolema y la del RS puede cumplir la función de regular la  $[\text{Ca}]_i$  en los bajos niveles del reposo mecánico (Carafoli, 1985).

La bomba de Ca sarcolemal está estimulada por calmodulina, que aumenta la afinidad por Ca y la velocidad máxima de la enzima (Carafoli, 1990). Se activa por fosforilación dependiente de AMPc (Carafoli, 1990) al igual que los canales de Ca y la bomba de Ca de RS. El flujo máximo de  $\text{Ca}^{12}$  movilizado por la bomba de Ca en vesículas de SL aisladas de corazón de mamífero, óptimamente fosforiladas por quinasas endógenas, resultó 1/30 o 1/100 del movilizado por el intercambiador Na/Ca (Caroni y Carafoli, 1980). Se ha estimado que remueve hasta alrededor de  $3.7 \text{ nmoles Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo  $\cdot \text{s}^{-1}$  (Carafoli, 1985). Su  $K_{0.5}$  para Ca es  $0.3 \mu\text{M}$  (Caroni y Carafoli, 1980). Por lo tanto, durante el reposo mecánico la bomba de Ca estaría trabajando cercana a la mitad de su velocidad máxima. Durante la contracción cardíaca, en que la  $[\text{Ca}]_i$  se eleva sustancialmente, las bombas, ya sean de sarcolema o de RS, se hallan trabajando a su velocidad máxima. A ellas se suma un sistema de mayor

capacidad como es el de intercambio Na/Ca, activado por el gradiente electroquímico favorable para la remoción de  $\text{Ca}^{12}$  (Carafoli, 1985).

Bioquímicamente, la Ca-ATPasa sarcolemal es una proteína de 138 kDa que muestra una estequiometría de bombeo de 1 Ca/ATP hidrolizado (Carafoli, 1990). Calmodulina y vanadato inducen cambios conformacionales en la proteína. Se ha propuesto un esquema de estructura de la enzima en la que el dominio de unión a calmodulina actuaría como un inhibidor interno. En presencia de calmodulina, el dominio de unión se asociaría a ella y dejaría libre el extremo N-terminal de la enzima para la asociación con  $\text{Ca}^{12}$  (Carafoli, 1990).

En resumen, la óptima eficiencia de la bomba de Ca sarcolemal durante ambos períodos, diástole y sístole, sumada a los varios mecanismos reguladores de su actividad encontrados "in vitro", indican su importancia como uno de los finos moduladores de la  $[\text{Ca}^{12}]$  citosólica. La proporción en que participa, respecto de otros mecanismos de extrusión de Ca puede ser estimada energéticamente. A partir de su flujo máximo y de su estequiometría se ha estimado una liberación de calor asociada que representa sólo el 3 % del calor independiente de tensión de la condición tetánica (Ponce-Hornos, 1990). Su máxima capacidad de remoción de  $\text{Ca}^{12}$  es alrededor de 8 veces menor que la del intercambiador Na/Ca.

### 3. Participación del retículo sarcoplásmico

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 de la superficie de la membrana (Feher y Fabiato, 1990). El músculo cardíaco de anfibio, por otra parte, posee un RS poco desarrollado comparado con los músculos cardíacos de mamífero (Page y Niedergerke, 1972).

Las funciones principales del RS son liberar el  $\text{Ca}^{12}$  almacenado para activar la contracción, y



reacumularlo para permitir la relajación. Los resultados obtenidos sobre la capacidad del RS de músculo cardíaco de mamífero para remover el  $\text{Ca}^{12}$  del citoplasma muestran un amplio margen de variación. Las estimaciones de la capacidad total del RS oscilan entre 5 y 90 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína de RS (Chapman, 1983). Se han descrito diversos rendimientos de RS cuyo promedio es de 3.9 mg proteína de RS  $\cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo (Blayney, 1983; Feher y Fabiato, 1990; Solaro y Briggs, 1974). Con este rendimiento promedio, la capacidad del RS oscilaría entre 20 y 350 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo. Estimaciones de flujos máximos indican que el RS captaría flujos de 20 a 33 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína de RS  $\cdot \text{s}^{-1}$  durante los primeros 200 ms, seguidos por una segunda fase de flujo disminuído (Carafoli, 1985; Feher y Fabiato, 1990). Entonces, durante los primeros 200 a 400 ms de la relajación el RS podría recaptar alrededor de 15 a 52 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  tejido húmedo. Es decir, que el RS podría remover la cantidad de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico puesta en juego en una contracción y estimada en 40 a 50 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{g}^{-1}$  (Solaro y col., 1974; Fabiato, 1983).

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 (Carafoli, 1985). La enzima posee alta afinidad ( $K_{0.5} = 0.3 \mu\text{M}$ ) por lo que está capacitada para actuar tanto durante el ciclo contracción-relajación como durante el reposo mecánico (Carafoli, 1985). La Ca-ATPasa del RS regula su velocidad de hidrólisis de ATP dependiendo de la [Mg-ATP], [ADP], [ $\text{Ca}^{12}$ ]i y [Pi]. Está regulada, además, por la fosforilación de la proteína fosfolamban que es un pentámero integral en la membrana del RS (Tada e Inui, 1983; Sham y col., 1991). Esta proteína puede ser fosforilada aditivamente por quinasas AMPc-dependiente (Wegener y Jones, 1984), Ca-calmodulina-dependiente (Kranias, 1985; LePeuch y col., 1979) y por proteína quinasa-C (Movsesian y col., 1984). El efecto de estas fosforilaciones es un aumento de la afinidad al Ca de la Ca-ATPasa sin afectar su velocidad máxima (Kranias, 1985; Feher y Fabiato, 1990).

Conjuntamente con su capacidad de captar  $\text{Ca}^{12}$ , el RS está capacitado para liberarlo hacia el citosol. Para la liberación de Ca por parte del RS se han propuesto las hipótesis de inducción por  $\text{Ca}^{12}$  (Fabiato, 1983), despolarización a nivel de la cisterna terminal del RS (muy probable en músculo esquelético pero improbable en músculo cardíaco (Fabiato, 1986)), y la vía del Inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) (Mosvesian y col., 1985). La liberación de  $\text{Ca}^{12}$  del RS inducida por  $\text{IP}_3$  provoca la liberación de una pequeña fracción del Ca intravesicular y en forma demasiado lenta como para jugar un papel fisiológico en el disparo de la contracción (Fabiato, 1986). La hipótesis de la liberación de Ca-inducida por despolarización fue desestimada por la ausencia de un potencial trans-retículo sarcoplásmico en músculo cardíaco (Somlyo y col., 1977). La hipótesis de liberación de  $\text{Ca}^{12}$  del RS inducida por una cantidad de  $\text{Ca}^{12}$  inferior al umbral necesario para la contracción está avalada por diversos experimentos en fibras miocárdicas peladas (Fabiato, 1983).

Los canales de Ca activables por  $\text{Ca}^{12}$  resultaron ser la vía de liberación de Ca del RS para la contracción (Rousseau y col., 1986). La estructura del canal de  $\text{Ca}^{12}$  del RS ha sido dilucidada a partir del estudio del receptor de rianodina, droga que cierra la vía de flujo de  $\text{Ca}^{12}$  del RS (Lai y Meissner, 1988). Este canal es un tetrámero con un solo sitio para unirse a rianodina idéntico a la estructura del pie entre el túbulo transverso y la cisterna terminal del RS de músculo esquelético visto por micrografía electrónica (Lai y Meissner, 1988). Análogo pero algo más pequeño resultó el canal de Ca del RS cardíaco aislado y reconstituido (Inui y col., 1987). La probabilidad de apertura del canal es aumentada por niveles submicromolares de  $\text{Ca}^{12}$ , mM de ATP y mM de cafeína (Rousseau y col., 1986). Bajas concentraciones de rianodina (10-15  $\mu\text{M}$ ) disminuyen la conductancia del canal (Lai y Meissner, 1988; Feher y Fabiato, 1990).

Es bastante aceptado que el  $\text{Ca}^{12}$  inductor de la liberación de  $\text{Ca}^{12}$  por el RS es el que ingresa a la célula por el canal de Ca sarcolemal (Morad y Cleemann, 1987). Parte del influjo de  $\text{Ca}^{12}$

transarcolemal serviría para cargar al RS con una cantidad de  $\text{Ca}^{12}$  que estaría disponible para liberarse en la siguiente contracción (Beeler y Reuter, 1970; Wier, 1980; Morad y Cleemann, 1987). Se ha sugerido que las dos fases, rápida y lenta, de la corriente de  $\text{Ca}^{12}$  transarcolemal podrían corresponderse con las fases rápida de liberación y lenta de carga del RS (Feher y Fabiato, 1990). Si bien la hipótesis más aceptada es la del  $\text{Ca}^{12}$  inductor proveniente de la corriente sarcolemal, se ha sugerido también la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{12}$  inductor ingrese a la célula vía intercambiador Na/Ca sarcolemal (Feher y Fabiato, 1990).

La participación del  $\text{Ca}^{12}$  del RS en el acoplamiento excitación-contracción en músculo cardíaco varía entre distintas especies (Morad y Cleemann, 1987; Wang y col., 1993). En células ventriculares de batracio, el  $\text{Ca}^{12}$  para la contracción parece provenir de y removerse hacia el medio extracelular exclusivamente (Morad y Cleemann, 1987). En corazón de mamífero, diversas evidencias (Beeler y Reuter, 1970; Wier, 1980; Chapman, 1983; Feher y Fabiato, 1990) han indicado que existiría liberación de  $\text{Ca}^{12}$  activador desde almacenes intracelulares. En fibras musculares cardíacas de mamífero peladas por medios mecánicos o químicos se encontró que la máxima liberación de  $\text{Ca}^{12}$  desde el RS (inducida por  $\text{Ca}^{12}$  o por cafeína) aumentó la fuerza contráctil hasta alrededor del 60% de la máxima fuerza alcanzada por el aumento de la  $[\text{Ca}]_i$  (Fabiato, 1981). Esto sugiere que el RS en estas preparaciones contiene o libera menos  $\text{Ca}^{12}$  que la cantidad requerida para saturar a los miofilamentos. Recientemente, utilizando un inhibidor específico de la Ca-ATPasa, la tapsigargina, se ha determinado que en una contracción de miocito ventricular de conejo se libera alrededor de la mitad del contenido normal del RS (Bassani y col., 1993). Asimismo, se describió una fracción de Ca del RS inaccesible a la liberación por una estimulación normal y liberable por cafeína (Bassani y col., 1993).

En resumen, hay evidencias de que en los mamíferos el RS provee  $\text{Ca}^{12}$  para la activación de la contracción del músculo cardíaco, aunque en proporciones variables según la especie. También participa

en la relajación del latido cardíaco a través de la remoción del  $\text{Ca}^{12}$  citosólico con alta afinidad, y mantiene baja la  $[\text{Ca}^{12}]$  citosólica durante el reposo. Esta remoción de Ca basal puede representar hasta un 20 % del promedio de la energía liberada durante el reposo en distintas especies (Ponce-Hornos, 1990).

#### 4. Participación de la mitocondria

Al descubrimiento de sistemas separados de influjo y eflujo de  $\text{Ca}^{12}$  en la membrana interna de la mitocondria siguió el reconocimiento de que la  $[\text{Ca}^{12}]$  mitocondrial ( $[\text{Ca}]_m$ ) está regulada por un ciclo conducido por la cadena respiratoria. Por lo tanto, el papel natural del transporte de  $\text{Ca}^{12}$  parece ser el de controlar la  $[\text{Ca}]_m$  para la regulación de las enzimas de síntesis de ATP (Balaban y Heineman, 1989). El  $\text{Ca}^{12}$  es considerado un segundo mensajero entre la actividad mecánica citosólica, y por ende los niveles de ATP, y los sistemas mitocondriales de síntesis y reposición del ATP consumido fuera de ella (Crompton, 1990). El balance de  $\text{Ca}^{12}$  entre la mitocondria y el citosol es el resultado de dos mecanismos opuestos. La vía electroforética o uniporter de  $\text{Ca}^{12}$  se utiliza exclusivamente para la captación del catión y el intercambio  $\text{Na}^1$ -dependiente remueve el  $\text{Ca}^{12}$  hacia el citosol (Carafoli, 1985; Crompton, 1990).

La fuerza impulsora para la captación de  $\text{Ca}^{12}$  por la mitocondria es la diferencia de potencial en la membrana interna mitocondrial (alrededor de 200 mV negativa internamente) establecida por el gradiente de protones de la respiración (Crompton, 1990). Si bien se ha estimado una  $V_{\text{max}}$  de 10 nmol  $\text{Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial  $\cdot \text{s}^{-1}$  para el uniporter, la velocidad de la captación electroforética puede fluctuar dependiendo de las  $[\text{Ca}^{12}]_i$  y  $[\text{Mg}^{12}]_i$  (Carafoli, 1985; Crompton, 1990). Una  $[\text{Mg}^{12}]_i$  de 5 mM inhibe la captación activa de  $\text{Ca}^{12}$  por las mitocondrias aisladas suspendidas con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{12}$  (Sordahl, 1974). Por lo tanto, la velocidad máxima de esta ruta estaría sensiblemente inhibida a las  $[\text{Mg}^{12}]_i$

fisiológicas (1-4 mM). La afinidad del uniporter por el  $\text{Ca}^{12}$  es baja ( $K_{0.5} = 15\text{-}30 \mu\text{M}$ ) y las estimaciones del contenido celular de mitocondrias oscilan entre 100 (Scarpa y Graziotti, 1973; Crompton, 1990) y 265 mg proteína mitocondrial. $\text{g}^{-1}$  de tejido húmedo (Carafoli, 1985). A partir de estos valores obtenidos en mitocondrias aisladas se han predicho flujos de captación de  $\text{Ca}$  mitocondrial "in situ" que oscilan entre 0.3 a 3 nmol  $\text{Ca}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo. $\text{s}^{-1}$  (Crompton, 1990) y 32 nmol  $\text{Ca}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo. $\text{s}^{-1}$  (Carafoli, 1985) para las  $[\text{Ca}]_i$  y  $[\text{Mg}]_i$  cercanas a las existentes durante la contracción (1  $\mu\text{M}$  y 1-4 mM, respectivamente). Los amplios rangos de flujos de captación de  $\text{Ca}^{12}$  mitocondrial son debidos a las diferencias entre las estimaciones de contenido de mitocondrias por g de tejido húmedo. A pesar de ello, las estimaciones de flujos de captación de  $\text{Ca}$  mitocondrial son inferiores a la estimación de la velocidad de remoción del  $\text{Ca}^{12}$  interviniente en la contracción (de alrededor de 40 a 50 nmol  $\text{Ca}.\text{g}^{-1}$  tejido húmedo. $\text{s}^{-1}$ ; Solaro y col., 1974; Fabiato, 1983). Esto haría poco importante la participación de la mitocondria en la relajación.

El eflujo del  $\text{Ca}^{12}$  mitocondrial es Na-dependiente por lo que se lo considera un intercambio Na/Ca (Crompton, 1990). Un intercambio  $\text{Ca}^{12}/2\text{H}^+$  ha sido observado, pudiendo ser el balance entre el influjo mitocondrial de  $\text{Na}^+$  en intercambio con  $\text{Ca}^{12}$  y el eflujo mitocondrial de  $\text{Na}^+$  en intercambio con  $\text{H}^+$ , puesto que este último es más activo que el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{12}$  (Crompton y Heid, 1978). El mecanismo de eflujo mitocondrial de  $\text{Ca}^{12}$  activado por  $\text{Na}^+$  exhibe un  $K_{0.5}$  de alrededor de 7 mM de  $\text{Na}^+$  (Crompton y col., 1976). Debido a ello, a las  $[\text{Na}^+]_i$  fisiológicas el eflujo mitocondrial de  $\text{Ca}^{12}$  en intercambio con  $\text{Na}^+$  estaría parcialmente activado por el  $\text{Na}^+$ . Las mitocondrias podrían, por lo tanto, influir en el destino del  $\text{Ca}^{12}$  celular y en la respuesta contráctil del músculo cardíaco cuando cambian las  $[\text{Na}]_i$ , como por ejemplo durante la inhibición de la bomba de Na-K (Ponce-Hornos y Langer, 1982; Ponce-Hornos y col., 1982b).

La estequiometría de este contratransporte es de 2  $\text{Na}^+$  : 1  $\text{Ca}^{12}$ , por lo que sería electroneutro

(Affolter y Carafoli, 1980). En mitocondrias aisladas, la actividad del intercambio Na/Ca mitocondrial puede inhibirse en forma no-competitiva por el aumento en la [Ca] extramitocondrial (Hayat y Crompton, 1987). Así, cambios en la [Ca]<sub>i</sub> desde 0 a 2  $\mu$ M, como los que ocurren en el ciclo contracción-relajación cardíaco, serían capaces de disminuir el eflujo de Ca<sup>12</sup> mitocondrial en intercambio con Na<sup>1</sup> durante el pico de la contracción (Crompton, 1990). Si bien la [K<sup>1</sup>] regula la actividad del contratransporte, ésta es máxima a las [K<sup>1</sup>]<sub>i</sub> fisiológicas (Crompton y col., 1980), por lo que niveles de K<sup>1</sup> superiores al fisiológico no incrementan la actividad del intercambiador.

Ambos transportadores de Ca<sup>12</sup>, uniporter e intercambiador, operan continuamente para mediar un ciclaje de Ca<sup>12</sup> mitocondrial en estado estacionario. Si la [Ca<sup>12</sup>]<sub>i</sub> se mantuviera constante, el ciclaje alcanzaría un verdadero estado estacionario con iguales velocidades de influjo y eflujo de Ca<sup>12</sup>. A partir de los parámetros cinéticos de ambos transportadores se ha predicho que, para un incremento estacionario de la [Ca]<sub>i</sub>, la [Ca]<sub>m</sub> aumenta hiperbólicamente en el tiempo hasta alcanzar un nuevo estado estacionario (Crompton, 1985). Este análisis predice que a las [Ca]<sub>i</sub> < 0.1  $\mu$ M del reposo mecánico se obtendrán [Ca]<sub>m</sub> estacionarias menores que los respectivos valores citosólicos. En cambio, a [Ca]<sub>i</sub> > 1  $\mu$ M la [Ca]<sub>m</sub> podría ser 10 veces superior a la [Ca]<sub>i</sub> (Crompton, 1985). Esta predicción ha sido confirmada en mitocondrias cardíacas aisladas expuestas a [Ca] constantes (Crompton, 1985). Dado que "in vivo" se producen cambios latido a latido en la [Ca<sup>21</sup>]<sub>i</sub>, se predicen estados cuasi-estacionarios alcanzándose una [Ca]<sub>m</sub> proporcional a la [Ca]<sub>i</sub> promedio entre las correspondientes a la sístole y a la diástole (Crompton, 1990; Leisey y col., 1992). La [Ca<sup>21</sup>]<sub>m</sub> libre tiene pequeñas oscilaciones (<0.4% de su valor promedio) debido a la baja actividad de los transportadores mitocondriales en relación con la rapidez de los picos transitorios de [Ca]<sub>i</sub> (Crompton, 1990).

La posible importancia de las mitocondrias como sistema secuestrador de Ca<sup>12</sup> a largo plazo en las células cardíacas puede estimarse por la cantidad de Ca<sup>12</sup> que pueden contener in vivo (Bygrave,

1978). Experimentos realizados en mitocondrias cardíacas aisladas demostraron que estas organelas podrían acumular entre 600 y 900 nmoles de  $\text{Ca}^{12}$ .mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial, en ausencia de  $\text{Na}^+$  y presencia de fosfato en el medio de incubación (Palmer y col., 1986). Utilizando el contenido de 100 mg de proteína mitocondrial.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo (Scarpa y Graziotti, 1973; Crompton, 1990), la capacidad de acumular  $\text{Ca}^{12}$  por las mitocondrias sería de 60 a 90  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Ca}^{12}$ .g<sup>-1</sup> de tejido húmedo. Sin embargo, estudios realizados tanto en tejido cardíaco como en otros tejidos utilizando microanálisis por difracción de rayos X han estimado un menor contenido de  $\text{Ca}^{12}$  de las mitocondrias, de 0.05 a 0.9  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Ca}^{12}$ .g<sup>-1</sup> de tejido húmedo (Wendt-Gallitelli y Jacob, 1982; Wheeler-Clark y Tormey, 1987). La fracción libre de esta cantidad total de  $\text{Ca}$  mitocondrial sería el 0.1%, es decir 0.05-0.9 nmoles de  $\text{Ca}^{12}$ .g<sup>-1</sup> de tejido húmedo (Coll y col., 1982, Hansford y Castro, 1982). Este valor resulta similar al predicho para los estados cuasi-estacionarios de la mitocondria "in vivo" (Crompton, 1990) y representa alrededor del 10% del  $\text{Ca}^{12}$  puesto en juego en una contracción. Por lo tanto, las mitocondrias en las células normales no almacenarían grandes cantidades de  $\text{Ca}^{12}$  rápidamente intercambiable ni contribuirían significativamente con  $\text{Ca}^{12}$  durante el evento contráctil. Sin embargo, se ha registrado un aumento de la  $[\text{Ca}]_m$  durante la estimulación estacionaria, seguido por una disminución durante el reposo (Wolska y Lewartowski, 1991). Esto sugiere que la mitocondria respondería a los cambios de la  $[\text{Ca}]$  citosólica.

Un aspecto adicional de la función mitocondrial es su capacidad para acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}$ , en un proceso relativamente lento, que se ha observado cuando causas patológicas alteran la permeabilidad del sarcolema (Crompton, 1990). Esta capacidad mitocondrial, que produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y disipación de energía protón-motriz, no puede atribuirse sólo a un aumento en el ciclaje de  $\text{Ca}^{12}$ . Ha sido propuesto que es algún efecto producido por el  $\text{Ca}^{12}$  y no su captación mitocondrial, el que desencadena el desacoplamiento. Algunos hallazgos están relacionados con la existencia de un sistema de captación simultánea de fosfato inorgánico (Lehninger, 1974; Ponce-

Hornos y Langer, 1982; Ponce-Hornos y col., 1982b); o con una inducción por  $\text{Ca}^{12}$  de la permeabilización de la membrana interna a solutos de peso molecular inferior a 1000 (Crompton, 1990). Estos factores podrían ser determinantes de daños tisulares como los producidos por isquemia prolongada.

En resumen, dos aspectos conciernen a la función del transporte de  $\text{Ca}^{12}$  mitocondrial: la regulación de su propio metabolismo y la actuación como fuente o depósito de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico. La  $[\text{Ca}^{12}]_m$  libre varía con el cambio de  $[\text{Ca}^{12}]_i$  dentro de un rango cercano a  $1 \mu\text{M}$ , compatible con la activación de las enzimas del metabolismo oxidativo. El ciclaje de Ca coordinaría continuamente el metabolismo oxidativo con la demanda celular de ATP. En condiciones fisiológicas, la baja velocidad de captación de Ca y la escasa variación latido a latido de la  $[\text{Ca}]_m$  harían muy poco probable su participación como donante del  $\text{Ca}^{12}$  activador del ciclo contracción-relajación. En condiciones en que la  $[\text{Ca}]_i$  en reposo se eleva anormalmente, el Ca libre mitocondrial puede aumentar bruscamente desacoplando la fosforilación con posibles permeabilizaciones de  $\text{Ca}^{12}$ ,  $\text{P}_i$ ,  $\text{H}^+$  o moléculas pequeñas.

##### 5. Unión de Ca a proteínas contráctiles

La función principal del  $\text{Ca}^{12}$  en el músculo es gatillar el evento contráctil. El músculo cardíaco es activado, al igual que el esquelético, por la unión de  $\text{Ca}^{12}$  a TnC. Esta subunidad proteica pertenece a un complejo formado, además, por las troponinas I y T (TnI y TnT) con una estequiometría 1:1:1 (Potter, 1974). En ausencia de Ca, TnI produce inhibición de la actividad ATPásica actomiosínica, mientras TnT fija el complejo troponina a la tropomiosina (Tm). En presencia de las tres subunidades, la unión de  $\text{Ca}^{12}$  a TnC desplaza a TnI y a Tm de sus asociaciones con el sitio activo de la actina, lo cual permite la interacción actomiosínica (Thompson y col., 1990).

En la molécula de TnC de músculo esquelético se han identificado cuatro dominios estructurales



homólogos que corresponden a cuatro sitios de unión para  $\text{Ca}^{12}$  (Collins y col., 1977; van Eerd y Takahashi, 1976). En TnC de músculo esquelético se han dividido los sitios en: aquéllos inespecíficos para  $\text{Ca}^{12}$  y  $\text{Mg}^{12}$ , que tienen alta afinidad y están saturados a  $[\text{Ca}^{12}]$  y  $[\text{Mg}^{12}]$  fisiológicas, y aquéllos específicos para  $\text{Ca}^{12}$  con menor afinidad (Leavis y col., 1978, Zot y Potter, 1982). Los sitios inespecíficos no participan en la unión de los cambios transitorios de  $\text{Ca}^{12}$  que inducen la contracción, pero contribuyen a estabilizar la estructura funcional (Zot y Potter, 1982). Los sitios específicos para  $\text{Ca}^{12}$  de la TnC son los responsables de la activación del músculo esquelético (Potter y Gergely, 1975; Potter y col., 1977). Por otra parte, estudios calorimétricos en músculo esquelético han establecido que la unión de  $\text{Ca}^{12}$  a los sitios específicos de TnC es exotérmica (Imaizumi y col., 1990; Thompson y col., 1990).

A diferencia del músculo esquelético, en el músculo cardíaco se describió la unión de sólo tres moles de  $\text{Ca}^{12}$  por mol de TnC (van Eerd y Takahashi, 1976). En TnC cardíaca, los tres sitios de unión de  $\text{Ca}^{12}$  se dividen en dos sitios inespecíficos y un único sitio específico para  $\text{Ca}^{12}$  de menor afinidad que los inespecíficos ( $2.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) (Thompson y col., 1990). Estudios calorimétricos en músculo cardíaco han estimado que la unión de  $\text{Ca}^{12}$  al sitio específico de TnC tiene un cambio entálpico similar al observado en músculo esquelético (Thompson y col., 1990).

Los factores que modifican la unión  $\text{Ca}^{12}$ -TnC afectan la magnitud de la contracción. Disminuciones del pH alteran la respuesta contráctil al  $\text{Ca}^{12}$ , aumentando la cantidad de  $\text{Ca}^{12}$  necesaria para obtener una dada tensión (Fabiato y Fabiato, 1978). Esto fue adjudicado a modificaciones en la unión de  $\text{Ca}^{12}$  a TnC ya que la actividad ATPásica permanece constante en relación a la cantidad de  $\text{Ca}^{12}$  unida (Blanchard y Solaro, 1984). Fue determinado que la disminución en la capacidad de unión se producía en los sitios específicos para el  $\text{Ca}^{12}$  pero no en los inespecíficos (Thompson y col., 1990). Por otra parte, la fosforilación de TnI cardíaca por quinasas AMPC-dependientes disminuye la afinidad del

sitio específico de TnC por  $\text{Ca}^{12}$  (Robertson y col., 1982), lo cual acelera la relajación por favorecer la disociación del  $\text{Ca}^{12}$ . Este efecto, sumado a la fosforilación de los canales de Ca que aumentan el influjo, y de las bombas de Ca, que aumentan su remoción, caracteriza a la acción de las catecolaminas.

En resumen, en los niveles de  $\text{Ca}^{12}$  liberado en una contracción miocárdica, el equilibrio termodinámico favorece la asociación de éste al único sitio específico sobre TnC. La afinidad de este sitio indica que el mismo se activaría semimáximamente con  $[\text{Ca}]_i$  de  $\approx 0.4 \mu\text{M}$ . Por lo tanto, puede responder a las oscilaciones de  $[\text{Ca}]_i$  que ocurren durante el ciclo cardíaco (entre  $<0.1 \mu\text{M}$  en el reposo y alrededor de  $2 \mu\text{M}$  en la contracción). Esta interacción induce desplazamientos conformacionales de TnI, tropomiosina y actina, que concluyen con la interacción actomiosínica e hidrólisis del ATP. Esto provee la energía para el desplazamiento de los miofilamentos y el acortamiento del sarcómero. Cambios fisiopatológicos, como la acidosis o la liberación de catecolaminas, modifican la  $[\text{Ca}^{12}]_i$  o las afinidades de los sitios de unión de TnC por  $\text{Ca}^{12}$  ejerciendo cambios en la capacidad contráctil cardíaca.

### Capítulo 3: Energética cardíaca

Las fuentes inmediatas de energía química para la actividad muscular son los compuestos con fosfatos de alta energía (ATP y Creatina-fosfato (CrP)). El músculo utiliza la energía liberada por hidrólisis de esos compuestos y mantiene sus niveles en estado estacionario mediante la oxidación de sustratos como hidratos de carbono, ácidos grasos y lactato. Debido a que el miocardio desarrolla una actividad contráctil ininterrumpida, no puede demorar en recuperar la energía química utilizada hasta la finalización de la contracción. Por lo tanto, en el corazón no se ha encontrado una clara distinción temporal entre el calor proveniente del consumo y el proveniente de la resíntesis de los compuestos de alta energía, contrariamente a lo que ocurre en músculo esquelético (Gibbs y Chapman, 1979a).

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; Roos y Brady, 1982); b) Mediciones químicas (consumo de moléculas con enlace fosfato de alta energía como ATP y CrP, consumo de glucosa, producción de ácido láctico, consumo de  $O_2$ ) (Rich y Brady, 1974; Ponce-Hornos y Langer, 1982; Dominguez-Mon y col., 1984; Siess, 1987); c) Mediciones biofísicas (seguimiento fluorométrico de cambios redox, cinética de intercambio iónico, métodos miotérmicos, resonancia magnética nuclear) (Chapman y col., 1976; Mulieri y col., 1977; Gibbs y Chapman, 1979a; Chapman y col., 1982; Ponce-Hornos y col., 1987; Kushmerick, 1990; Dietrich y Elzinga, 1992). Cualquiera sea el método utilizado es esencial que las conclusiones obtenidas a partir de las distintas metodologías sean compatibles entre sí.

### 1. Evolución del conocimiento de la energética cardíaca:

Los estudios sobre liberación de calor comenzaron en músculo esquelético aislado con Helmholtz en 1848 quien utilizó tres termocuplas en serie con un galvanómetro (Hill, 1965). En 1909, A.V. Hill comienza un estudio sistemático e integrado de la termodinámica de la contracción muscular esquelética. Este autor inicia sus investigaciones utilizando las termopilas (gran número de termocuplas en serie) diseñadas por Blinx a las que mejora progresivamente tanto en rapidez de respuesta como en sensibilidad. Esta metodología, con diferentes variantes continúa siendo aplicada en el estudio energético del músculo esquelético (Hill, 1965; Homsher y col., 1972; Rall, 1979; Alpert y Mulieri, 1982a,b). Dado que el músculo esquelético fue el primero en ser estudiado desde el punto de vista mecánico y energético, se constituyó más tarde en modelo de análisis de la energética cardíaca. Así, en el músculo cardíaco se buscó la distinción entre el metabolismo basal y el activo, pues lo propio había sido hecho en el músculo esquelético (Hill, 1965). También se intentó distinguir el calor liberado por la contracción muscular propiamente dicha del calor proveniente de la resíntesis de los compuestos con enlace de alta energía. Esta diferenciación se observó claramente en el músculo esquelético (Hill, 1965) pero no en el cardíaco.

El estudio de la energética cardíaca con metodologías miotérmicas se ha demorado respecto de la del músculo esquelético. La medición directa del calor liberado mediante el método de las termopilas enfrentó dificultades diversas como la incompatibilidad de la geometría del músculo cardíaco con la de la termopila, o la masa muscular. Recién en 1965 el método de las termopilas pudo ser aplicado a músculos papilares de animales pequeños. Estudios energéticos de otra índole se habían realizado ya en 1912, cuando Rhode mostró una dependencia del consumo de  $O_2$  respecto de la postcarga en corazones perfundidos de conejo y gato (Rhode, 1912). La medición del consumo de  $O_2$  registra los procesos de resíntesis aeróbica del ATP. El consumo de  $O_2$  es proporcional a la actividad cardíaca medida como

desarrollo de fuerza y mantenimiento de su homeostasis celular (Siess, 1987). Hoy es aceptado que la tensión parietal (fuerza de estiramiento tangencial que soporta la pared en cada punto de su superficie) es el mayor determinante del consumo de  $O_2$  (Burton, 1957). Otro tipo de mediciones energéticas efectuadas contemporáneamente a las miotérmicas fueron las metabólicas, como la evaluación de la hidrólisis de fosfatos de alta energía (Pool y Sonnenblick, 1967).

Las primeras medidas miotérmicas en músculo cardíaco con el método de las termopilas, inicialmente desarrollado por A.V. Hill, se realizaron en el músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo (Ricchiuti y Gibbs, 1965). Si bien con esas termopilas podían realizarse estudios miotérmicos en simultáneo con estudios mecánicos, el pequeño tamaño de la preparación que debía utilizarse impidió que se pudiesen realizar estudios iónico-cinéticos y/o metabólicos en forma simultánea. De hecho, estos estudios fueron realizados separadamente durante muchos años por diversos grupos de investigadores, lo cual hizo dificultosa la correlación entre resultados. Las termopilas desarrolladas por Ricchiuti y Gibbs (Gibbs y col., 1967) fueron mejoradas tanto en velocidad de respuesta como en sensibilidad por el grupo de Alpert (Mulieri y col., 1977). Las metodologías que intentaron el uso de preparaciones musculares más grandes para la realización de estudios metabólicos e iónico-cinéticos en simultáneo fueron de baja sensibilidad y lenta respuesta (McDonald, 1971; Coulson, 1976; Theisohn y col., 1977). Poco después 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 y col., 1982a). Este último método es el que ha sido aplicado en la siguiente tesis para el estudio mecánico-energético del músculo cardíaco (ver "Materiales y Métodos").

## 2. Constituyentes energéticos del músculo cardíaco

En relación a las mediciones miotérmicas, que tienen su paralelo con otras mediciones energéticas, Gibbs ha dividido conceptualmente la liberación total de calor de un músculo en dos grandes constituyentes: basal y activo. Estos comprenden, respectivamente, a los procesos metabólicos encargados de mantener la homeostasis en reposo, y a los eventos del acoplamiento excitación-contracción-relajación y recuperación de los compuestos de alta energía consumidos en el ciclo contráctil. El calor activo, asociado a la contracción muscular debe contener: (a) una fracción de energía o "calor de activación" vinculado a la unión y remoción activa del  $\text{Ca}^{12}$  asociable a los miofilamentos, (b) una segunda fracción de "calor dependiente de tensión" vinculado a la actividad actomiosínica, y (c) otra fracción de "calor de recuperación" vinculado a la síntesis metabólica del ATP anteriormente consumido (Chapman y Gibbs, 1972).

### a. Metabolismo basal

La liberación de calor asociada al metabolismo basal es una medida de la utilización y recuperación de la energía química empleada en el mantenimiento de la homeostasis celular (Gibbs y Chapman, 1979a). Aún cuando no se lo estimule, un músculo debe conservar la integridad de su composición intracelular en contra de gradientes electro-químicos. La cuantificación del metabolismo basal en el músculo cardíaco ha requerido evitar la actividad espontánea característica del mismo. Esto se ha logrado mediante el uso de músculos papilares o por destrucción del área de tejido marcapaso en ventrículo aislado. La cuantificación del metabolismo basal en corazón entero se realizó por el uso de soluciones cardioplégicas de alta  $[\text{K}]_e$  (Suga y col., 1983), lo cual origina una considerable sobreestimación del mismo (Ponce-Hornos y col., 1992).

Los estudios miotérmicos permiten medir el calor de reposo mecánico. Se ha descrito que existe

una relación inversa entre el calor de reposo y el peso corporal de diversas especies (Loiselle, 1987). Así, se han obtenido estimaciones de calor basal de alrededor de 1 mW.g<sup>-1</sup> (<sup>1</sup>) para gato, 1.8 mW.g<sup>-1</sup> para conejo, 2.5 mW.g<sup>-1</sup> para cobayo, y 3.5 a 4 mW.g<sup>-1</sup> para rata (Gibbs y Loiselle, 1978). El calor de reposo aumenta con el incremento en la precarga o grado de estiramiento del músculo (Gibbs y col., 1967). Otro factor capaz de modificar al calor de reposo es el sustrato metabólico. El calor de reposo es máximo con piruvato y sigue un orden decreciente para acetato, lactato y glucosa (Chapman y Gibbs, 1974). Por otra parte, el calor de reposo es prácticamente insensible a la temperatura como también lo es el consumo de O<sub>2</sub> en reposo (Loiselle, 1983; Loiselle, 1985a,b).

Si bien las bases fisiológicas del calor de reposo permanecen actualmente en estudio, se ha postulado al transporte activo de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> como uno de los responsables del consumo basal de ATP en estas condiciones (Gibbs y Chapman, 1979a). De la aplicación de técnicas miotérmicas conjuntamente con métodos radioisotópicos se ha estimado que el transporte activo de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> participaría con aproximadamente 10 a 25 % del calor producido durante el reposo mecánico (Gibbs y Chapman, 1979b; Gibbs, 1983; Ponce-Hornos y col., 1987). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que hasta el 20% de los valores medidos de calor de reposo estaría relacionado con el costo energético del recambio de proteínas (Gibbs y Chapman, 1979b). Se ha sugerido que otro aporte al metabolismo basal sería el mantenimiento del gradiente protón-motriz mitocondrial frente a un continuo influjo pasivo de H<sup>+</sup> hacia la matriz, lo cual representaría un 33 % del calor de reposo (Loiselle, 1987). Avala esta hipótesis la correspondencia existente entre los contenidos mitocondriales y los respectivos metabolismos basales de diversos músculos. Las diferencias observadas en el calor de reposo cardíaco entre distintas especies se correlacionaron con el volumen mitocondrial de sus corazones (Loiselle, 1987). Asimismo, el músculo

---

<sup>1</sup>- Si no se indica otra cosa, todas las mediciones energéticas serán expresadas por g de tejido húmedo.

cardíaco, con más contenido mitocondrial que el esquelético, posee un metabolismo basal 5 a 8 veces más elevado que este último, dependiendo de la especie (Loiselle y Gibbs, 1979).

Cambios en la  $[Ca]_i$  no afectan al calor de reposo en  $[K]_i$  cercanas a la fisiológica (Chapman y col., 1976; Suga y col., 1983; Ponce-Hornos y Taquini, 1986). Esto sugiere que la contribución del transporte de Ca sarcolemal al calor de reposo es despreciable (Ponce-Hornos, 1990). Por otra parte, el mantenimiento de una baja  $[Ca]_i$  citosólica en el miocardio mediante las bombas de Ca del RS representaría menos de un 28 % del calor de reposo promedio entre especies (Ponce-Hornos, 1990).

En resumen, el calor de reposo en músculo cardíaco refleja considerables diferencias inter-especie. En términos generales parece estar constituido por los siguientes eventos: actividad Na-K-ATPasa, recambio proteico, actividad mitocondrial y actividad de bombeo de Ca citosólico por el RS. Sin embargo, el total esclarecimiento de su origen es aún materia de especulación.

#### b. Metabolismo activo

El músculo cardíaco aislado y perfundido responde a la estimulación eléctrica con desarrollo de fuerza, lo cual hace posible la realización de trabajo mecánico externo. A diferencia del músculo esquelético, en el cardíaco la energía total transformada es máxima cuando el músculo desarrolla fuerza pero no realiza trabajo externo (contracción isométrica) (Gibbs, 1987). La energía química consumida durante el evento contráctil es empleada para realizar acortamiento interno a expensas de la extensión del elemento elástico y, en parte, liberada en forma de calor (Gibbs y Chapman, 1979b; Gibbs, 1987).

La liberación de calor que acompaña al ciclo contracción-relajación, al que se ha llamado calor activo, es la manifestación térmica de los cambios químicos que ocurren durante el evento contráctil. Estos cambios involucran tanto la utilización (esencialmente anaeróbica) como la recuperación (principalmente aeróbica) de la energía contenida en enlaces químicos de los compuestos ATP y CrP.



Según la división clásica, los componentes de calor que deben asociarse al ciclo excitación-contracción-relajación del músculo cardíaco, incluyen un componente "dependiente de tensión" y uno independiente de ella denominado "calor de activación" (Chapman y Gibbs, 1972). El primero de ellos está relacionado con la hidrólisis de ATP a nivel de la ATPasa de la miosina. El componente "independiente de tensión" está asociado con la despolarización, la liberación de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico, su unión a los sitios específicos (Troponina-C y calmodulina) e inespecíficos, su remoción del citosol por Ca-ATPasas y la recuperación del gradiente electroquímico para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por la Na-K-ATPasa (Gibbs y Vaughan, 1968; Gibbs y Chapman, 1979a; Gibbs y col., 1988). La energía química utilizada por ambos componentes debe ser recuperada antes de la siguiente contracción.

Para la evaluación del componente independiente de tensión, cuya manifestación térmica se ha denominado "calor de activación", ha sido necesario eliminar la interacción entre miofilamentos del proceso total. En el músculo esquelético, esto ha podido lograrse por estiramiento hasta eliminación del solapamiento entre los miofilamentos (Homsher y col., 1972; Rall, 1979). En músculo cardíaco, en cambio, esa técnica no puede utilizarse ya que produce daño irreversible del tejido. Un método empleado para medir el calor de activación en músculos papilares ha sido el de minimizar la generación de fuerza disminuyendo la longitud de reposo, hasta que la estimulación no genere fuerza registrable (Gibbs y col., 1967; Gibbs y Vaughan, 1968). Este método ha sido criticado fundamentalmente debido a que los cambios en la geometría del músculo alteran la liberación de  $\text{Ca}^{12}$  desde los sitios de almacenamiento, lo cual subestimaría al calor de activación (Gibbs y col., 1988). Además, podría existir alguna actividad de puentes actomiosínicos efectuando acortamiento interno aún a baja longitud del músculo, lo cual sobreestimaría el calor de activación (Gibbs y col., 1988). Un método alternativo ha sido la utilización de medios hiperosmóticos, como el de manitol hasta lograr 2.5 veces la osmolaridad normal, en la que la interacción entre miofilamentos es mínima (Mulieri y Alpert, 1982; Gibbs y col., 1988). Este método

ha sido criticado porque sólo podría ser empleado a frecuencias de estimulación inferiores a 0.2 Hz, ya que frecuencias más altas inducen frecuentemente una respuesta mecánica similar a una contracción tetánica del 10 % de la fuerza normal (Gibbs y col., 1988). Más recientemente se ha utilizado la técnica de "quick release" que consiste en la liberación rápida del músculo inmediatamente después de estimulado y mientras transcurre su período de latencia (generalmente 15 ms). El músculo se activa a longitud óptima y, mientras transcurre su tiempo de latencia para contraerse, es liberado rápidamente de su estiramiento con lo que no desarrolla fuerza (Gibbs y col., 1988). Este método no afecta al tejido durante la activación por lo que las estimaciones obtenidas, más altas que las provenientes de los otros métodos para la misma especie, deben ser más cercanas al verdadero calor de activación. En [Ca] fisiológicas, los valores de calor de activación obtenidos por los tres métodos varían, según la especie bajo estudio, entre 0.7 y 4 mJ.g<sup>-1</sup> (Loiselle y Gibbs, 1979; Mulieri y Alpert, 1982; Loiselle, 1987; Gibbs y col., 1988). Estas magnitudes fueron modificables por agentes que alteran la contractilidad (Gibbs y Vaughan, 1968; Gibbs, 1983).

Las estimaciones del "calor dependiente de tensión" fueron obtenidas en músculo papilar a partir de la pendiente de las correlaciones lineales de calor total de contracciones isométricas vs. fuerza máxima desarrollada (o tensión parietal). La fuerza fue modificada por variación de la longitud inicial del músculo ya sea en el método de pre-acortamiento o en el de "quick-release" en músculos papilares. En corazón entero, la energía dependiente de la fuerza se ha medido como la variación del consumo de O<sub>2</sub> (Suga y col., 1983) o de la liberación de calor (Coulson, 1982) en función del área presión-volumen. Han sido halladas relaciones calor-fuerza lineales (Gibbs y Gibson, 1970; Suga y col., 1983) o curvilíneas que se han convertido en lineales cuando se consideró la fuerza total (activa + reposo) (Mulieri y Alpert, 1982; Coulson, 1982). En estos métodos, la ordenada al origen de la correlación energía-fuerza desarrollada (o área P-V) dio estimaciones del calor de activación que oscilan entre 2

$\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$  (Gibbs, 1987) y  $4.3 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}$  (Suga y col., 1983). Las pendientes de dichas correlaciones rindieron estimaciones del calor dependiente de tensión del músculo papilar de conejo que oscilan entre  $0.17 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$  por el método de "quick-release" y  $0.22 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$  (Gibbs, 1987) a  $0.33 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$  (Alpert y Mulieri, 1982) por el método de pre-acortamiento. Estas estimaciones del calor dependiente de tensión incluyen el calor de recuperación, puesto que representan la variación del calor total por unidad de fuerza.

### c. Metabolismo de recuperación

La resíntesis del ATP consumido durante la activación y la contracción es provisto por la fosforilación oxidativa mitocondrial y la hidrólisis citosólica y resíntesis mitocondrial de CrP. Se suma una pequeña contribución de las fosforilaciones a nivel de sustrato de la vía glicolítica citosólica (Gibbs, 1978). Estas reacciones constituyen el denominado metabolismo de recuperación y liberan una cantidad de calor que depende de la vía utilizada y es proporcional a la energía química a recuperar. El músculo cardíaco tiene una extraordinaria capacidad para generar energía en forma de ATP aún a muy bajas presiones de  $\text{O}_2$  debido a su alto contenido mitocondrial. El metabolismo anaeróbico participa relativamente poco aún en condiciones fisiológicas de gran demanda (Gibbs, 1978). A partir de los primeros estudios miotérmicos surgió que en cada contracción cardíaca se desarrollaba una fase rápida de liberación de calor (calor inicial) seguida por una fase mucho más lenta que superaba en alrededor de un 20 % al calor liberado inicialmente (Chapman y Gibbs, 1974). Esto contrasta con el músculo esquelético, en el que el calor de recuperación evoluciona en una fase tardía distinguible del calor inicial (Hill, 1965; Wendt y Gibbs, 1976). Para determinar la fracción de calor de recuperación metabólica en un latido se ha comparado el calor total de las contracciones miocárdicas en condiciones aeróbicas y anóxicas. Sin embargo, las alteraciones en el desarrollo de fuerza que se producen durante la anoxia

dificultan la estimación, especialmente cuando se utilizan inhibidores metabólicos. El empleo de éstos para lograr la anoxia conduce a una sobreestimación del calor remanente adjudicable al consumo de ATP, debido a que se estimula la glicólisis anaeróbica (Gibbs, 1978). Debido a la utilización de estas condiciones injuriosas para el tejido, no se ha precisado aún la magnitud del calor de recuperación del miocardio. Las estimaciones del mismo provienen de los cambios en la economía muscular (fuerza desarrollada/ calor liberado) al pasar de la aerobiosis a la anaerobiosis. La economía muscular se ha estimado mediante el "coeficiente isométrico de calor" (CIQ) que es una relación adimensional calculada como el cociente entre la fuerza desarrollada (T) (multiplicada por la longitud del músculo (l)) y el calor total por latido (H) ( $CIQ = T.l/H$ ). Se ha descrito un cambio de este parámetro adimensional desde 3.6 en condiciones aeróbicas hasta 6.7 en anoxia, sugiriendo que el calor de recuperación representaría alrededor del 45 % del calor total observado en aerobiosis (Gibbs y Chapman, 1979a). Sin embargo, no se lo ha diferenciado como fracción distinguible en el calor total liberado. En condiciones en que el músculo desarrolla fuerza, el calor de recuperación ha sido estimado por diferencia entre el calor total de una contracción en estado estacionario y el calor inicial (Alpert y Mulieri, 1982a). Este método asume arbitrariamente que el calor inicial (que incluye el calor dependiente y el independiente de tensión) no contendría calor de recuperación en simultáneo, lo cual aún no ha sido establecido con certeza. En efecto, la identificación y cuantificación del calor de recuperación es un aspecto aún sin definición dada la superposición e interdependencia de los eventos de consumo y recuperación del ATP.

En conclusión, debido a la dificultad en separar claramente los eventos de activación, desarrollo de fuerza y recuperación, se han utilizado métodos no fisiológicos para su cuantificación. Estos métodos reciben diversas críticas por afectar de una u otra manera al miocardio (por ejemplo hiperosmolaridad, alejamiento de su longitud óptima, tratamientos con venenos mitocondriales). Esto hace también que los resultados sean variables según la deficiencia inherente al método empleado.

### 3. Métodos miotérmicos

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

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

Este método utiliza la medición del flujo coronario y el gradiente térmico ( $\Delta T$ ) entre los fluidos arteriales y venosos (Neill y col., 1961; McDonald, 1971; Rusy y Coulson, 1973; Theisohn y col., 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:

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

Donde:  $H$  = flujo de calor

$\Delta T$  = 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 min y de sensibilidad relativamente baja. La mayor ventaja es que la utilización de 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. 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 y col., 1977).

#### b. Método de las termopilas

Este método fue desarrollado y aplicado extensamente por A.V. Hill en el estudio energético del músculo esquelético (Hill, 1965). En 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguieron desarrollar un sistema (posteriormente mejorado por Mulieri y col., 1977) de termopilas diseñadas para medir calor liberado en ciertas preparaciones musculares (Ricchiuti y Gibbs, 1965; Gibbs y col., 1967). La preparación muscular a utilizar debía ser suficientemente delgada para permitir la adecuada difusión de oxígeno en el tejido, y de forma tal que tuviera la mayor parte de su superficie 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 con una elevada pérdida de calor (de aproximadamente 14% por segundo) y la consiguiente inestabilidad de la línea de base. Frecuentemente esa pérdida es corregida electrónicamente. Surgen también inconvenientes derivados del pequeño tamaño de las preparaciones utilizadas (promedio de 5 mg). Uno de ellos está asociado a la cantidad de solución que permanece adherida a la preparación y que puede inducir una incertidumbre de hasta un 30% en la masa tisular a utilizar. Además, el pequeño tamaño de la preparación hace extremadamente difícil la medición simultánea de parámetros metabólicos o estudios de cinética iónica. Las mayores ventajas de esta metodología son su alta sensibilidad y rápida respuesta

(constantes de tiempo de alrededor de 10 s) considerablemente superiores al método de las 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 el método microcalorimétrico desarrollado en 1982 (Ponce-Hornos y col., 1982a). Se basa en la medición del flujo de calor desde la cámara interna de un microcalorímetro, en donde se encuentra la pieza muscular en estudio, hacia las paredes externas del mismo en contacto con un baño mantenido a temperatura constante. La medición se lleva a cabo mediante el uso de dos juegos de 71 unidades termosensibles cada uno, conectadas en serie y 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 el de la medición de diferencias de temperatura arterio-venosa, permite la utilización de una gran variedad de preparaciones miocárdicas de tamaños diversos perfundidas por vía fisiológica. Esto resuelve el inconveniente del espesor tisular como factor limitante de la difusión de oxígeno hacia el tejido. En cuanto a la velocidad de respuesta (constante de tiempo de 20 a 30 s) es mayor que la del método de medición de diferencias de temperatura arterio-venosa pero menor que el método de las termopilas. Su sensibilidad es comparable a la de este último y, además, permite la evaluación continua de la actividad contráctil, parámetros metabólicos (mediante métodos bioquímicos) y flujos iónicos, simultáneamente con las mediciones de calor liberado (Ponce-Hornos y col., 1982a; Dominguez-Mon y col., 1984; Ponce-Hornos y col., 1987; Ponce-Hornos y col., 1992). Por otra parte, estas mediciones son técnicamente independientes de la existencia de líquido de perfusión, y son utilizables en condiciones isquémicas (ausencia de perfusión) (Ponce-Hornos y col., 1982a). Este método es el que se ha utilizado

en la presente tesis, encontrándose detallado en "Materiales y Métodos".

#### 4. Otras metodologías energéticas

##### a. Consumo de oxígeno

La medición del consumo de  $O_2$  del músculo es equivalente a la medición miotérmica de los procesos aeróbicos, que incluyen a la recuperación mitocondrial del ATP previamente consumido en la contracción. En estudios de corazón entero, se ha empleado esta metodología como medida directa del recambio energético. El consumo de  $O_2$  es obtenido como el producto entre la diferencia de concentración de  $O_2$  arteriovenosa y el flujo sanguíneo coronario (Gibbs, 1978). En la preparación aislada perfundida el método se aplica manteniendo controladas la frecuencia cardíaca, el volumen diastólico final y la presión de perfusión. En el corazón "in situ" se suma a estos factores el control de la post-carga. Por otra parte, la metodología de medición directa del consumo de  $O_2$  también se ha aplicado en células aisladas (Ricchiuti y Gibbs, 1965). La comparación de las mediciones de consumo de  $O_2$  con las de calor liberado puede efectuarse mediante el equivalente calórico del  $O_2$ . Este ha sido estimado en 20.5 J/ml  $O_2$  por medición directa en el corazón de conejo perfundido con piruvato como sustrato (Coulson, 1976). Los datos de consumo de  $O_2$  obtenidos en reposo mecánico de diversas especies (Gibbs, 1978) resultan considerablemente superiores a los estimados por los métodos miotérmicos (Loiselle, 1987; Ponce-Hornos y col., 1989). Las diferencias radican fundamentalmente en que las estimaciones de consumo de  $O_2$  basal en corazón entero se realizaban clásicamente deteniendo el corazón en diástole por la perfusión con alta [K] $^+$ , maniobra que eleva el calor de reposo (Ponce-Hornos y col., 1992). Durante la actividad contráctil, se ha determinado que el mayor determinante del consumo de  $O_2$  en el corazón "in situ" es el producto entre la fuerza máxima desarrollada y la frecuencia cardíaca (McDonald y col., 1966).

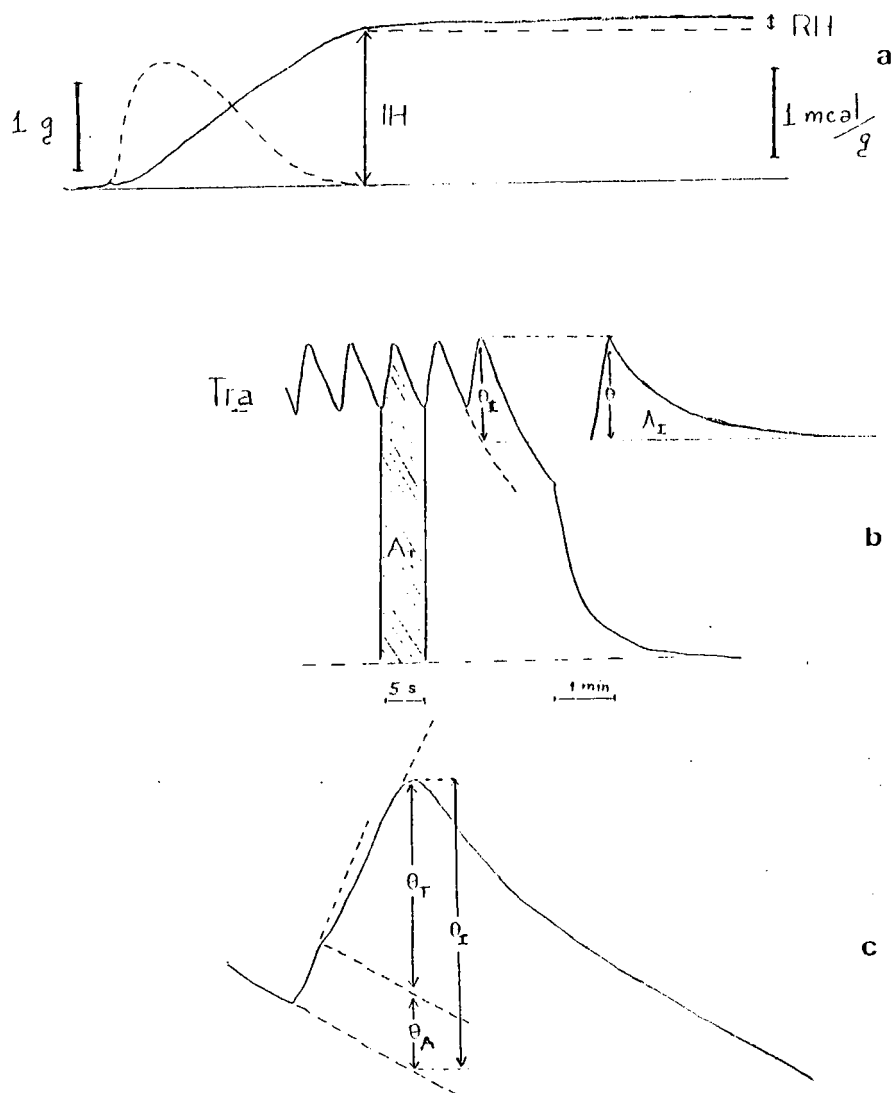


### b. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una poderosa metodología para el estudio metabólico muscular. Provee información acerca de las concentraciones citosólicas promedio de ATP, CrP, Cr, H<sup>+</sup> y P<sub>i</sub> en el músculo esquelético o cardíaco (Gadian y col., 1976; Ingwall y Bittl, 1987). También se han obtenido estimaciones de las concentraciones de estos metabolitos durante un ciclo cardíaco (Balaban y Heinemann, 1989). Otro logro de esta metodología es que ha suministrado información acerca de la enzimología de la reacción de creatina-quinasa (Spencer y col., 1988). Una crítica que se ha efectuado al RMN es que tendría cierta fuente de error proveniente del movimiento del corazón en el campo magnético (Dawson, 1983).

### 5. Métodos experimentales para la diferenciación de los componentes miotérmicos de un latido:

La máxima diferenciación de componentes que se ha descrito hasta el presente en el calor liberado en un único latido consiste en una primera fase rápida (calor inicial) seguida por una fase lenta adjudicada al calor de recuperación. Estas fases se visualizaron en el registro de las termopilas corregido automáticamente por la constante de pérdida de calor (Alpert y Mulieri, 1982b, Fig. 1a). Cuando la respuesta de las termopilas no es automáticamente corregida, el registro de los cambios de temperatura de un papilar sometido a un tren de estímulos muestra una deflexión rápida inicial en cada contracción (Alpert y Mulieri, 1982a). A partir de ella ha sido calculado el calor inicial liberado utilizando el método de Bugnard (Bugnard, 1934). Este método estima la energía como el área debajo de la curva de enfriamiento exponencial de la termopila ( $A_i$  en Fig. 1b). Por diferencia entre el calor por latido ( $A_T$ ) y el calor inicial ( $A_i$ ) se ha calculado un calor residual, adjudicado arbitrariamente al calor de recuperación (Alpert y Mulieri, 1982a). En el calor inicial se han descrito dos componentes cuyas energías se estimaron por el método de Bugnard, asumiendo que son secuenciales (Fig. 1c). Debe



**FIGURA 1:** Diferenciación de componentes en el registro con termopilas del calor asociado a una contracción de músculo papilar estimulado en estado estacionario: (a) Esquema del registro del calor liberado en una contracción con corrección automática de la señal por la pérdida de calor de la termopila.  $IH$ : calor inicial,  $RH$ : calor de recuperación. La curva punteada indica el simultáneo trazado de la fuerza desarrollada (esquemático a partir de registros de Chapman y Gibbs, 1974). (b) Esquema del registro miotérmico de un tren estacionario de estímulos sin corrección de la señal.  $A_T$ : área total proporcional al calor total liberado en una contracción;  $A_I$ : área proporcional al calor inicial ( $IH$ ) y calculada por integración de la curva de enfriamiento de la termopila ante un pulso de energía similar al liberado por el músculo ( $\theta_I$ ) (esquemático a partir de registros de Alpert y Mulieri, 1982a). (c) Esquema correspondiente al calor inicial del registro de (b) donde se ha interrumpido la estimulación; a partir de las alturas  $\theta_A$  y  $\theta_T$  se han calculado las magnitudes del calor de activación y el calor dependiente de tensión, respectivamente (modificado de registros de Alpert y Mulieri, 1982a).

destacarse que para algunos procesos es desconocido si existe una secuencia o simultaneidad durante el ciclo contracción-relajación. En condiciones en que existe generación de fuerza, el calor liberado en el ciclaje actomiosínico estaría incluido en el calor inicial (Alpert y Mulieri, 1982a). Los autores han sugerido que el calor asociado a la primera deflexión del calor inicial ( $\theta_A$ ) correspondería al calor de activación y el asociado a la segunda ( $\theta_T$ ) al calor dependiente de tensión (Alpert y Mulieri, 1982a). Sin embargo, comúnmente cuantifican al calor de activación como el calor remanente luego de anular el desarrollo de fuerza por incubación del músculo en un medio hiperosmótico (Holubarsch y col., 1982; Alpert y Mulieri, 1982b). El calor dependiente de tensión de un único latido es cuantificado por diferencia entre el calor inicial y el calor de activación (Alpert y Mulieri, 1982b). En el calor independiente de tensión de músculo esquelético obtenido por estiramiento hasta evitar el solapamiento actomiosínico los mismos autores han distinguido dos componentes: uno rápido y otro lento, a los que han vinculado respectivamente a la unión Ca-TnC y a la remoción de Ca citosólico (Mulieri y Alpert, 1982).

Esta forma de evaluación de componentes implica muchas simplificaciones que encierran puntos aún no dilucidados. Así, se asume que el calor inicial (activación y dependiente de tensión) no contiene calor de recuperación, pues éste es calculado por diferencia. También se asume que luego de las maniobras experimentales que anulan el desarrollo de fuerza sólo se libera el calor de activación, y corresponde a una magnitud similar a la existente en condición de desarrollo de fuerza. Es muy probable que la célula varíe tanto sus mecanismos de liberación y unión de  $\text{Ca}^{12}$  a sitios específicos como su actividad enzimática cuando es sometida a un incremento de 2.5 veces su osmolaridad normal o a un pre-acortamiento. De hecho, las estimaciones de calor de activación obtenidas por esos dos métodos resultan inferiores a las obtenidas por el método de liberación rápida en el que el estímulo para la contracción se aplica a longitud óptima y osmolaridad normal (Gibbs y col., 1988). En conclusión, en

condición de generación de fuerza sólo se han determinado hasta el momento dos componentes correspondientes, en conjunto, al calor inicial y una tercera fracción de calor remanente. Los primeros se han cuantificado directamente por el método de Bugnard pues evolucionan durante tiempos cortos. La fracción remanente es calculada por diferencia (Alpert y Mulieri, 1982a). La reunión de resultados obtenidos en condiciones diferentes (con y sin desarrollo de fuerza) para el cálculo por diferencia del calor dependiente de tensión o el de recuperación complica la estimación de los mismos. Especialmente, puede ser inadecuada la extrapolación cuantitativa a una condición en la que todos esos eventos se desarrollen integralmente como es durante el desarrollo de fuerza.

En esta tesis, se analiza la respuesta miotérmica de una única contracción ventricular en condición de desarrollo de fuerza, mediante un microcalorímetro de flujo. Pueden distinguirse cuatro componentes de calor en un latido aislado, que son cuantificados y caracterizados. Los resultados aportan un avance en el esclarecimiento de la correspondencia entre los eventos celulares que ocurren durante el ciclo reposo-contracción-relajación y las fracciones de calor liberado en el mismo.

## ***MATERIALES Y METODOS***

## Capítulo 4: Preparación biológica

### 1. Montaje del corazón perfundido de rata

Se utilizaron ratas Wistar de aproximadamente 250-300 g de peso corporal, las que fueron inyectadas 24 h antes de su sacrificio con 5 mg de reserpina/kg por vía I.P en dosis única. Esto se realizó para evitar la liberación de catecolaminas ante la despolarización del ventrículo con alta [K]<sub>o</sub>. Las ratas se heparinizaron y sacrificaron por sobredosis de pentobarbital. El corazón fue removido por toracotomía y sumergido en solución Krebs de baja [Ca] (0.5 mM). Inmediatamente se perfundió arterialmente el corazón vía aorta según la técnica de Langendorff, con un flujo de 5 ml/min y a 25 °C. Se procedió luego a remover las aurículas y los músculos papilares del ventrículo derecho y se efectuó una pequeña incisión en el tabique interventricular cercano al nacimiento de la aorta a fin de eliminar, a esta temperatura, la actividad espontánea. Seguidamente se introdujo en el ventrículo izquierdo un globo de látex de volumen regulable, conectado a un transductor de presión Statham P23 Db a través de una cánula con agua. El ventrículo se cerró por medio de sutura. Se colocaron, además, dos electrodos de acero inoxidable para la estimulación eléctrica en la pared externa del ventrículo derecho. Posteriormente se introdujo el corazón, sostenido en un soporte de Kel-F, en la cámara interna de un calorímetro de flujo (Fig. 2). Se cerró rápidamente la cámara, constatando un buen drenaje de la perfusión y se sumergió el calorímetro en el baño regulado a 25 °C. Se registró la presión de perfusión, mediante un transductor Statham P23 Db. La longitud inicial del músculo se reguló a través del aumento gradual del volumen del globo intraventricular en escalones de presión de 1 a 2 mN.mm<sup>-2</sup>, hasta encontrar aquél en que se desarrollase la mayor presión isovolumétrica (longitud óptima). Luego de un período de estabilización del registro calorimétrico, de aproximadamente 30 minutos, se comenzó a desarrollar el protocolo específico. La estimulación eléctrica se efectuó con un estimulador Grass SD

9, utilizándose ondas cuadradas de 5 V y 5 ms de duración, ya sea en pulsos únicos (latido aislado) o a frecuencia de 0.167 Hz (estimulación estacionaria). La presión intraventricular de reposo a la que se sometieron los músculos se mantuvo constante en cada experimento. Sólo fueron aceptados para su estudio aquellos músculos que durante el período de equilibración en condiciones de 0.5 mM Ca y estimulación estacionaria a 0.167 Hz mantuvieron una máxima presión intraventricular desarrollada (P) superior a 14 mN.mm<sup>2</sup> y una presión de reposo no mayor de 8 mN.mm<sup>2</sup>. También se descartaron aquellas preparaciones que en ausencia de estimulación desarrollaron actividad espontánea. En experimentos preliminares a esta tesis se había establecido que a la temperatura de trabajo y en el rango de frecuencia empleado, los músculos perfundidos a 6 ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de tejido húmedo con solución Krebs con 7 mM K y 0.5 mM Ca mantenían su fuerza contráctil y sus máximas velocidades de contracción y relajación constantes por períodos superiores a las seis horas.

Al finalizar cada experimento el tejido fue removido del calorímetro, pesado en un recipiente previamente tarado (peso húmedo = 0.806 ± 0.032 g) y secado a 110 °C hasta peso constante. El porcentaje de agua tisular promedio fue de 81.7 ± 0.3% y no hubo diferencias entre los músculos expuestos solamente a 7 mM K y aquellos perfundidos además con 25 mM K.

## 2. Soluciones y drogas empleadas

Las soluciones utilizadas para la perfusión fueron modificaciones de la solución Krebs-Ringer, y difieren en la concentración de K, siendo ambas isoosmóticas y burbujeadas con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.4. La composición de las mismas (en mM) fue la siguiente:

Krebs "K-7": NaCl 100; KCl 7; CaCl<sub>2</sub> 0.5; MgCl<sub>2</sub> 1; NaHCO<sub>3</sub> 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; glucosa 6; sacarosa 36.

Krebs "K-25": NaCl 100; KCl 25; MgCl<sub>2</sub> 1; NaHCO<sub>3</sub> 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; glucosa 6 y concentración

variable de  $\text{CaCl}_2$  (0.5, 1, 2 y 4 mM) en las que no se realizaron correcciones por osmolaridad.

En los experimentos de hipoxia severa se reemplazó el burbujeo con  $\text{O}_2$  por uno con 95%  $\text{N}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  (pH 7.4). La solución con  $\text{N}_2$  fue burbujecada desde 30 minutos previos a su perfusión en el músculo.

La reserpina utilizada (Ciba-Geigy) fue vehiculizada en una solución propilenglicol-agua (1:1). Las soluciones de perfusión con verapamil 0.4  $\mu\text{M}$  fueron preparadas por el agregado al Krebs-K-25 de una solución 4 mM de verapamil (Hoechst) antes de cada experimento.

### 3. Mediciones mecánicas

Se registró continuamente la presión intraventricular isovolumétrica (P) en un polígrafo Grass 5D mediante un transductor de presión Statham P23 Db conectado a la cánula intraventricular. Se midieron la presión de reposo ( $P_r$ ), la máxima presión desarrollada durante el latido (P), y la integral presión desarrollada-tiempo (IPt) como el área debajo de la curva de P vs. t a una velocidad de registro de 25 o 50  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se obtuvo simultáneamente una señal de derivación de la presión, a partir de la que se midieron las máximas velocidades de contracción (+P) y relajación (-P). Se registró continuamente la presión de perfusión (PP) con otro transductor de presión Statham P23 Db



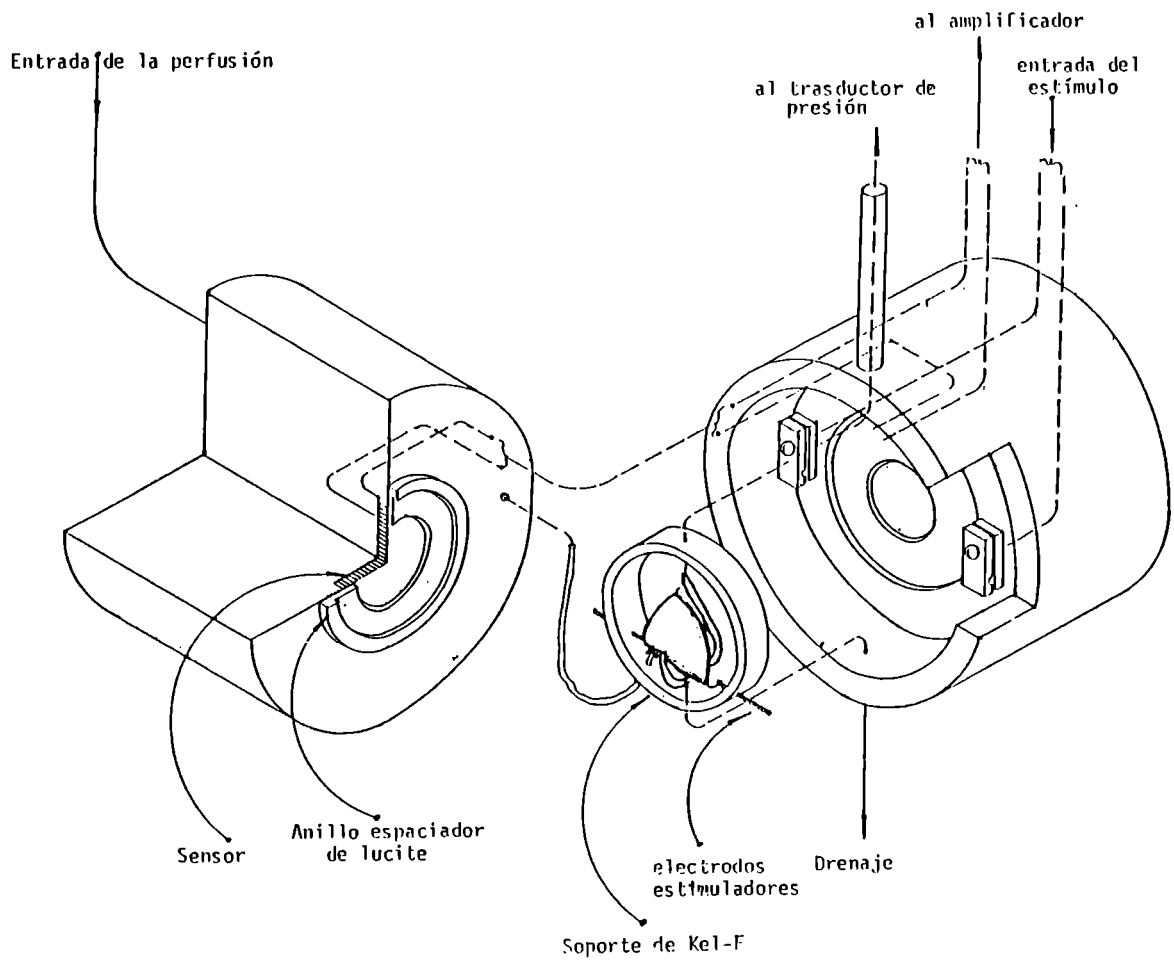
## Capítulo 5: Metodología microcalorimétrica

### 1. Descripción del sistema calorimétrico

Las mediciones miotérmicas se realizaron utilizando el sistema calorimétrico mostrado en la Fig.

2. Si bien los detalles de la construcción y métodos de calibración del sistema calorimétrico han sido extensamente publicados, estos se presentarán a continuación en forma resumida (Ponce-Hornos y col., 1982; Ponce-Hornos y col., 1987).

El calorímetro que se muestra en la Figura 2 está confeccionado en cobre. Utiliza dos juegos de unidades termosensibles (Cambion-Cambridge Thermoionic) conectadas en serie y ubicadas entre la cámara interna y la gran masa de cobre. La sensibilidad del calorímetro utilizado fue significativamente mejorada respecto del originalmente descrito (Ponce-Hornos y col., 1982) por aumento del número de uniones termosensibles desde 62 a 254. El material termosensible de los nuevos módulos termoelectrónicos (2 módulos cerámicos aislados Melcor Thermoelectric) es una aleación cuaternaria con propiedades anisotrópicas (Ponce-Hornos y col., 1990). Con estas unidades termosensibles y con perfusiones del orden de las utilizadas para corazones de rata, la constante de tiempo de la respuesta calorimétrica es de  $0.03 \text{ s}^{-1}$ . Por otra parte, las elevadas capacidad y conductividad calorífica de la carcasa de cobre permiten que el calor generado por el músculo sea conducido hacia las unidades termosensibles. El calorímetro se sumerge en un baño termostatizado por una serpentina con corriente de agua. Esta proviene de otro baño (frío-calor) controlado por un termostato de mercurio con sensibilidad de  $\pm 0.003 \text{ }^\circ\text{C}$ , en el cual la solución de perfusión se mantiene en equilibrio térmico. El músculo, perfundido con la solución térmicamente equilibrada y montado en un soporte de Kel-F, se coloca en la cámara interna del calorímetro, emergiendo la cánula del globo intraventricular por un pequeño orificio en la parte superior de la cámara. La producción de calor se evalúa entonces por la diferencia de temperatura entre



*FIGURA 2: Calorímetro de flujo utilizado. Se muestra el interior de la cámara interna.*

las paredes internas de las unidades termosensibles (en contacto con el músculo) y las externas (en contacto con el baño termostatzado a través de la carcasa de cobre). La señal de las unidades termosensibles es amplificada convenientemente y registrada sobre un polígrafo Grass 5D. Debido a que las mediciones de flujo de calor entre el baño y la cámara interna son diferenciales, la respuesta calorimétrica a una cantidad fija de calor es independiente de la temperatura a la que se realizan las mediciones.

## 2. Puesta en regimen del calorímetro y calibración

Aproximadamente 18 horas antes de cada experimento se procede a encender el sistema termostatzante del baño calorimétrico regulado a  $25.0 \pm 0.003$  °C, colocando las soluciones de perfusión para que alcancen el equilibrio térmico. El día del experimento se calibran en el polígrafo, los canales destinados a registrar las presiones de perfusión e intraventricular, el canal de derivación de la señal de presión intraventricular para registro de la  $dP/dt$ , y el canal de registro calorimétrico.

La respuesta calorimétrica se calibra mediante la aplicación de una cantidad conocida de energía por unidad de tiempo (potencia o flujo de calor) mediante una fuente eléctrica constante. Cuando cantidades conocidas de calor son aplicadas a la cámara interna del sistema calorimétrico, 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 una meseta dentro de los dos a tres minutos, con una constante de tiempo de alrededor de 20 s. La calibración se llevó a cabo por dos métodos. Uno de ellos es por pasaje de una onda de 2.1 kHz (potencia constante de 2 mW) a través del músculo por medio de los electrodos de estimulación según el método originalmente descrito, el cual no provoca actividad alguna por parte del músculo (Ponce-Hornos y col., 1982a). El otro es por pasaje de una corriente a través de una resistencia eléctrica de valor conocido calculando la potencia aplicada

( $p=I^2R$ , donde  $p$ = potencia,  $I$ = intensidad de corriente y  $R$  = resistencia). Los valores de factor de calibración del calorímetro ( $f_c$  dado por la relación entre los  $\mu W$  de potencia aplicada y los  $\mu V$  registrados en el polígrafo) obtenidos por ambos métodos fueron coincidentes. Rutinariamente se utilizó el primero de ellos al final de cada experimento. La calibración también permite la determinación de la constante de velocidad de enfriamiento exponencial ( $\mu$ ) de la señal calorimétrica tras interrumpir el estímulo energético y de la constante de tiempo ( $t_{1/2} = \ln 2/\mu$ ) (Ponce-Hornos y col., 1982a), que se utilizan para los cálculos energéticos posteriores.

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

$$\dot{H}_p = \Delta PP \cdot J_p \cdot 0.0022 + 0.009 \quad (3)$$

donde:  $\dot{H}_p$  = flujo de calor dependiente de la presión y del flujo (mW)  
 $\Delta PP$  = presión de perfusión a través del músculo (mm Hg)  
 $J_p$  = flujo de perfusión (ml.min<sup>-1</sup>)

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 Minipulus 2.

### 3. Mediciones miotérmicas

La generación de calor total asociada a cada contracción en estado estacionario (frecuencia constante) denominada calor activo ( $H_a$ ) se evaluó como diferencia entre el flujo de calor durante la estimulación en estado estacionario ( $\dot{H}_s$ ) y el flujo de calor en ausencia de estimulación ( $\dot{H}_0$ ), dividiendo

por la frecuencia ( $f$ ) a la que el músculo fue estimulado:

$$(\dot{H}_i - \dot{H}_r)/f = H_a$$

donde las unidades correspondientes de los flujos de calor ( $\dot{H}_i$  y  $\dot{H}_r$ ) son mW, de la frecuencia es Hz, y del calor por latido ( $H_a$ ) es mJ. En un latido aislado, el calor total liberado por latido (en mJ) se midió como el área bajo la curva de flujo de calor (en mW) vs. tiempo (en s) por encima de la línea de base correspondiente al reposo mecánico. En "Resultados" se presentará el desarrollo de un análisis para cuantificar las energías correspondientes a componentes individuales del calor total, tanto de latidos aislados como estacionarios. Para efectuar estos registros se empleó una velocidad de papel del polígrafo de 25 o 50 mm.s<sup>-1</sup> y una sensibilidad alta con una mínima señal registrada de 40  $\mu$ V y un ruido eléctrico de 1  $\mu$ V a máxima ganancia.

Los resultados energéticos se expresaron por gramo de tejido húmedo.

## Capítulo 6: Protocolos generales y análisis estadístico

### 1. Protocolos experimentales generales

Pasado el período de estabilización previo de 30-40 min, en Krebs-7 mM K y 0.5 mM Ca en reposo, el músculo se estimuló a una frecuencia de 0.167 Hz con pulsos de aproximadamente 5 V-5 ms. Cuando el músculo alcanzó un estado estacionario en su flujo energético se efectuaron registros a alta sensibilidad y velocidad de papel (25 a 50 mm.s<sup>-1</sup>) para captar las oscilaciones en el flujo de calor liberado en cada latido estacionario. Luego se suspendió la estimulación registrando el enfriamiento hasta el establecimiento de un nuevo estado de reposo estable (aproximadamente 30 minutos) y comparable al previo. Sobre ese calor de reposo ( $\dot{H}_r$ ) se efectuaron latidos aislados con pausas entre latidos de al menos 5-10 min hasta estabilización del flujo de calor de reposo.

Se perfundió, luego, sucesivamente con soluciones Krebs-K-25 con 0.5, 1, 2 y 4 mM Ca respectivamente, aguardando en cada cambio de medio la estabilización del calor de reposo. En cada condición experimental, se efectuaron 2 a 4 latidos aislados una vez alcanzado el calor de reposo estable, a fin de comprobar reproducibilidad.

El umbral de estimulación en 25 mM K fue de 15 V-15 ms. Debido a que el mayor estímulo aplicado debía disipar mayor energía en la cámara calorimétrica, se estimó la misma en un músculo hecho inexcitable por la perfusión de Krebs con 100 mM K y sin Ca<sup>12</sup>. La energía disipada por el estímulo fue de 0.2 mJ.g<sup>-1</sup> para 15 V-15 ms, para una resistencia equivalente del músculo de 820 ohms. Este valor fue despreciable por representar sólo 1/10 de la energía de un latido obtenido en 25 mM K-0.5 mM Ca y 1/1000 de la energía en 25 mM K-4 mM Ca.

En los experimentos realizados en hipoxia o en presencia de verapamil, los latidos aislados se obtuvieron en músculos perfundidos con una solución de 25 mM K y 2 mM Ca luego de alcanzada la

estabilización del calor de reposo.

## 2. Ajuste de funciones y métodos estadísticos

El ajuste a una función no lineal de las curvas de flujo de calor vs. tiempo se efectuó mediante un programa estadístico de ajuste de funciones denominado "Crunch Interactive Software Package" (CRISP) instrumentado por medio de una computadora tipo AT 386 compatible. La adquisición de los puntos de las curvas se efectuó manualmente, a frecuencia de 25 puntos. $s^{-1}$  durante los primeros 10 s y de 2.5 puntos. $s^{-1}$  durante el resto del registro. Las curvas se corrigieron por curvatura del registro del polígrafo y se interpolaron los puntos de la línea de base de acuerdo a los trazados de calor de reposo (en contracciones aisladas) o de enfriamiento del latido anterior (en contracciones estacionarias). Cuando ajustes no lineales con diferente número de componentes eran aplicados a una misma curva de flujo de calor vs. tiempo, y los coeficientes de correlación eran comparables, la bondad del ajuste se evaluó mediante la prueba Fisher para las respectivas varianzas (Documenta Geigy, 1965).

Las correlaciones lineales entre dos variables se efectuaron utilizando el método de los cuadrados mínimos (Documenta Geigy, 1965).

En los casos en que se manifestaron tendencias sistemáticas sin que se pudiera definir una función de ajuste se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) o el análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis. Se realizaron las pruebas individuales "a posteriori" no paramétricas por comparación de rangos de Mann-Whitney. Este análisis se prefirió para muestras pequeñas provenientes de diferente número de preparados, puesto que no es posible establecer con certeza si provienen de una distribución normal (Documenta Geigy, 1965; Siegel, 1990). Para las comparaciones múltiples pareadas se utilizó "a priori" la prueba de rangos de Friedman seguido de las pruebas individuales "a posteriori" de Mann-Whitney (Siegel, 1990). Las comparaciones de dos muestras fueron realizadas por la prueba paramétrica

t de Student para muestras pareadas o desapareadas, según el caso.

Las tablas utilizadas para el cálculo de probabilidades fueron las tablas de significación de coeficientes de correlación, y las de distribución de t de Student y de estadístico F para los métodos paramétricos (Documenta Geigy, 1965) y las tablas de distribución de  $\chi^2$  y estadístico U de Mann-Whitney para los métodos no paramétricos (Siegel, 1990). Siempre se consideró significativo el nivel de  $p < 0.05$ .



## ***RESULTADOS***

## Capítulo 7: Análisis de la respuesta del calorímetro de flujo

### 1. Respuesta miotérmica de un latido

El registro obtenido mediante el calorímetro de flujo utilizado permite distinguir a simple vista varios componentes en la liberación de calor de un latido (Fig. 3). Esto es notorio tanto en una única contracción efectuada luego de un período de reposo mayor a 5 minutos (latido aislado) como en una proveniente de un tren de estímulos a frecuencia constante (latido estacionario) (Figs. 3 y 4). El latido aislado genera su calor activo total sobre el flujo de calor de reposo o basal ( $\dot{H}_r$ ). El calor activo total de un latido aislado ( $H_a$ ) puede calcularse como el área bajo la curva de flujo de calor que se eleva por sobre el flujo de calor basal (Fig. 3). El estado estacionario de un músculo estimulado a determinada frecuencia es aquél en el que se establece constancia en la máxima fuerza desarrollada y en el flujo de calor (Fig. 4a). Este flujo de calor total ( $\dot{H}_t$ ) resulta superior al flujo de calor de reposo mecánico ( $\dot{H}_r$ ) y es posible calcular el calor activo por latido ( $H_a$ ) como el cociente entre la diferencia ( $\dot{H}_t - \dot{H}_r$ ) y la frecuencia de estimulación ( $H_a = [\dot{H}_t - \dot{H}_r] / f$ ) (Fig. 4a). A elevada amplificación puede notarse una oscilación periódica en  $\dot{H}_t$  correspondiente a cada latido estacionario (Fig. 4b).

La existencia de varios componentes en el calor liberado en un latido se visualiza, en principio, por bruscos cambios en las pendientes de los registros de flujo de calor vs. tiempo a elevada amplificación (Figs. 3 y 4). La transitoriedad y superposición de los eventos celulares que liberan calor durante una contracción hizo necesario el análisis previo del tipo de respuesta del calorímetro frente a generaciones de calor cortas (transitorias). A partir de ese análisis, explicado detalladamente a continuación, se han interpretado matemáticamente las respuestas calorimétricas. El análisis permite distinguir más de un componente de generación de calor en una combinación de respuestas simples, y estimar la energía liberada en cada uno de ellos.

## Capítulo 7: Análisis de la respuesta del calorímetro de flujo

### 1. Respuesta miotérmica de un latido

El registro obtenido mediante el calorímetro de flujo utilizado permite distinguir a simple vista varios componentes en la liberación de calor de un latido (Fig. 3). Esto es notorio tanto en una única contracción efectuada luego de un período de reposo mayor a 5 minutos (latido aislado) como en una proveniente de un tren de estímulos a frecuencia constante (latido estacionario) (Figs. 3 y 4). El latido aislado genera su calor activo total sobre el flujo de calor de reposo o basal ( $\dot{H}_r$ ). El calor activo total de un latido aislado ( $H_a$ ) puede calcularse como el área bajo la curva de flujo de calor que se eleva por sobre el flujo de calor basal (Fig. 3). El estado estacionario de un músculo estimulado a determinada frecuencia es aquél en el que se establece constancia en la máxima fuerza desarrollada y en el flujo de calor (Fig. 4a). Este flujo de calor total ( $\dot{H}_t$ ) resulta superior al flujo de calor de reposo mecánico ( $\dot{H}_r$ ) y es posible calcular el calor activo por latido ( $H_a$ ) como el cociente entre la diferencia ( $\dot{H}_t - \dot{H}_r$ ) y la frecuencia de estimulación ( $H_a = [\dot{H}_t - \dot{H}_r] / f$ ) (Fig. 4a). A elevada amplificación puede notarse una oscilación periódica en  $\dot{H}_t$ , correspondiente a cada latido estacionario (Fig. 4b).

La existencia de varios componentes en el calor liberado en un latido se visualiza, en principio, por bruscos cambios en las pendientes de los registros de flujo de calor vs. tiempo a elevada amplificación (Figs. 3 y 4). La transitoriedad y superposición de los eventos celulares que liberan calor durante una contracción hizo necesario el análisis previo del tipo de respuesta del calorímetro frente a generaciones de calor cortas (transitorias). A partir de ese análisis, explicado detalladamente a continuación, se han interpretado matemáticamente las respuestas calorimétricas. El análisis permite distinguir más de un componente de generación de calor en una combinación de respuestas simples, y estimar la energía liberada en cada uno de ellos.

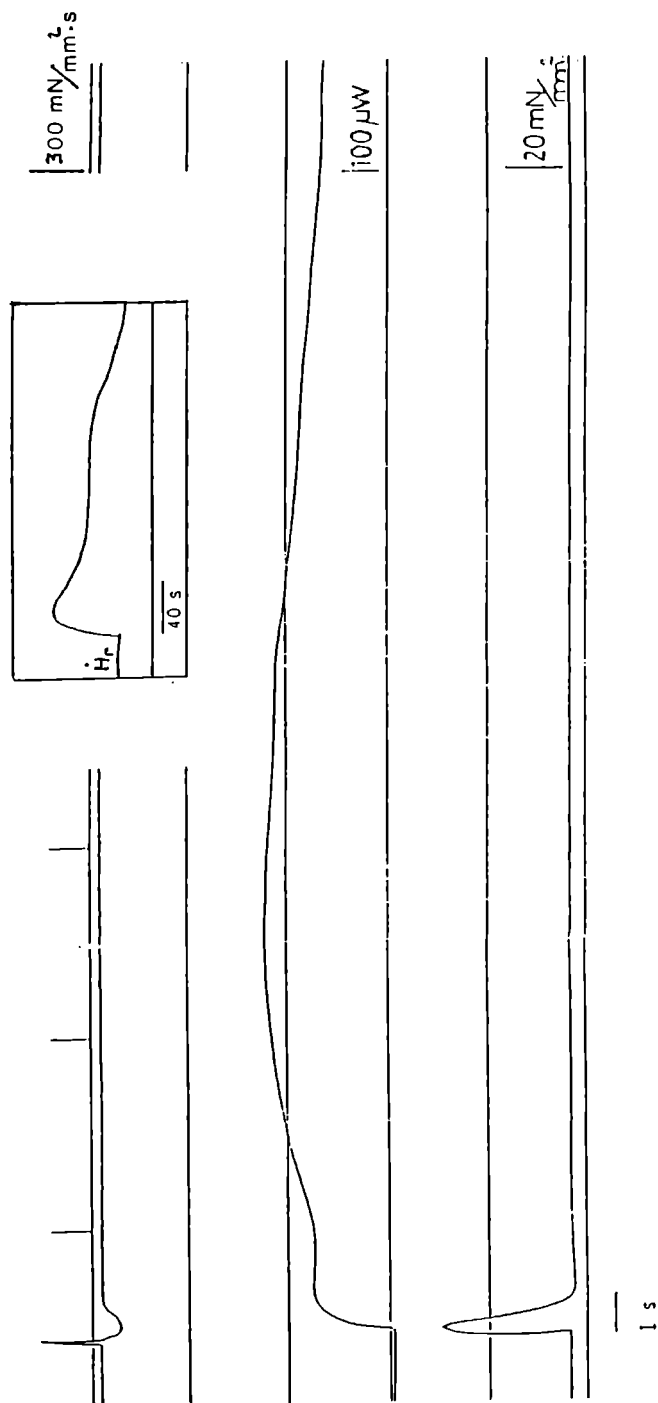


FIGURA 3: Registro simultáneo de la producción de calor (en  $\mu\text{W}$ ) y del desarrollo de presión isovolumétrica (en  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) y su primer derivada (en  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) correspondientes a un latido aislado del ventrículo izquierdo perfundido de rata. En el recuadro se muestra el registro calorimétrico en toda su extensión a velocidad 32 veces menor (la caída final corresponde al enfriamiento del sistema hasta el flujo de calor de reposo estacionario del músculo,  $H_r$ ).

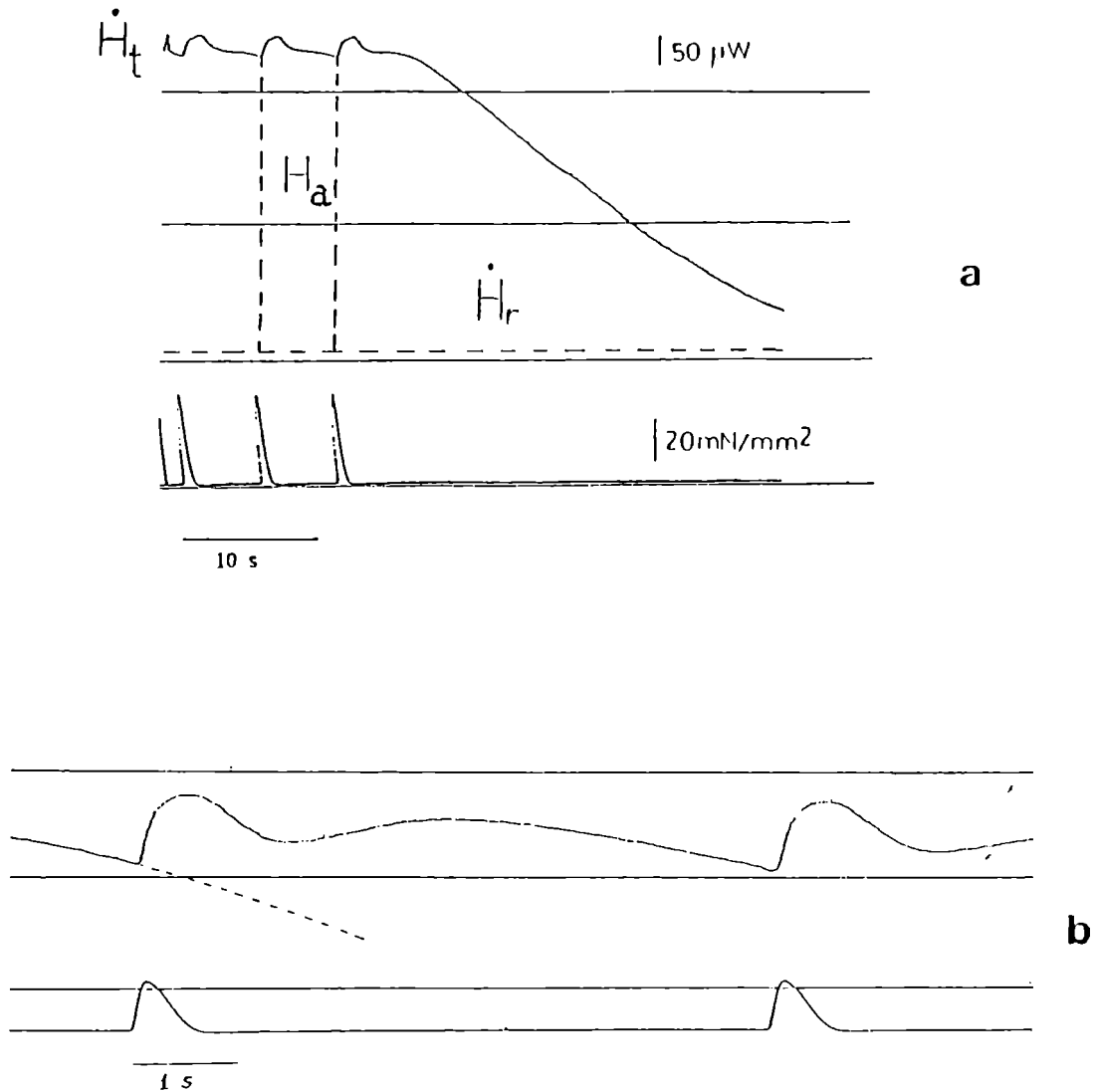


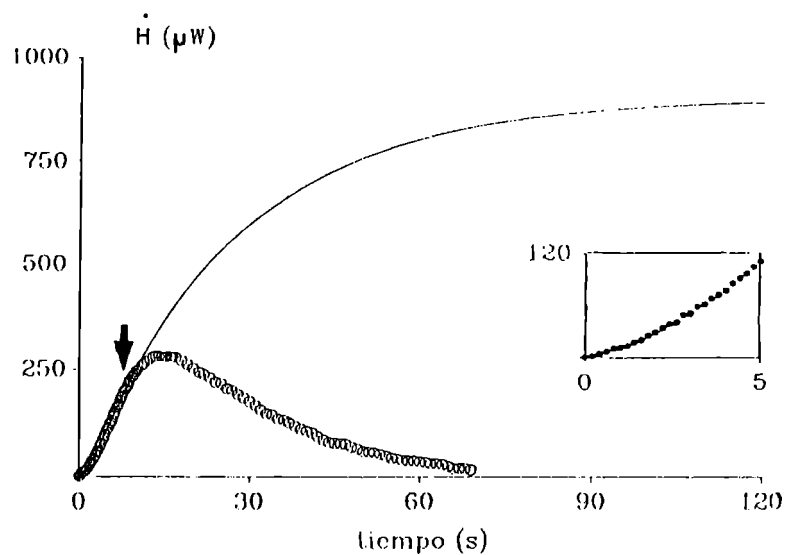
FIGURA 4: a- Registro simultáneo de la producción de calor total ( $\dot{H}_t$ ) y el desarrollo de presión isovolumétrica del ventrículo izquierdo perfundido de rata ante un tren estacionario de estímulos. Al suspender la estimulación, el registro retorna al flujo de calor de reposo ( $\dot{H}_r$ ). El área  $H_a$  corresponde al calor total por latido.

b- Registro miotérmico a alta amplificación de la meseta del flujo de calor total  $\dot{H}_t$  correspondiente a cada latido en estado estacionario. La línea de puntos indica el enfriamiento del sistema correspondiente al latido anterior (ver texto).

## 2. Respuestas calorimétricas simples estacionaria y transitoria

Para la evaluación cuantitativa de las respuestas miotérmicas se estudió en primer lugar la respuesta del calorímetro cuando se generan cantidades conocidas de calor en la cámara interna. Esto fue llevado a cabo haciendo pasar corriente alterna o continua, tanto por resistencias de distinta geometría como por músculos perfundidos (en éstos se utilizó sólo corriente alterna inferior al umbral de contracción). En la Fig. 5 se muestra el registro calorimétrico obtenido cuando se aplicó una potencia eléctrica constante sobre una resistencia dentro de la cámara interna. La disipación de calor mantenida durante un período cercano o superior a los cinco tiempos medios de enfriamiento calorimétrico ( $t_{1/2}$  de alrededor de 20 s) originó una meseta. Esta representa un estado estacionario de flujo de calor, en el que la cantidad de calor que llega a las unidades termosensibles es igual a la cantidad que se pierde a través de ellas. El registro se efectuó a altas velocidades (25 o 50 mm.s<sup>-1</sup>) a fin de determinar la evolución de la liberación de calor desde los primeros milisegundos (intervalo de muestreo de 20 ms). La respuesta fue exponencial como originalmente había sido descrito (Ponce-Hornos y col., 1982a). Sin embargo, a tiempos cortos se observó una sigmoidicidad (ver recuadro en Fig. 5) cualquiera que fuera la fuente de calor (resistencia eléctrica o músculo). Este comportamiento sólo fue claramente distinguible a velocidades de registro relativamente altas. No había sido originalmente descrito para este sistema calorimétrico (Ponce-Hornos y col., 1982a) porque en el estudio de estados estacionarios no se requerían altas velocidades de registro.

La sigmoidicidad inicial hizo que la primera porción de la curva de generación de calor no se ajustara a la función originalmente descrita para el calorímetro en estado estacionario ( $\dot{H}_t = \dot{H}_o \cdot [1 - e^{-\mu \cdot t}]$  donde  $\mu$  representa la constante de enfriamiento del sistema) (Ponce-Hornos y col., 1982a). En cambio, el registro térmico con sigmoidicidad inicial fue bien representado por una función difusional análoga a las ecuaciones desarrolladas por Crank para la difusión de materia (Crank, 1956). Estas ecuaciones



*FIGURA 5: Digitalización del registro calorimétrico obtenido por disipación de un potencia constante y conocida en la cámara interna del sistema. (-) disipación mantenida; (o) disipación interrumpida. La flecha indica la finalización de la aplicación. En el recuadro se muestra la sigmoide inicial.*

fueron derivadas a partir de las ecuaciones de Fourier para conducción de calor y consideran una demora exponencial por falta de instantaneidad en el proceso (Crank, 1956). En cuanto a la geometría del sistema generador de calor, el hecho de que el corazón sea hueco, descartó las geometrías compactas de difusión radial (tanto esfera como cilindro). Sus paredes musculares se ubican dentro de la cámara interna del calorímetro, en contacto con las dos láminas cerámicas, paralelas entre sí que aíslan eléctricamente a las unidades termosensibles. Por lo tanto, la geometría más parecida sería la de dos láminas planas que corresponderían a las dos porciones de las paredes del ventrículo en contacto con cada una de las dos unidades termosensibles enfrentadas paralelamente. El registro calorimétrico obtenido por aplicación de una potencia constante que disipa calor fue ajustado por un método no lineal a una ecuación de tipo difusional (Ecuación 6) para lámina plana con retardo exponencial en la detección por parte de las unidades termosensibles (Crank, 1956):

$$\dot{H}_t = \dot{H}_0 \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \quad (6)$$

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 de las unidades termosensibles

$\beta$  = constante de retardo en la difusión

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

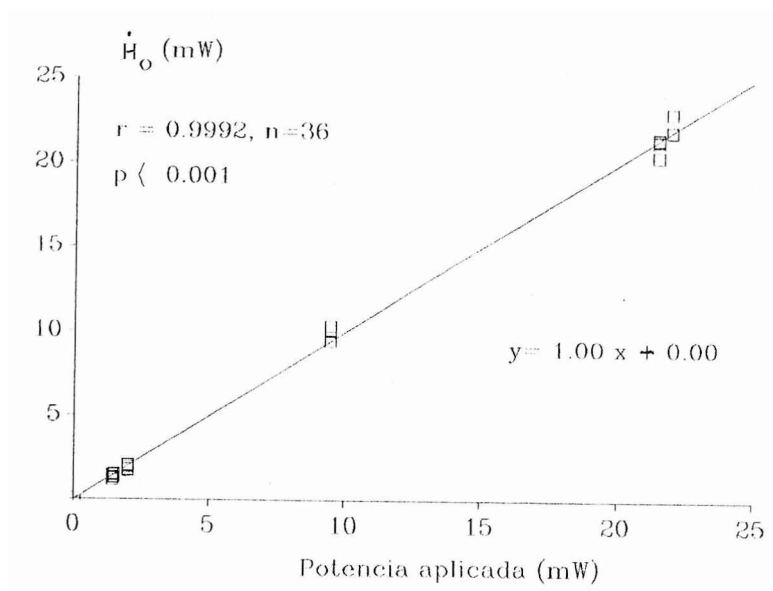
$$\alpha_i = (2 \cdot i + 1)^2 \cdot \mu$$

De la Ec. 6 surge que para un tiempo prolongado de estimulación (estado estacionario)  $\dot{H}_t$  tiende a  $\dot{H}_0$ , que es la potencia constantemente aplicada, de acuerdo al comportamiento descrito originalmente (Ponce Hornos y col., 1982a). Los valores de  $\beta$  y  $\mu$  variaron principalmente con el flujo de perfusión (rango de 0.02 a 0.04 s<sup>-1</sup> para  $\mu$  y 0.3 a 0.6 s<sup>-1</sup> para  $\beta$ ) siendo ambos reproducibles para una dada



condición. Además, el parámetro de retardo difusional ( $\beta$ ) pudo ser modificado, independientemente de la constante de integración  $\mu$ . Esto se hizo variando el "camino" de conducción del calor generado mediante pasta de alta conductividad colocada entre la resistencia que disipa calor y las unidades termosensibles (con lo que se obtuvo un valor de  $\beta=45 \text{ s}^{-1}$ ) o variando la geometría de la resistencia que disipa calor.

La validez de la función dada por la Ec. 6 fue comprobada mediante la estimación de la potencia aplicada ( $\dot{H}_o$ ) por ajuste matemático de los registros calorimétricos obtenidos al disipar una potencia constante y conocida. Esta fue aplicada a través de resistencias eléctricas o de cuatro músculos perfundidos colocados dentro de la cámara interna. La duración del estímulo eléctrico aplicado varió desde los 40 ms hasta los 150 s. Cuando el tiempo de disipación de calor fue de alrededor de cinco  $t_{1/2}$  de enfriamiento calorimétrico se registró una meseta. Los registros fueron efectuados a altas sensibilidades y velocidades de papel con intervalos de muestreo de 0.02 a 0.04 s. Cada curva fue ajustada hasta el tiempo en que cesó la aplicación del estímulo. Posteriormente, se efectuaron varios ajustes de cada registro considerando tiempos de finalización del mismo progresivamente inferiores, hasta llegar a curvas de alrededor de 200 ms. Los coeficientes de correlación para el ajuste no lineal de las curvas variaron entre 0.9992 y 0.8200 para un número de puntos comprendido entre 6 y 107, todos  $p < 0.05$ . Para cada registro se obtuvo un conjunto de  $\dot{H}_o$  que, cuando se analizaron versus la potencia aplicada mostraron correlacionarse entre sí con un excelente coeficiente  $r = 0.9992$ . La pendiente de la recta obtenida fue no significativamente diferente de uno ( $1.003 \pm 0.007$ ) y la ordenada al origen fue no diferente de cero ( $0.006 \pm 0.354 \text{ mW}$ ) para  $n=36$ ,  $p < 0.001$  (Fig. 6). Esto indica que, ya sea cuando se consideraron todos los puntos del registro hasta el estado estacionario o cuando sólo se ajustó el inicio de la curva, es posible estimar la potencia o flujo de calor aplicado. En consecuencia, no es necesaria la totalidad de una curva de generación para evaluar el flujo de calor que llega a las unidades



**FIGURA 6:** Correlación entre el flujo de calor estimado por el ajuste del registro calorimétrico con la Ec. 6 ( $\dot{H}_o$ ) y la potencia aplicada.

termosensibles. La excelente correlación de  $\dot{H}_o$  vs. potencia aplicada pudo ser mantenida hasta en ajustes de inicios de curva tan pequeños como 0.2 a 0.4 s, dependiendo del número de puntos considerados.

Cuando la disipación de calor se interrumpe tempranamente (curva -o- de la Fig. 5) las unidades termosensibles siguen registrando el calor liberado aún después de la finalización de la generación (flecha). El registro de calor continúa hasta llegar a un máximo en un tiempo determinado que se denominó tiempo pico (tp). Luego, el registro desciende hasta la línea de base siguiendo una función que surge de la adaptación de la Ec. 6 difusional a un proceso de enfriamiento (Ec. 7):

$$\dot{H}_t = \dot{H}_{tp} \cdot (A_o \cdot e^{-0.1-8 \cdot \pi^2 \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}}) \quad (7)$$

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

$\mu$  = constante de velocidad de enfriamiento de las unidades termosensibles

$\beta$  = constante de retardo en la difusión

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

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

La aplicación de la función dada por la Ec. 6 a toda la curva de ascenso hasta el tp condujo a subestimaciones de la potencia aplicada. Sin embargo, el período comprendido únicamente durante la generación de calor (hasta la flecha) reprodujo la potencia aplicada al ser ajustado por la Ec. 6. Esto implica que para analizar la respuesta calorimétrica transitoria de un proceso debería conocerse el tiempo de duración del mismo. Para el caso de los eventos asociados a una contracción muscular ese tiempo es una de las incógnitas. En consecuencia, se analizó la función que representa al registro hasta un punto de referencia como es el máximo de la curva. El alejamiento de la curva de calor transitoria respecto

de la estacionaria (Fig. 5) pudo ser representado por la función de generación a la cual se le sustrajo una fracción proporcional a lo que se genera a cada tiempo. Así resulta:

$$\dot{H}_t = \dot{H}_o \cdot (1-D) - \dot{H}_o \cdot (1-D) \cdot [1 - e^{-(\tau \cdot t)}]$$

donde, para simplificar la ecuación, D representa:

$$D = [A_0 \cdot e^{-\theta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}]$$

y  $\tau$  es un parámetro de ajuste.

Simplificando:

$$\dot{H}_t = \dot{H}_o \cdot (1-D) \cdot e^{-(\tau \cdot t)} \quad (8)$$

Los registros de calor obtenidos a partir de la aplicación transitoria de cantidades conocidas de energía sobre resistencias o músculos fueron ajustados hasta los respectivos  $t_p$  con la Ec. 8. Se obtuvieron correlaciones de ajuste no lineal con  $r > 0.998$  para  $n > 80$  ( $p < 0.001$ ). El parámetro  $\tau$  de la Ec. 8 tendió a 0 cuando la generación de calor fue mantenida durante tiempos prolongados (meseta de la Fig. 5) y aumentó con la disminución del tiempo pico en las generaciones transitorias.

### 3. Cuantificación de la energía liberada dentro del calorímetro

En cualquier registro calorimétrico, la energía recibida por el calorímetro está determinada por el área debajo de la curva de generación y enfriamiento (Ponce-Hornos y col., 1982a). Contando sólo

con la función de generación transitoria hasta el  $t_p$ , se ha calculado analíticamente el área delimitada por la curva de generación desde  $t=0$  hasta el  $t_p$  (función que sigue la Ec. 8) y la curva de enfriamiento calorimétrico (que sigue la función dada por la Ec. 7). La energía total disipada en forma de calor por una generación simple dentro de la cámara interna del sistema calorimétrico pudo calcularse mediante la siguiente suma de integrales:

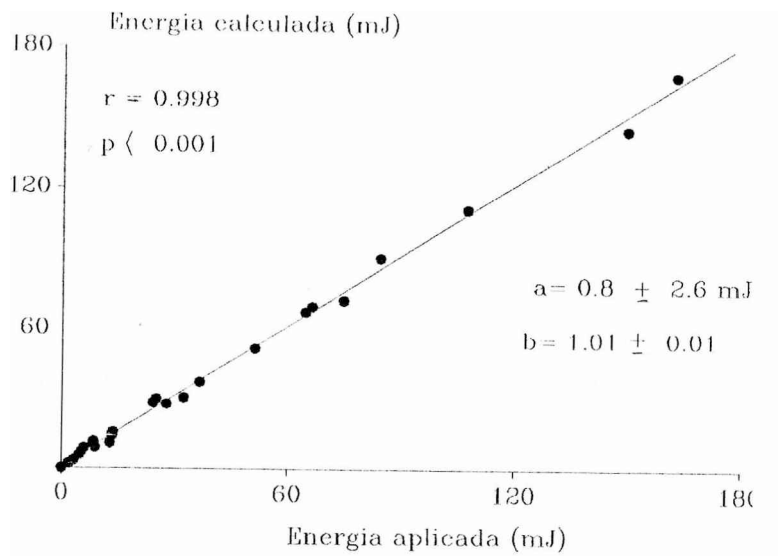
$$H = \int_{t=0}^{t_p} \dot{H}_g \cdot (1 - A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) + \int_{t_p}^{\infty} \dot{H}_p \cdot (A_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-\alpha_i \cdot t}) \quad (9)$$

cuya resolución es:

$$H = H_g \cdot \left\{ [1 - e^{-(\tau \cdot t_p)}] / \tau - A_0 \cdot \{1 - e^{-(\beta + \tau) \cdot t_p}\} / (\beta + \tau) - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=1}^{\infty} A_i \cdot \{1 - e^{-(\alpha_i + \tau) \cdot t_p}\} / (\alpha_i + \tau) \right\} +$$

$$+ [1 - A_0 \cdot e^{-(\beta \cdot t_p)} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=1}^{\infty} A_i \cdot e^{-(\alpha_i \cdot t_p)}] \cdot (A_0 \cdot \beta^{-1} + 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=1}^{\infty} A_i / \alpha_i) \quad (10)$$

Las energías calculadas de este modo se correlacionaron linealmente con las energías liberadas dentro de la cámara cuando se aplicaron potencias conocidas sobre las resistencias eléctricas o músculos. Se obtuvo una correlación altamente significativa ( $r=0.9979$ ,  $p<0.001$ ) entre energía estimada y energía entregada, con pendiente no diferente de uno ( $1.01 \pm 0.01$ ) y ordenada al origen no diferente de cero ( $0.8 \pm 2.6$  mJ) (Fig. 7). En el caso de la aplicación de pulsos cortos (4 s) de potencia linealmente creciente, la energía calculada según la Ec. 10 también reprodujo satisfactoriamente a la energía aplicada ( $99.9 \pm 1.0$  %,  $n=4$ ).



**FIGURA 7:** Energía estimada (calculada mediante la Ecuación 10) vs Energía aplicada a la cámara interna del sistema calorimétrico utilizado (a: Ordenada al origen, b: pendiente).

#### 4. Respuesta calorimétrica a la aplicación simultánea de varias fuentes de energía

Con el fin de determinar si el mismo tipo de análisis de respuestas simples podía ser aplicado a la respuesta miotérmica que posee varios componentes, dos tipos de simulaciones fueron analizados. El primero consistió en la aplicación sobre una resistencia superfundida a 4 ml/min de tres potencias constantes y provenientes de diferentes fuentes D.C. Todas comenzaron simultáneamente pero finalizaron a diferentes tiempos (duraciones variables desde décimas de s hasta más de 20 s). Las respuestas obtenidas fueron ajustadas hasta el comienzo de su enfriamiento final (que sigue la función dada por la Ec. 7) a una combinación lineal de 2 o 3 términos dados por la Ec. 8. Se desconocía cuál había sido el tiempo de aplicación de cada fuente en cada simulación. Tanto para la aplicación de 2 como de 3 fuentes, los coeficientes de correlación de los ajustes fueron  $r > 0.988$  para más de 230 puntos ( $p < 0.001$ ). Independientemente de ello, en todos los casos el ajuste a 3 componentes fue significativamente mejor que el de 2 componentes (prueba de Fisher para varianzas,  $p < 0.05$ ). La estimación de la energía aplicada, como suma de las energías calculadas para cada componente ajustado no se diferenció del área debajo de la curva de generación y enfriamiento. Estos datos fueron incluidos en la correlación de la Fig. 7.

El segundo tipo de simulación de respuesta a múltiples fuentes de energía consistió en el ajuste de una función teórica generada como una combinación lineal de 4 términos (3 de generación transitoria y uno estacionaria) dados por la Ec. 8. Los puntos teóricos fueron calculados a intervalos de 50 ms y se agregaron errores al azar de  $\pm 5$  y  $\pm 10$  % (Dixon y Massey, 1969). Las curvas generadas fueron ajustadas a una combinación lineal de "n" funciones dadas por la Ec. 8, sin conocer previamente de qué provenían las curvas ni cuál era el "n". En todos los casos, el mínimo número de componentes requerido para el ajuste ("n") coincidió con el número de componentes con que la curva fue generada. La diferencia promedio entre los parámetros obtenidos en el ajuste y los utilizados en la generación de la

curva resultó no diferente de cero ( $2.2 \pm 4.6 \%$ ,  $n=14$ , NS).

Para probar el grado de resolución del sistema calorimétrico en la detección de inicios demorados de los distintos componentes energéticos, se aplicaron 2 estímulos pareados de igual potencia sobre una resistencia eléctrica separados por 2 o por 200 ms. No se encontraron diferencias entre ambos registros de generación de calor, lo cual implica que el calorímetro no distingue desfasajes entre la iniciación de dos eventos que se encuentren en ese rango.

Los resultados indican que el ajuste a una combinación lineal de términos dados por la Ec. 8 es capaz de representar el número de componentes simples aplicados en una respuesta miotérmica compleja. Diversas formas de pulsos cortos de calor o posibles inicios desfasados hasta en 200 ms en la generación de más de un componente son no distinguibles por el calorímetro. La suma de las energías de los componentes (calculadas a partir de los parámetros de ajuste hasta el  $t_p$ ) representa a la energía total liberada en la cámara interna del calorímetro (área bajo la curva total de generación y enfriamiento).

##### 5. Liberación creciente de calor durante períodos prolongados

El crecimiento de la respuesta calorimétrica a tiempos superiores al de integración sucede sólo si el flujo de calor liberado no es constante y crece con el tiempo. Para poder estudiar situaciones de este tipo fueron analizadas las respuestas calorimétricas a la aplicación de potencias eléctricas crecientes en resistencias colocadas en el interior del calorímetro. La potencia fue aplicada según dos funciones de crecimiento, lineal y exponencial respectivamente. En ambos casos se conocían las velocidades de aumento y la potencia máxima aplicada. Cada tipo de registro calorimétrico fue ajustado hasta el inicio del enfriamiento del sistema mediante la correspondiente función difusional de crecimiento lineal (Ec. 11) o exponencial (Ec. 12), respectivamente:



$$\dot{H}_t = k \cdot [1 - A_0 \cdot e^{-(\beta \cdot t)} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-(\alpha_i \cdot t)}] \cdot t \quad (11)$$

y:

$$\dot{H}_t = \dot{H}_{max} \cdot [1 - A_0 \cdot e^{-(\beta \cdot t)} - 8 \cdot \pi^{-2} \cdot \sum_{i=0}^{\infty} A_i \cdot e^{-(\alpha_i \cdot t)}] \cdot (1 - e^{-(\phi \cdot t)}) \quad (12)$$

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 de las unidades termosensibles

$\beta$  = constante de retardo en la difusión

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

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

$k$  = constante lineal de aumento de la potencia vs. tiempo

$\phi$  = constante exponencial de aumento de la potencia vs. tiempo

$\dot{H}_{max}$  = máxima potencia aplicada

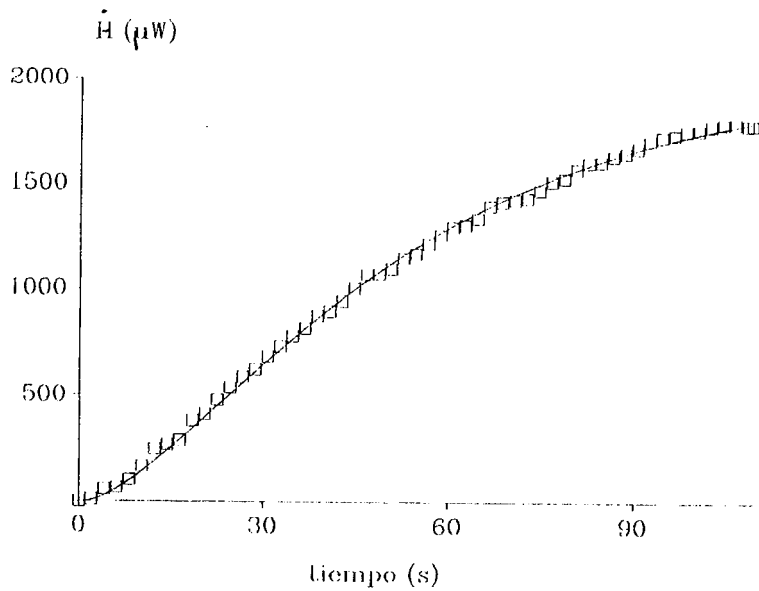
Cuando el registro de generación linealmente creciente se ajustó mediante la Ec. 11, el parámetro de ajuste lineal ( $k$ ) reprodujo en un  $103 \pm 4$  % ( $n=4$ ) a la velocidad de aumento lineal de la potencia aplicada, aún cuando se consideraron períodos de la curva inferiores al tiempo total de generación (entre 20 y 110 s). Para comprobar si la misma curva puede ser representada por otra función difusional (de potencia constante o creciente exponencialmente) se ajustó el registro mediante la Ec. 6 o la Ec. 12, respectivamente. La bondad del ajuste a la función de generación constante (Ec. 6) fue significativamente menor que la del ajuste a la función linealmente creciente (en 4 registros: prueba de varianzas de Fisher  $p < 0.01$ ). La aplicación al mismo registro de la función para flujo exponencialmente creciente (Ec. 12)

rindió ajustes que, si bien fueron satisfactorios, proporcionaron estimaciones de  $\dot{H}_{max}$  y  $\phi$  variables con la duración del período de la curva considerado.

Cuando la potencia se aplicó según una función exponencialmente creciente (Fig. 8), el ajuste del registro mediante la Ec. 12 reprodujo en los parámetros  $\dot{H}_{max}$  y  $\phi$  a la máxima potencia aplicada y a su velocidad de aumento exponencial, respectivamente (en promedio:  $97.1 \pm 8.4 \%$ ,  $n=8$ ). Los parámetros de ajuste fueron independientes del período del registro analizado, entre 10 y 300 s. La aplicación al mismo registro de la función para flujo de calor constante (Ec. 6) rindió ajustes cuya bondad fue significativamente inferior a la de los obtenidos por aplicación de la Ec. 12 (en 4 registros: prueba de varianzas de Fisher  $p < 0.01$ ). Asimismo, cuando se utilizó la Ec. 11 para flujo linealmente creciente, la bondad de los ajustes fue inferior (prueba de Fisher  $p < 0.05$ ) o similar (analizando períodos de la curva hasta los 60 s) a aquella obtenida por aplicación de la Ec. 12. Sin embargo, aún cuando el ajuste fue satisfactorio, los parámetros obtenidos fueron dependientes del período de la curva considerado.

Por otra parte, cuando el registro calorimétrico de ambos tipos de calibraciones de potencia creciente se dividió punto a punto por la función difusional (segundo factor de la Ec. 6', que expresa la respuesta demorada del sistema) se obtuvo la potencia generada dentro de la cámara. Cada curva de generación representó unívocamente a la forma en que se había aplicado la potencia. Los parámetros de la correspondiente función de generación resultaron similares a los aplicados y a las estimaciones obtenidas mediante el ajuste del registro calorimétrico con la correspondiente función difusional.

En conclusión, el crecimiento de la respuesta calorimétrica a tiempos superiores al de integración pudo ser representado por funciones difusionales para flujo de calor, ya sea exponencial o linealmente creciente. La bondad del ajuste y la reproducibilidad de los parámetros al considerar variables períodos del registro permiten diferenciar entre sí la generación de un flujo de calor constante, linealmente



**FIGURA 8:** Disipación de calor por aplicación durante 100 s de una potencia exponencialmente creciente sobre una resistencia eléctrica ( $\equiv$ ). La línea entera corresponde a su función de ajuste según la Ec. 12.  $\dot{H}_{\max} = 2036 \pm 14 \mu\text{W}$ , constante  $\phi = 0.0237 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$ ,  $r = 0.9993$ ;  $\dot{H}_{\max \text{ aplicado}} = 2000 \mu\text{W}$ .

creciente y exponencialmente creciente.

## 6. Conclusiones

a) El análisis de la respuesta calorimétrica permite cuantificar generaciones de calor estacionarias o transitorias (aquéllas cuya generación finaliza a un tiempo inferior al  $t_{1/2}$  de enfriamiento calorimétrico). Es posible estimar la potencia o flujo de calor de una fuente mientras se está generando, aún contando con sólo los primeros 200 ms del registro calorimétrico.

b) La energía liberada en un componente simple, ya sea estacionario o transitorio, puede estimarse a partir de la suma de la integración de las funciones difusionales de generación y de enfriamiento calorimétrico, independientemente de la forma del pulso de calor.

c) En una respuesta calorimétrica generada por dos o más fuentes aplicadas simultáneamente con diferentes tiempos de desactivación el análisis estima el mismo número de componentes simples que se aplicó. La respuesta no distingue inicios demorados en tiempos cercanos a 200 ms. La suma de las energías calculadas para los componentes individuales es similar a la energía total liberada dentro de la cámara.

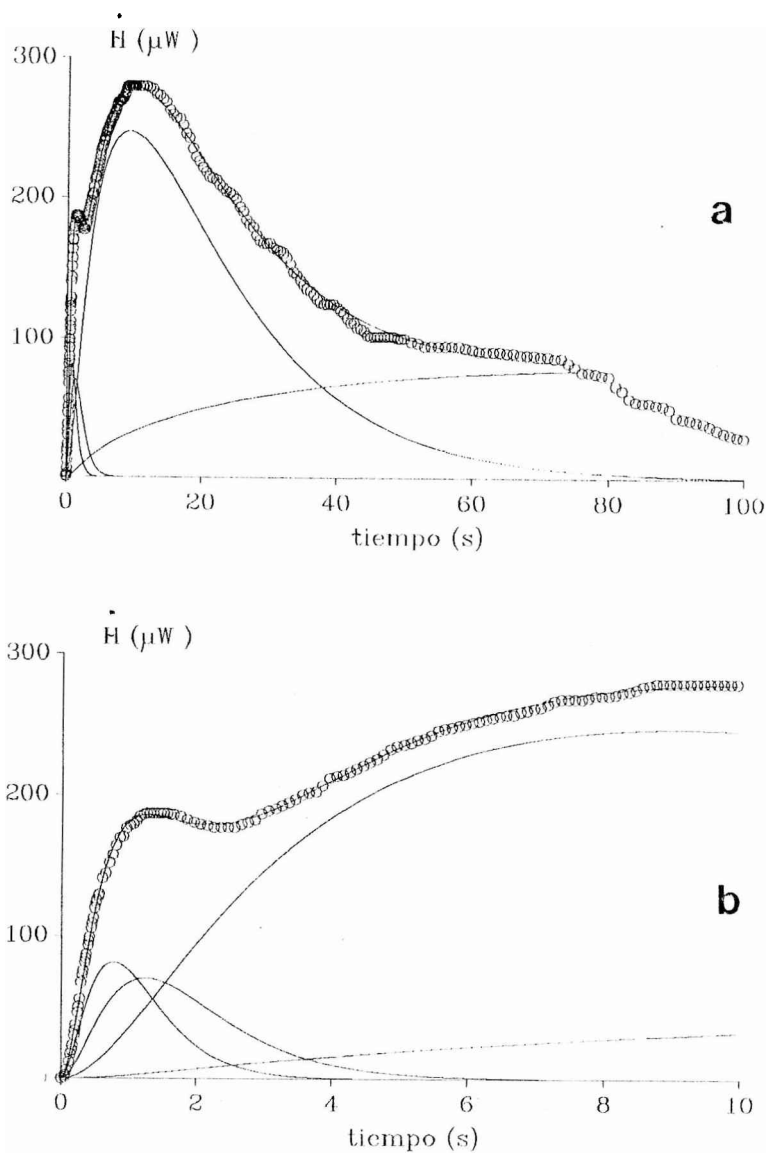
d) La generación de calor creciente, evidenciada por una respuesta calorimétrica creciente a tiempos superiores al de integración, puede ser caracterizada cinéticamente mediante el ajuste con funciones difusionales. Los ajustes distinguen entre sí a un flujo de calor lineal o exponencialmente creciente. A partir de los parámetros de ajuste es posible estimar tanto el flujo de calor asintótico como las velocidades de aumento exponencial o lineal del flujo de calor.

## Capítulo 8: Diferenciación de componentes energéticos en un latido cardíaco

### 1. Ajuste simultáneo de componentes y cálculo de energías

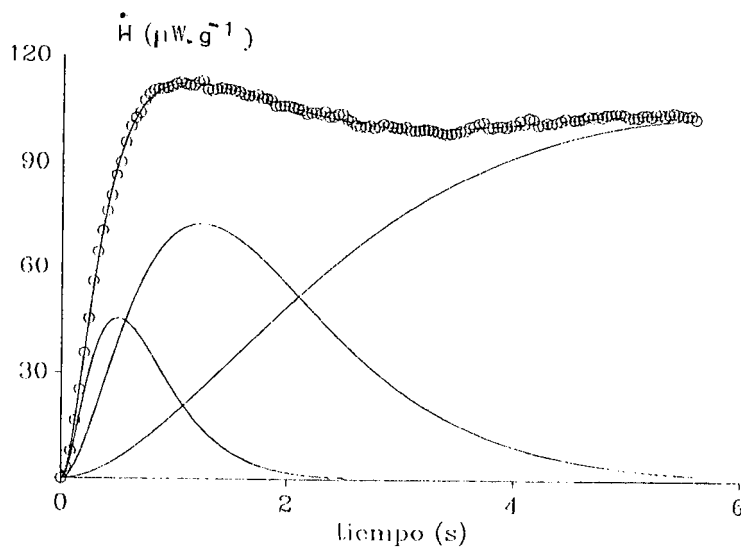
Establecido el patrón de respuesta del sistema calorimétrico para generaciones simples, tanto estacionarias como transitorias, se ajustaron las respuestas miotérmicas obtenidas con latidos, tanto aislados como en estado estacionario (Figs. 9 y 10). Ambos registros de calor pudieron ser ajustados a una combinación lineal de funciones del tipo dado por la Ec. 8. El análisis asume que todos los componentes de generación de calor se inician simultáneamente a tiempo cero. Esta es la suposición más simple que puede hacerse al desconocer la secuencia y/o superposición temporal de eventos en el músculo. Como se describió en el capítulo anterior, el sistema no diferencia entre generaciones simples demoradas en 2 o en 200 ms, tiempo en el que seguramente ocurren varios eventos celulares durante la contracción muscular. Los diversos componentes difirieron en sus tiempos pico, que están delimitados por los cambios de pendiente del registro.

Los registros miotérmicos de los latidos aislados (Figs. 3 y 9) culminan en una meseta que se mantiene hasta alrededor de los 80 a 150 s ( $99 \pm 18$  s) e indica generación de calor mantenida y constante. Concluida esa meseta la producción de calor se interrumpiría, ya que sólo se registra el enfriamiento del sistema hasta el nivel dado por el metabolismo de reposo. Este tramo del registro sigue el comportamiento descrito por la Ec. 7 con constantes de velocidad de enfriamiento ( $\mu$ ) y de retardo ( $\beta$ ). Los parámetros  $\mu$  y  $\beta$  fueron estimados en cada músculo ajustando los enfriamientos calorimétricos posteriores a la aplicación mantenida de una onda sinusoidal de alta frecuencia (que no estimula al músculo). El  $\mu$  de enfriamiento del registro miotérmico de un latido aislado resultó comparable al  $\mu$  estimado en la calibración realizada sobre el músculo. Los diversos  $\mu$  ajustados resultaron similares al determinado por calibración de las unidades termosensibles con resistencia eléctrica ( $0.030 \pm 0.002$  s<sup>-1</sup>).



**FIGURA 9:** *a-* Registro digitalizado de la producción de calor del latido aislado mostrado en la Fig. 3 con los cuatro componentes ajustados según la Ec. 8 hasta el inicio del enfriamiento final del sistema. En todos los casos  $r > 0.997$  para  $n > 117$ .

*b-* Primeros 10 segundos del registro presentado en (a) con los cuatro componentes ajustados.



**FIGURA 10:** Registro digitalizado de la producción de calor de un latido proveniente de un tren estacionario de estímulos (ver Fig. 4 y texto). Se muestran los tres componentes ajustados según la Ec. 8. En todos los casos,  $r > 0.995$  para  $n > 95$ .

La curva total del registro miotérmico de un latido aislado se ajustó hasta el comienzo del enfriamiento final. Dado que la generación de calor culmina en una meseta, el último componente energético exhibió un  $\tau=0$  (ver Ec. 8). Su correspondiente  $\dot{H}_o$  ajustado representa al flujo de calor liberado y efectivamente registrado después de alrededor de cinco  $t_{1/2}$ .

Los registros de calor de latidos aislados fueron ajustados a una combinación lineal de 2, 3, 4 y 5 componentes en cada caso. Sin embargo, en todos los registros, las varianzas de los ajustes con 2 o 3 componentes fueron superiores a las del ajuste con 4 componentes (prueba de Fisher,  $p<0.05$  para  $n>130$  en 9 latidos). En cambio, las varianzas del ajuste a 5 componentes resultaron NS diferentes de las del ajuste a 4 componentes. Por lo tanto, la liberación de calor de un latido aislado pudo dividirse en cuatro componentes (Fig. 9).

En el estado estacionario, la generación de calor de un latido individual se adiciona a la pendiente de caída del registro de calor del latido previo (Fig. 4a). Para estimar la línea de base del registro miotérmico de un latido estacionario, se suspendió la estimulación y se registró la señal calorimétrica resultante. La curva miotérmica desciende hasta alcanzar la meseta de flujo de calor de reposo ( $H_r$ ) (Fig. 4a). El trazado descendente se trasladó como línea de base del registro miotérmico del latido estacionario a analizar (Fig. 4b). La curva miotérmica resultante, que indica la contribución de un único latido estacionario (Fig. 10), pudo ser ajustada a tres componentes del tipo de la Ec. 8 (prueba de Fisher,  $p<0.05$  entre las varianzas de los ajustes con 2 y con 3 componentes, y NS entre las varianzas de ajustes con 3 y con 4 componentes).

Los componentes energéticos del registro miotérmico de un latido fueron denominados H1, H2, H3 y H4 de acuerdo a la secuencia en sus tiempos de evolución máxima ( $t_p$ ). Los tres primeros componentes tuvieron  $t_p$  respectivamente similares en el latido aislado y en el estacionario, por lo cual se los denominó igual en ambos casos.



## 2. Magnitudes de los cuatro componentes energéticos de un latido

Los corazones perfundidos y estabilizados en el interior del calorímetro exhibieron un flujo de calor de reposo de  $4.1 \pm 0.2 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $n=36$ ) después de un mínimo de 20 minutos en ausencia de estimulación. En la Tabla 1 pueden observarse el calor por latido ( $H_a$ ) y las energías de los cuatro componentes, tanto de un latido aislado como de uno proveniente de un tren de estímulos estacionario a 0.16 Hz, en condición control de 7 mM K y 0.5 mM Ca. Las energías asociadas a cada componente se estimaron a partir de la integración de las respectivas funciones de generación obtenidas por el ajuste simultáneo de componentes del registro total (Ec. 10).

Como se desprende de la Tabla 1, el calor total del latido aislado resulta superior al del tren estacionario. En parte esto es debido a que el latido aislado desarrolla una presión intraventricular isovolumétrica ( $P$ ) mayor que la del latido proveniente del tren estacionario ( $42.7 \pm 2.6$  vs  $25.8 \pm 1.7 \text{ mN}\cdot\text{mm}^2$ , respectivamente). Otro factor que determina la diferencia de calor total entre ambas clases de latido es la energía de H4. Este componente es distinguible en el ajuste del registro miotérmico del latido aislado (representando alrededor del 50 % del mismo) y no es distinguible en el ajuste de la curva de calor del latido estacionario. Sin embargo, la existencia de una cuarta fracción de calor en latidos estacionarios se reveló por una diferencia entre el calor total por latido ( $H_a = (\dot{H}_t - \dot{H}_e)/f$ , siendo  $f$ = frecuencia de estimulación) y la suma de las energías de los tres componentes ajustados en un latido individual (Tabla 1). Esta fracción representa sólo un 15% del calor total del latido estacionario y la denominaremos "fracción suprabasal" (FSB) (Tabla 1).

El único componente energético que se mantiene durante un período suficiente para la integración de la respuesta calorimétrica es H4 del latido aislado. Por lo tanto es el único del cual, asumiendo liberación de calor constante, puede estimarse la potencia o flujo de calor mediante el  $\dot{H}_e$  de ajuste (Tabla 1). Puede apreciarse en la Tabla 1 que la energía de la FSB del latido estacionario resulta inferior a H4

del latido aislado ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el flujo de calor de la FSB del latido estacionario (estimado como  $\dot{H}_{FSB} = FSB \cdot f$ ) resulta superior al  $\dot{H}_a$  del latido aislado ( $p < 0.001$ ) (Tabla 1). En el siguiente capítulo se analizarán estas diferencias y la posible vinculación entre ambos componentes (H4 del latido aislado y la FSB del latido estacionario).

TABLA 1

Energías de los componentes de calor de un latido en estado estacionario y de un latido aislado.

	Latido estacionario (n= 20)	Latido aislado (n= 16)	
Ha (mJ.g <sup>-1</sup> )	14.2 ± 0.9	30.7 ± 3.5	p < 0.005
H1 (mJ.g <sup>-1</sup> )	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.3	NS
H2 (mJ.g <sup>-1</sup> )	3.2 ± 0.4	2.3 ± 0.3	NS
H3 (mJ.g <sup>-1</sup> )	6.3 ± 0.5	9.1 ± 0.7	p < 0.005
H4 (mJ.g <sup>-1</sup> )		16.7 ± 1.6	
FSB (mJ.g <sup>-1</sup> )#	2.7 ± 0.6		
$\dot{H}_a$ (μW.g <sup>-1</sup> )		183 ± 24	
$\dot{H}_{FSB}$ (μW.g <sup>-1</sup> )#	450 ± 103		

Los datos representan valores medios ± ESM. Se denomina  $H_i$  a la energía de un dado componente  $i$  (en mJ.g<sup>-1</sup>) y  $\dot{H}_i$  a la potencia o flujo de calor del mismo (μW.g<sup>-1</sup>). #: Valores calculados a partir de la diferencia ( $H_a - [H1 + H2 + H3]$ ) y la frecuencia de estimulación (ver texto).

\*:  $p < 0.05$  entre sí, \*\*:  $p < 0.001$  entre sí.

### 3. Conclusiones

a) La liberación de calor de un latido es una función compleja, compuesta por cuatro componentes distinguibles en el caso de un latido aislado y tres componentes distinguibles en el caso de

la liberación de calor de cada latido en condiciones de estimulación estacionaria.

b) La existencia de una cuarta fracción de calor en el latido estacionario se manifiesta por la diferencia entre el calor total por latido y la suma de las energías de los tres componentes distinguibles en el ajuste.

#### 4. Hipótesis a evaluar

El siguiente paso consiste en establecer si este método de diferenciación de componentes de calor de un latido con generación de fuerza es capaz de distinguir energías que provienen de distinto origen celular. Por ello, debería ser posible caracterizar a dichos componentes por sus magnitudes y sus respectivas vinculaciones con determinados procesos celulares participantes en el ciclo contracción-relajación.

## Capítulo 9: Caracterización de los componentes energéticos de un latido

### 1. Dependencia de los componentes energéticos con la fuerza desarrollada

La caracterización de cada componente energético de un latido requiere de protocolos en los que se pueda afectar lo más selectivamente posible a los diferentes eventos.

La clásica división conceptual de los componentes energéticos de un latido define al "calor dependiente de tensión" (o fuerza desarrollada) y al "calor independiente de tensión". Por lo tanto, se analizó si cada uno de los cuatro componentes energéticos de una contracción era dependiente del desarrollo de fuerza. Se analizó tanto la dependencia respecto de la máxima presión intraventricular desarrollada (P) como del mantenimiento de dicha presión durante todo el ciclo contracción-relajación (integral presión-tiempo: IPT). El primero, el segundo y el cuarto componentes de calor resultaron independientes de P y de IPT, tanto en latidos aislados como en los del tren estacionario. Los coeficientes de correlación (r) de dichas energías vs. P y vs. IPT resultaron respectivamente de 0.04 y 0.06 para H1, de 0.22 y 0.05 para H2 (en cada caso n= 36, NS) y de 0.19 y 0.19 para H4 (n=16 latidos aislados, ambos NS). Para H1 y H2 se consideró aislados más estacionarios en conjunto pues por separado tampoco exhibieron correlación ni diferencias en sus promedios (Tabla 1). En el caso de H4 sólo se consideraron los latidos aislados, pues este componente no fue distinguible en el ajuste de la curva miotérmica de un latido estacionario.

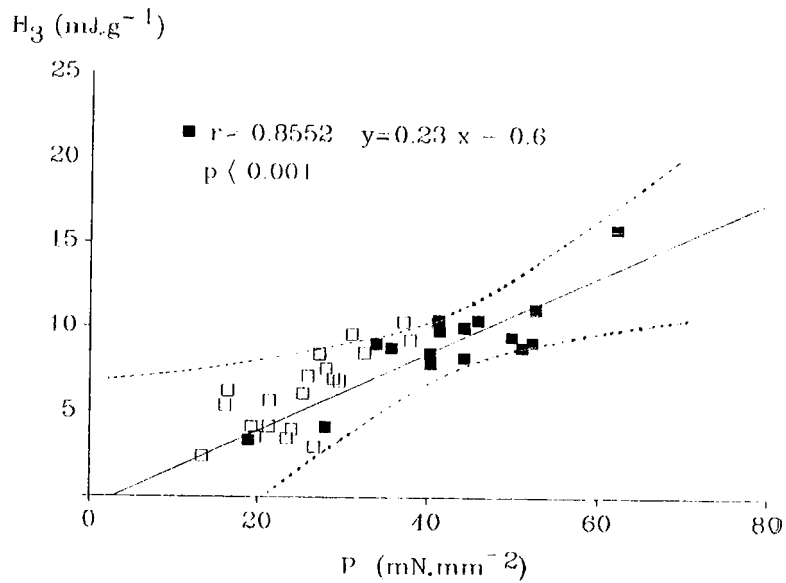
La energía del tercer componente (H3) se correlacionó linealmente con P tanto en latidos aislados ( $r=0.8552$ ) como en estacionarios ( $r= 0.8221$ ). La pendiente de la correlación H3 vs. P de los latidos aislados resultó de  $0.228 \pm 0.037 \text{ mJ.mN}^{-1}.\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$  y la ordenada al origen fue no significativamente diferente de cero ( $-0.6 \pm 1.5 \text{ mJ.g}^{-1}$ ). Los puntos de H3 vs. P correspondientes a los latidos

estacionarios cayeron dentro del intervalo de confianza de los aislados y no hubo diferencias entre ambas correlaciones (Figura 11). En ambos tipos de latidos, también H3 fue el único componente que se correlacionó con el mantenimiento de la fuerza (IPt) ( $r=0.748$ ,  $p<0.001$ ) y con la máxima velocidad de contracción (+P) ( $r=0.743$ ,  $p<0.001$ ). Estos resultados indican que el tercer componente energético sería el "calor dependiente del desarrollo de fuerza", mientras primero, segundo y cuarto componentes constituyen diversas fracciones que serían independientes de que se genere fuerza.

## 2. Dependencia aeróbica de los componentes energéticos

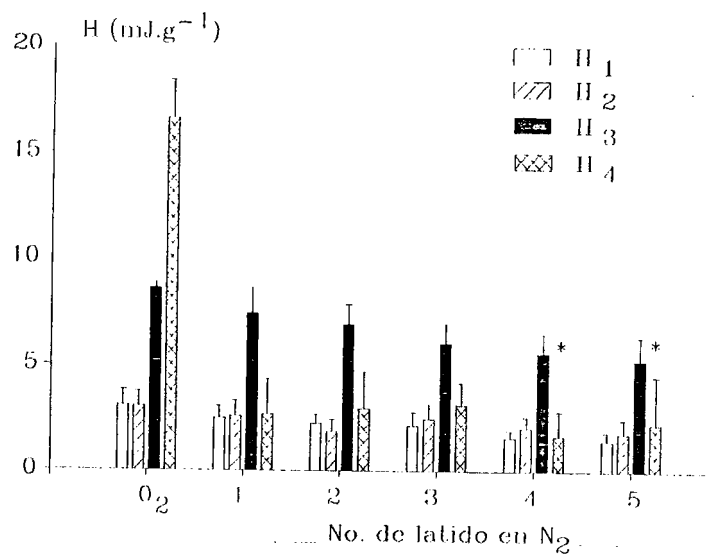
La utilización de compuestos fosfato de alta energía por el músculo en eventos como el acoplamiento actomiosínico o la remoción del Ca citosólico, requiere la resíntesis de los mismos. La liberación de calor que acompaña a la resíntesis del ATP consumido constituye el "calor de recuperación". Debido a que en el músculo cardíaco el ATP consumido debe resintetizarse antes del siguiente latido, la fracción de calor asociada a esa recuperación debería estar contenida en alguno de los componentes energéticos del latido. La magnitud del calor de recuperación metabólica aeróbica puede determinarse a través de los cambios en el calor por unidad de fuerza desde las condiciones aeróbicas a las anaeróbicas.

La participación de la recuperación metabólica aeróbica del ATP consumido en un latido se evaluó mediante los cambios producidos por el reemplazo del O<sub>2</sub> del medio de perfusión por N<sub>2</sub>. En 4 ventrículos estabilizados en Krebs normal (7 mM K y 0.5 mM Ca burbujeado con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) se efectuaron latidos aislados. Luego se reemplazó el medio de perfusión por un Krebs similar en composición pero burbujeado con 95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> a pH constante. A partir de los 3 min del cambio se efectuaron 3 a 6 latidos aislados separados por 5 min, durante un período de aproximadamente 30



**FIGURA 11:** Correlación entre la energía del tercer componente ( $H_3$ ) y la máxima presión intraventricular desarrollada ( $P$ ) en latidos aislados ( $\blacksquare$ ) obtenidos en 7 mM K y 0.5 mM Ca. Se observa que los puntos correspondientes a los latidos de un tren estacionario ( $\square$ ) se distribuyen dentro del límite de confianza del 99% de los aislados.

min. A tiempos más prolongados el corazón desarrolló actividad espontánea, por lo que no se pudieron analizar latidos a tiempos más prolongados. El cambio a la perfusión burbujeada con N<sub>2</sub> disminuyó el calor de reposo de los ventrículos desde  $3.68 \pm 0.54 \text{ mW.g}^{-1}$  a  $2.68 \pm 0.37 \text{ mW.g}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). No se observaron modificaciones en la presión de reposo ni en los tiempos de contracción y relajación de los latidos. Tanto P como H1, H2 y H3 permanecieron constantes en el primer latido en hipoxia. P, H3 y, en menor proporción H1, disminuyeron muy gradualmente en los siguientes latidos hasta promedios no inferiores a un 64 % de los correspondientes al latido aislado en O<sub>2</sub> (Fig. 12). La tabla 2 muestra el análisis estadístico no-paramétrico a posteriori de rangos de Mann-Whitney aplicado a los resultados que se graficaron en forma paramétrica (como media  $\pm$  ESM) en la Fig. 12. La energía del cuarto componente (H4), en cambio, disminuyó a un 16 % del control en el primer latido efectuado en hipoxia y resultó estadísticamente no diferente de cero en el cuarto y quinto latidos (Fig. 12). La energía del tercer componente (H3) se correlacionó con P en los sucesivos latidos aislados hipóxicos de cada experimento, como ocurrió en presencia de O<sub>2</sub> (Fig. 13). El promedio de las pendientes de las correlaciones H3 vs. P obtenidas en N<sub>2</sub> ( $0.17 \pm 0.019 \text{ mJ.mN}^{-1}.\text{mm}^2.\text{g}^{-1}$ ) resultó un 74 % de la obtenida para los latidos aislados en O<sub>2</sub>. Las diferencias pareadas entre la relación H3/P desde la condición de presencia a la de ausencia de O<sub>2</sub> resultaron de  $-0.040 \pm 0.0066$  ( $p < 0.001$ ). Los resultados indican la dependencia del metabolismo aeróbico de dos de los componentes: H4 y, en menor grado, H3.



**FIGURA 12:** Energías de los cuatro componentes de calor producidos en latidos aislados en Krebs-7 mM K y 0.5 mM Ca en presencia de O<sub>2</sub> y en sucesivos latidos aislados hipóxicos (1 a 5). Barras indican media  $\pm$  ESM, n= 4. Ver análisis a posteriori en tabla 2.



TABLA 2

Comparación de los parámetros energéticos presentados en la Fig. 12a) H1: Análisis de varianza por rangos de Friedman:  $p < 0.001$ .

Análisis a posteriori:

	$Q_2$	N-1	N-2	N-3	N-4
N-1 I	NS				
N-2 I	NS	NS			
N-3 I	NS	NS	NS		
N-4 I	NS	NS	NS	NS	
N-5 I	*	NS	NS	NS	NS

b) H2: Análisis de varianza por rangos de Friedman: NS.

c) H3: Análisis de varianza por rangos de Friedman:  $p < 0.001$ .

Análisis a posteriori:

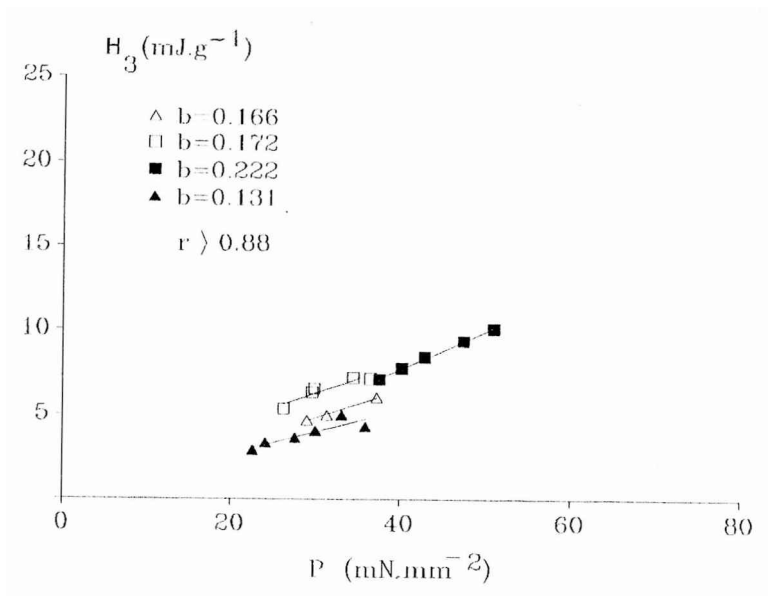
	$Q_2$	N-1	N-2	N-3	N-4
N-1 I	NS				
N-2 I	NS	NS			
N-3 I	*	NS	NS		
N-4 I	*	NS	NS	NS	
N-5 I	*	NS	NS	NS	NS

d) H4: Análisis de varianza por rangos de Friedman:  $p < 0.001$ .

Análisis a posteriori:

	$Q_2$	N-1	N-2	N-3	N-4
N-1 I	*				
N-2 I	*	NS			
N-3 I	*	NS	NS		
N-4 I	*	NS	NS	NS	
N-5 I	*	NS	NS	NS	NS

Análisis a posteriori por prueba de rangos de Mann-Whitney (Siegel, 1990). \*  $p < 0.05$ , NS: no significativo.



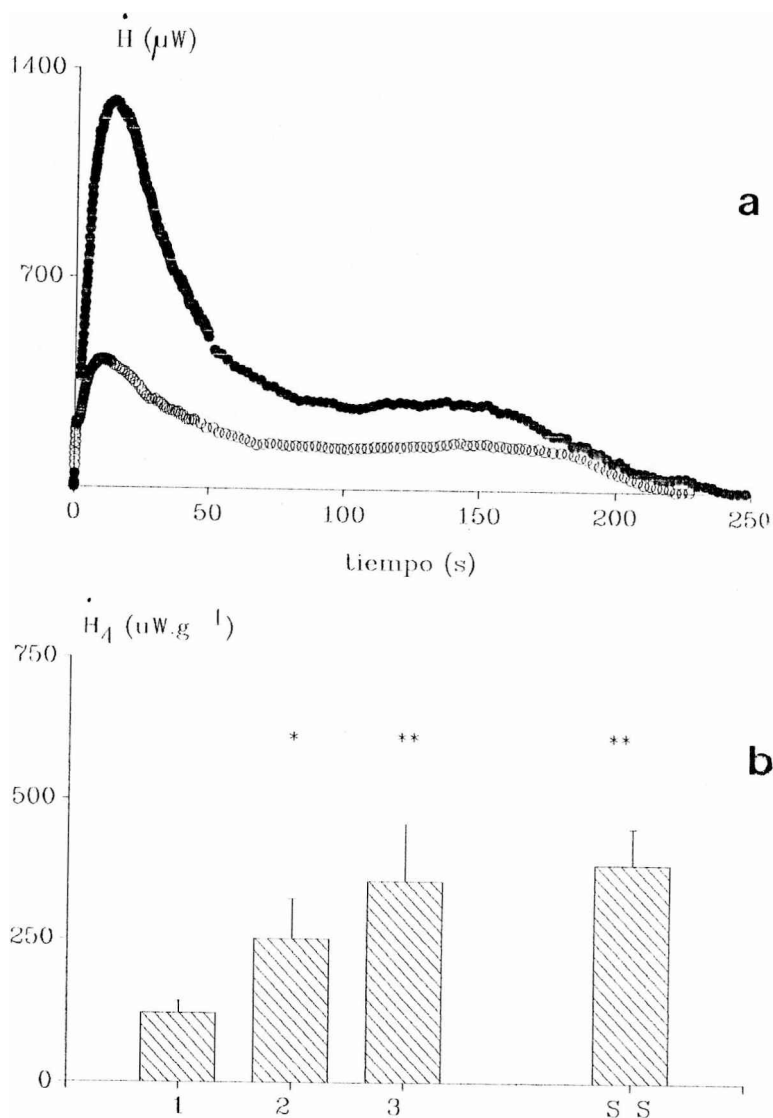
**FIGURA 13:** Correlaciones individuales de  $H_3$  vs.  $P$  de latidos aislados en Krebs-7 mM K, 0.5 mM Ca e hipoxia. Todas las ordenadas al origen resultaron NS diferentes de cero,  $b$ =pendiente. Cada tipo de símbolo corresponde a un experimento. Se puede observar que en todos los casos la pendiente de la regresión resultó menor que la obtenida en condición control ( $0.228 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2$ ).

### 3. Dependencia del cuarto componente con la estimulación repetida

Las características de H4 de: duración prolongada en latidos aislados, dependencia aeróbica y ausencia en el calor liberado inicialmente en cada latido estacionario sugirieron que se trataría de un proceso metabólico de prolongada duración. El hecho de que apareciera una energía suprabasal calculable por diferencia en el latido estacionario (Tabla 1) planteó la posibilidad de que ambas fracciones tuviesen el mismo origen. Para determinarlo, se evaluó cómo evolucionaba H4 desde una condición de latido aislado hasta una contracción de un tren estacionario. Después de efectuar un latido aislado posterior a un reposo > 5 min se evaluaron por separado ya sea 1, 2, 3 o 4 latidos, o un tren de estímulos, todos a 0.16 Hz. La potencia del cuarto componente de calor ( $\dot{H}_4$ ) se estimó en cada caso como la altura de la meseta del registro miotérmico después de los 100 s del cese de la estimulación (respuesta calorimétrica ya integrada) (Fig. 14 a). El flujo de calor  $\dot{H}_4$  del componente suprabasal mantenido (meseta final) se incrementó gradualmente hasta el tercer latido, resultando este valor no significativamente diferente del tren estacionario (Fig. 14 b). Sin embargo, la energía de la cuarta fracción por latido disminuyó de acuerdo a lo que aparece en la Tabla 1 para la FSB de un latido estacionario. Por lo tanto, la energía H4 es la manifestación de un evento celular que aumenta su producción de calor con la estimulación repetida, y se mantiene activado generando un flujo de calor constante mientras el corazón está estimulado estacionariamente.

### 4. Caracterización de los componentes transitorios independientes del desarrollo de fuerza

La transitoriedad e independencia del desarrollo de fuerza de los componentes H1 y H2 sugirió su posible vinculación con los eventos de "activación" del músculo cardíaco. Estos eventos incluyen la unión exotérmica de  $\text{Ca}^{12}$  a TnC y la remoción activa de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico con la consecuente hidrólisis



**FIGURA 14:** Efecto de la estimulación repetida sobre el flujo de calor  $H_4$ :

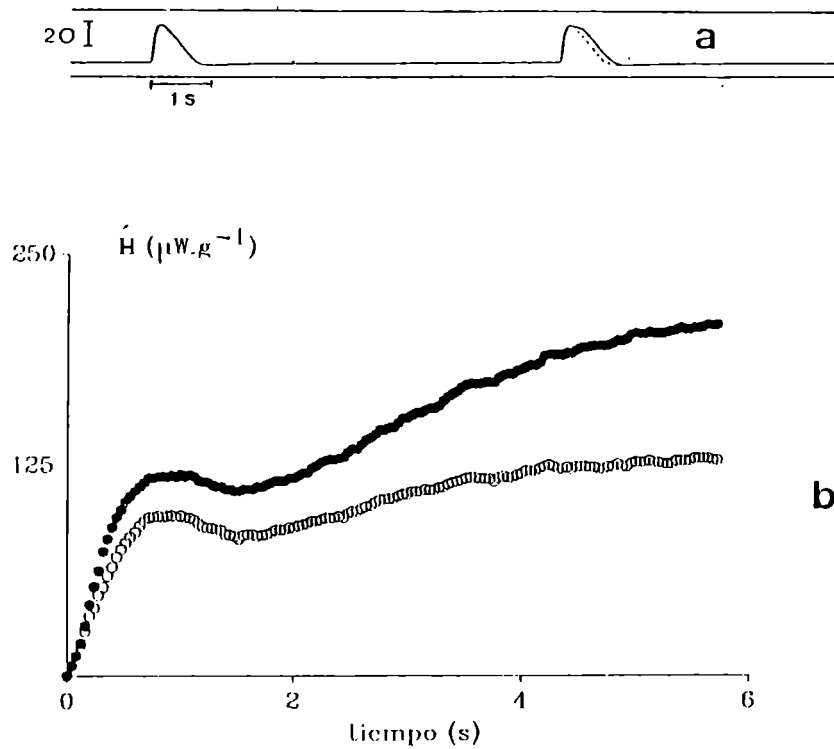
a- Registros energéticos digitalizados superpuestos de un latido aislado (o) y de dos latidos secuenciales separados por 6 s (o). Observar que la meseta que se establece al final es mayor para el segundo caso.

b- Potencias  $H_4$  en un latido aislado, en secuencias de 2 y 3 latidos y en el estado estacionario, todos a 0.16 Hz. Barras indican media  $\pm$  ESM, \*:  $p < 0.05$  y \*\*:  $p < 0.01$  respecto del aislado (prueba de Mann-Whitney,  $n = 7, 5, 4$  y 4, respectivamente).

de ATP.

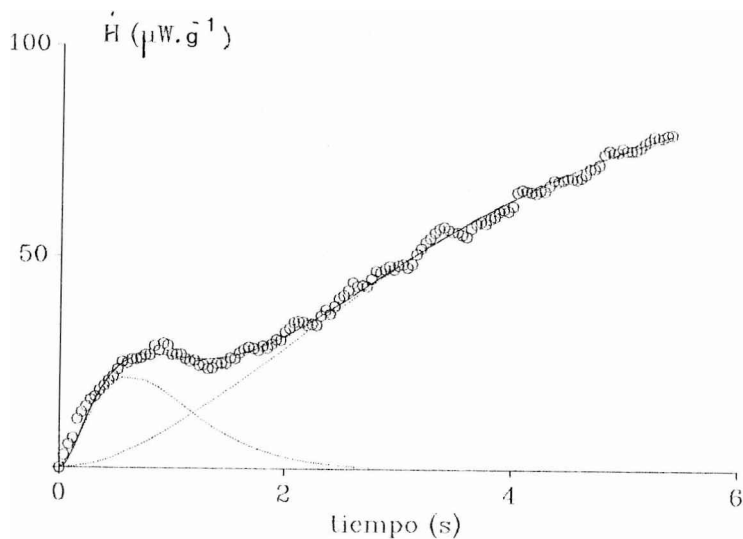
Para determinar si alguno de dichos componentes correspondía al calor de unión de Ca a TnC se evaluó el efecto de una segunda estimulación aplicada al tiempo de desarrollo de la máxima presión intraventricular (200 ms). En esa condición, los miofilamentos están aún ocupados con Ca<sup>12</sup>. Para ello, en 17 músculos estabilizados en estado estacionario en Krebs con 0.5 mM Ca se aplicó un estímulo pareado con una demora de 200 ms entre ambos pulsos. La Fig. 15a muestra que el segundo estímulo del par no aumentó la máxima P desarrollada por el primer estímulo ( $26.2 \pm 1.9$  mN.mm<sup>2</sup> en el latido control y  $26.7 \pm 1.8$  mN.mm<sup>2</sup> en el latido del estímulo pareado). En cambio, se produjo un incremento significativo de la IPT (desde  $8.7 \pm 0.7$  mN.mm<sup>2</sup>.s en el latido control a  $11.5 \pm 1.0$  mN.mm<sup>2</sup>.s en el latido del estímulo pareado,  $p < 0.0005$ ). Estos resultados sugieren que el segundo estímulo del par no provocaría mayor unión de Ca<sup>12</sup> a TnC sino un mantenimiento del Ca<sup>12</sup> unido durante un período más prolongado.

En el latido resultante del estímulo pareado se liberó una cantidad mayor de calor (Fig. 15b). Para analizar la existencia de componentes en el calor extra liberado por la extrasistolia, se efectuó la diferencia punto a punto entre la curva de calor liberado por el latido con extrasistolia y la del calor liberado por una contracción simple en el mismo músculo (Fig. 16). La curva diferencia pudo ser ajustada a una combinación lineal de 2 componentes transitorios de magnitudes  $0.72 \pm 0.07$  mJ.g<sup>-1</sup> y  $2.24 \pm 0.39$  mJ.g<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 16). El agregado de un tercer componente no mejoró los ajustes significativamente (prueba de Fisher: NS). Los tiempos pico de los dos componentes ajustados en el calor extra liberado por la extrasistolia correspondieron respectivamente a los de H2 y H3 del latido control. La desaparición de H1 en el calor extra liberado por la extrasistolia y la constancia de P (indicador de que no se uniría más Ca<sup>12</sup> a los miofilamentos) sugieren una correspondencia entre H1 y la unión de Ca<sup>12</sup> a TnC.



**FIGURA 15:** a- Registro temporal de la presión intraventricular (escala vertical en  $\text{mN}\cdot\text{mm}^2$ ) de una contracción simple de un tren estacionario (0.16 Hz) y de una contracción con extrasistolia producida por un estímulo pareado (desfasaje entre estímulos de 200 ms). La línea de puntos muestra el registro de P que correspondería a la contracción simple.

b- Registro miotérmico digitalizado de una contracción simple (o) y de la contracción con extrasistolia (●).



**FIGURA 16:** Curva de calor adicional producido por la extrasistolia, calculado como diferencia punto a punto entre las dos curvas de calor de la Fig. 15. Se muestra el ajuste de la misma a dos componentes con tiempos pico correspondientes a H2 y H3 (en todos los casos  $r > 0.8896$  para  $n > 53$ ).

## 5. Conclusiones

Pueden establecerse correspondencias entre los componentes de calor de una contracción isométrica y ciertos eventos celulares del ciclo contracción-relajación, a saber:

a) La independencia del desarrollo de fuerza y la transitoriedad de H1 y H2 los señalan como candidatos al llamado "calor de activación". H1 se asociaría al calor de unión de  $\text{Ca}^{12}$  a TnC y otros sitios enlazantes.

b) H3 es el único componente energético dependiente de la fuerza desarrollada (y del mantenimiento de la misma en todo el ciclo contracción-relajación). Esto sugiere que H3 estaría asociado a la hidrólisis del ATP correspondiente al ciclaje actomiosínico.

c) La disminución de la pendiente de la relación H3 vs. P por hipoxia sugiere que H3 contendría en parte el calor de la recuperación metabólica aeróbica del ATP.

d) H4 es el componente con mayor dependencia de la presencia de  $\text{O}_2$ , por lo que estaría asociado al metabolismo aeróbico del corazón. Dada la relación aproximada de 1:1 en las entalpías de hidrólisis y síntesis del ATP, y la proporción de H4 en el calor por latido estacionario (15 %, ver Tabla 1) H4 no podría representar más de un 30% de la recuperación aeróbica total de un latido. Esto sugiere que H4 del latido aislado ( $\approx$  50% del calor total) contendría la manifestación térmica de algún otro proceso metabólico.

e) H4 se mantiene activado durante aproximadamente 60 a 150 s posteriores a la estimulación única y da origen a la fracción de calor suprabasal hallada durante la estimulación estacionaria.

## 6. Hipótesis a evaluar

La siguiente hipótesis a evaluar es que las magnitudes de los cuatro componentes de calor podrían



modificarse diferencialmente por variación de la disponibilidad de Ca extracelular. El comportamiento mecánico-energético de un latido aislado ante las modificaciones en el influjo de Ca sarcolemal será analizado en el capítulo siguiente. Para ello se empleó la interferencia en ciertos mecanismos que afectan al transporte de Ca sarcolemal (corriente de  $\text{Na}^+$ , corriente de  $\text{Ca}^{+2}$ , intercambiador Na/Ca).

## Capítulo 10: Efectos de la variación de la disponibilidad de Ca extracelular en un latido aislado

### 1. Fundamentos y objetivos

Variaciones en la  $[Ca]_e$  modifican al calor total por latido (Ponce-Hornos y Taquini, 1986) y al calor de activación (Gibbs, 1978; Mulieri y Alpert, 1982). Por lo tanto, sería esperable que las variaciones en la disponibilidad de Ca extracelular afectaran diferencialmente a los cuatro componentes de calor de un latido aislado. Con la finalidad de modificar el influjo de Ca, se despolarizó parcialmente el miocardio de ratas reserpinisadas con Krebs-25 mM K, intervención que cambia el potencial de membrana desde -75 mV a alrededor de -40 mV (Molyvdas y Sperelakis, 1983). A este  $E_m$  se inactiva la corriente de  $Na^+$ , con lo que el proceso excitación-contracción depende de la corriente de  $Ca^{+2}$  (Coraboeuf, 1978). El  $E_m$  resultante es cercano al potencial de equilibrio del intercambiador Na/Ca, calculado entre -13 y -28 mV (Langer, 1982) por lo que se espera una disminución en su participación en el eflujo de  $Ca^{+2}$  en reposo por reducción del gradiente electroquímico. En estas condiciones se evaluaron los efectos mecánico-energéticos sobre el músculo, tanto de la despolarización parcial como de cambios en la  $[Ca]_e$ .

### 2. Efectos de la despolarización parcial y la $[Ca]_e$ sobre el calor de reposo

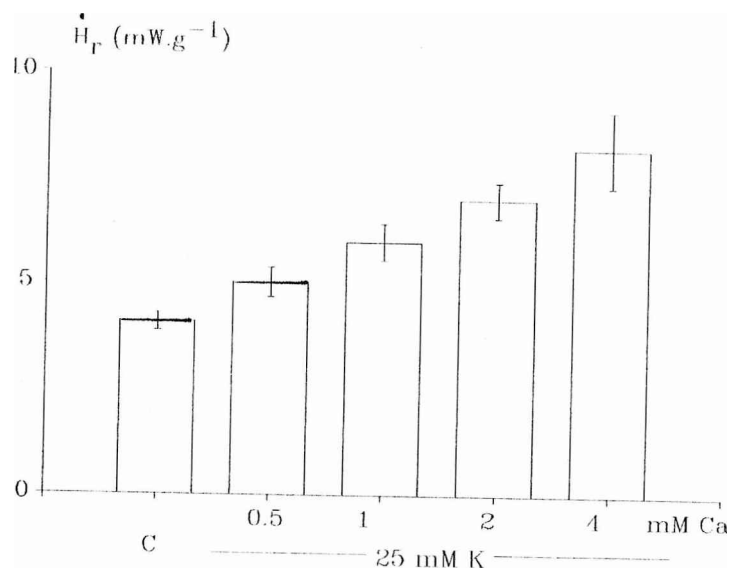
Cuando el ventrículo en reposo se despolarizó parcialmente por reemplazo de la solución Krebs con 7 mM K por otra con 25 mM K a  $[Ca]_e$  constante (0.5 mM) el calor de reposo se incrementó en forma transitoria y luego descendió hasta estabilizarse en una meseta superior al control. Esto está de acuerdo al comportamiento anteriormente descrito (Ponce-Hornos y col., 1992). El aumento de la  $[Ca]_e$  a 1, 2 y 4 mM elevó progresivamente el calor de reposo en el ventrículo despolarizado. En cada  $[Ca]_e$  se produjo un aumento transitorio del calor de reposo seguido por la estabilización del mismo en un

valor significativamente superior al correspondiente a la  $[Ca]_e$  anterior. En la Fig. 17 se analizaron las mesetas de  $\dot{H}_r$ , provenientes de 6 experimentos pareados. No hubo aumentos significativos en la presión intraventricular de reposo por el incremento en la  $[Ca]_e$  desde 0.5 a 2 mM Ca, mientras en 4 mM Ca se observó un pequeño aumento ( $3 \text{ mN}\cdot\text{mm}^2$ ) que representa un 6% de la P desarrollada en un latido.

Los resultados indican que en estas condiciones habría una fracción de energía química cuya utilización sería dependiente del Ca extracelular. El aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario podría reflejar la remoción activa de una cantidad extra de  $\text{Ca}^{12}$  citosólico para mantener el reposo mecánico. Dado que la despolarización cambia el  $E_m$  a niveles cercanos al de activación de los canales de Ca, podría hipotetizarse un ingreso de  $\text{Ca}^{12}$  a través de los canales lentos.

Con la finalidad de analizar la hipótesis planteada en el párrafo anterior, 5 corazones perfundidos con 25 mM K y 2 mM Ca se trataron con verapamilo  $0.4 \mu\text{M}$  una vez establecida la meseta de  $\dot{H}_r$  estacionario. El bloqueante de los canales de Ca disminuyó significativamente el  $\dot{H}_r$ , confirmando la hipótesis planteada. La Fig. 18 muestra la progresiva disminución que el verapamilo provocó sobre el aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario debido a la despolarización y elevación de la  $[Ca]_e$ . El  $\Delta \dot{H}_r$  decayó exponencialmente respecto del tiempo (Fig. 18) hasta alcanzar una asíntota ( $1.22 \pm 0.53 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Este valor asíntótico es similar al  $\dot{H}_r$  estacionario provocado sólo por despolarización del tejido en 0.5 mM Ca ( $1.65 \pm 0.29 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  en los mismos músculos). Ello indica que los cambios del  $\dot{H}_r$  estacionario provocados por el aumento de la  $[Ca]_e$  en el miocardio despolarizado son totalmente debidos a la remoción de  $\text{Ca}^{12}$  ingresado por canales lentos. En cambio, el  $\Delta \dot{H}_r$  estacionario provocado por la despolarización (en 0.5 mM Ca) es mayoritariamente debido a otro proceso diferente de la remoción activa de  $\text{Ca}^{12}$  ingresado por canales.

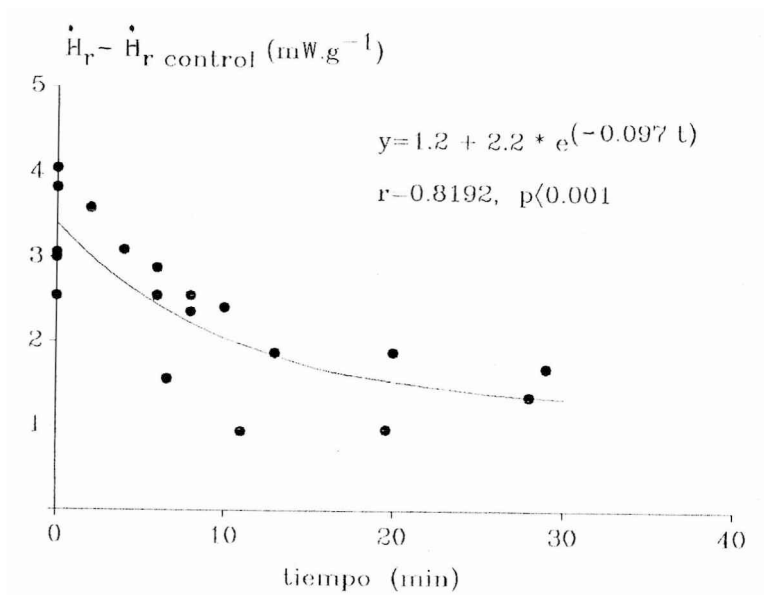
Si bien todo el aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario dependiente de Ca en el miocardio despolarizado es inhibible por verapamilo, cabría la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{12}$  ingresado por canales indujera la liberación



**FIGURA 17:** Efectos de la  $[\text{Ca}]$  sobre el flujo de calor de reposo estacionario del miocardio parcialmente despolarizado. C: 7 mM K y 0.5 mM Ca. Barras indican media  $\pm$  ESM de 6 experimentos pareados.  $p < 0.05$  por prueba de rangos pareados de Friedman. Comparaciones a posteriori:

	C	0.5	1	2
0.5 I	*			
1 I	*	NS		
2 I	*	*	*	
4 I	*	*	*	*

\*:  $p < 0.05$ , NS: sin diferencias significativas



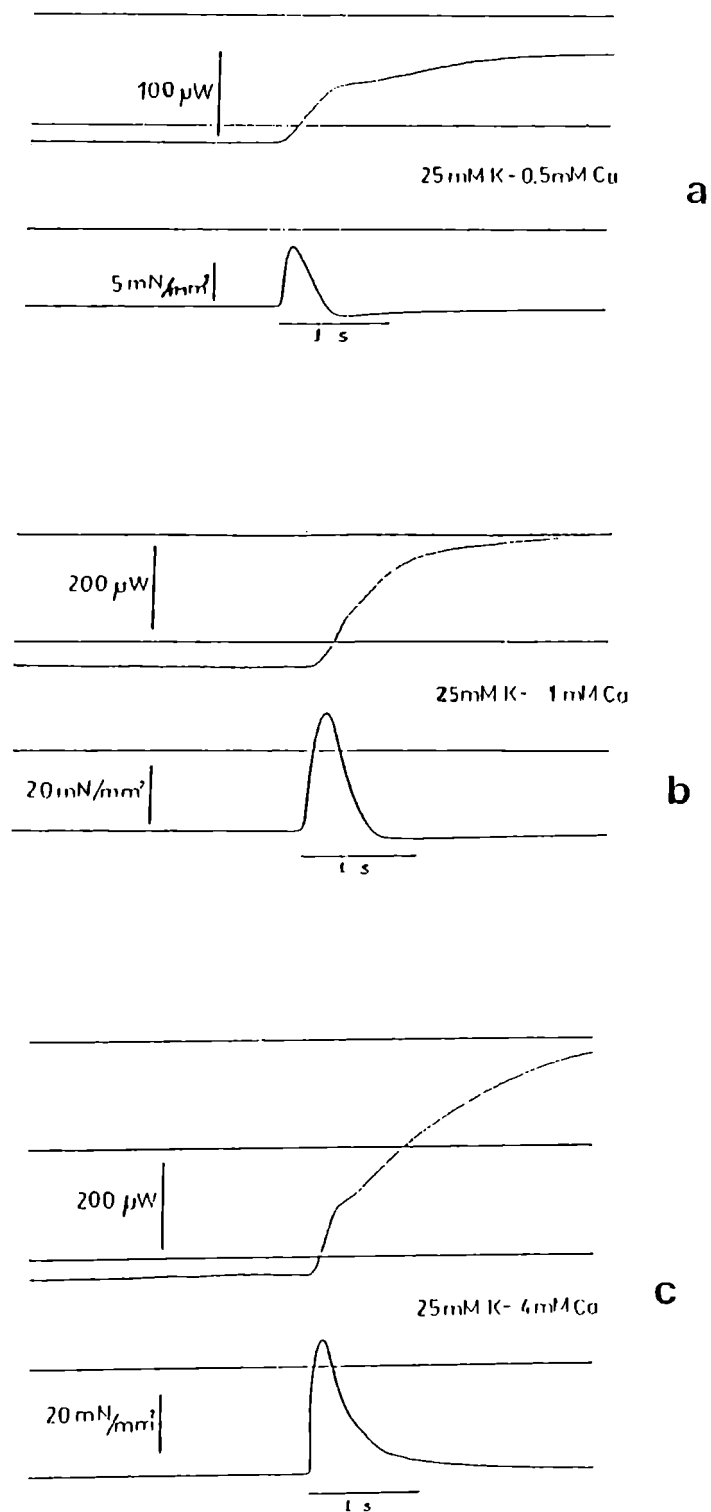
**FIGURA 18:** Inhibición progresiva del aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario provocado por el cambio desde Krebs-7 mM K-0.5 mM Ca (control) a Krebs-25 mM K-2 mM Ca, en función del tiempo de tratamiento con verapamil ( $n = 5$  músculos).

de  $\text{Ca}^{12}$  del RS que, al ser ciclado, contribuyera al  $\dot{H}_r$  estacionario. Para determinar este punto, cuatro corazones perfundidos con 25 mM K y diferentes  $[\text{Ca}]_e$  (0.5, 1 y 4 mM) se trataron con cafeína 2 mM durante la meseta de  $\dot{H}_r$ . Esta droga libera Ca del RS deplecionándolo y se ha descrito que aumenta el calor de reposo en el miocardio de rata expuesto a  $[\text{K}]_e$  cercana a la fisiológica (Bonazzola y col. 1987). En el miocardio despolarizado, el tratamiento con cafeína 2 mM provocó un aumento transitorio del calor de reposo, pero no modificó significativamente el  $\dot{H}_r$  estacionario ( $-0.052 \pm 0.285 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n=4$ , NS). Los resultados sugieren que en el miocardio parcialmente despolarizado no habría un continuo aporte de ciclaje de  $\text{Ca}^{12}$  del RS al  $\dot{H}_r$  estacionario.

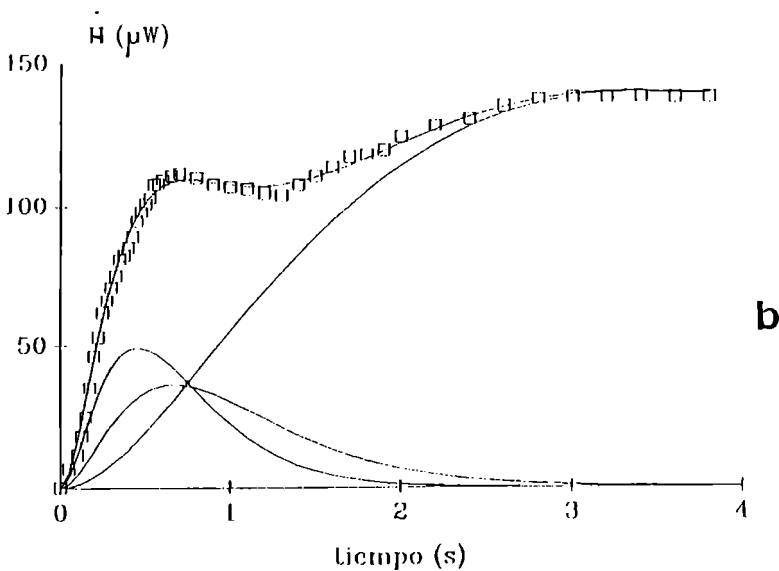
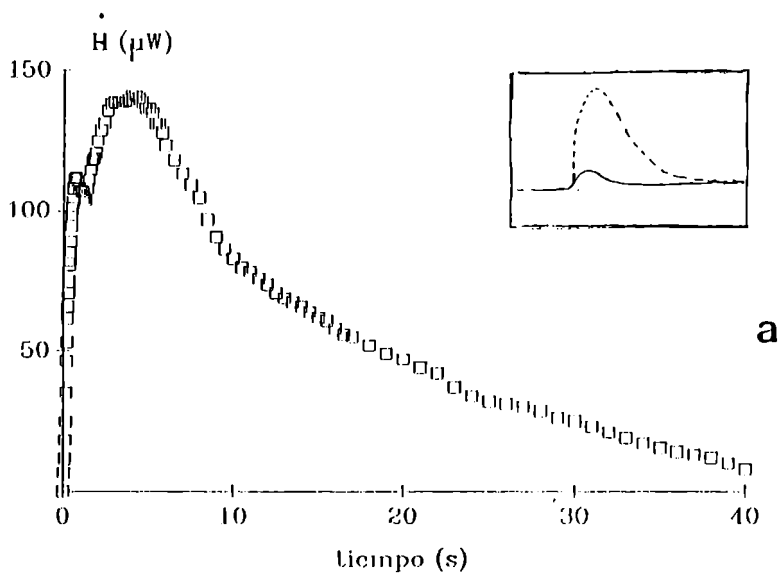
### 3. Efectos de la despolarización parcial sobre los desarrollos de fuerza y de calor activo

Una vez estabilizado el calor de reposo en 25 mM K y 0.5 mM Ca se efectuaron latidos aislados análogamente a como se hacían en condición de 7 mM K. La nueva condición elevó el umbral de estimulación del músculo requiriéndose la aplicación de un estímulo mayor (15 V y 15 ms) que, como se detalla en "Materiales y Métodos", no contribuye significativamente al calor liberado por el latido.

La despolarización con Krebs-K25 en 0.5 mM Ca provocó una caída en la máxima P intraventricular desarrollada y en el calor total liberado del latido aislado (comparar la Fig. 19a con la Fig. 3). El registro miotérmico sólo se ajustó a 3 componentes (Fig. 20) habiendo desaparecido el componente de duración prolongada del latido aislado control (H4). Por lo tanto, la caída en el calor por latido fue debida a la desaparición de H4 y a la disminución de la energía de los 3 primeros componentes H1, H2 y H3 (Tabla 3). El desarrollo de presión cayó a un 25% de la correspondiente a 7 mM K e igual  $[\text{Ca}]_e$  (Tabla 3). Se observó además un aumento de la relación  $-P/P$  desde  $1.4 \pm 0.1$  (en 7 mM K) a  $2.1 \pm 0.3$  en 25 mM K ( $p < 0.05$ ).



**FIGURA 19:** Comparación de los primeros 2.5 s de los registros de P y de flujo de calor de un latido aislado en el miocardio parcialmente despolarizado y 0.5 (a), 1 (b) y 4 mM Ca (c). Note las diferencias en la magnitud de las respuestas de P, la relajación y los registros miotérmicos.



**FIGURA 20:** a- Registro digitalizado de la producción de calor de un latido aislado del miocardio parcialmente despolarizado en 0.5 mM  $\text{Ca}$  extracelular. En el recuadro se compara su registro de P (—) con el obtenido en 7 mM K (---).

b- Primeros 4 s del registro a- donde se observa el ajuste a tres componentes.



TABLA 3

Efectos de la despolarización sobre los parámetros mecánicos y energéticos de un latido aislado en 0.5 mM Ca:

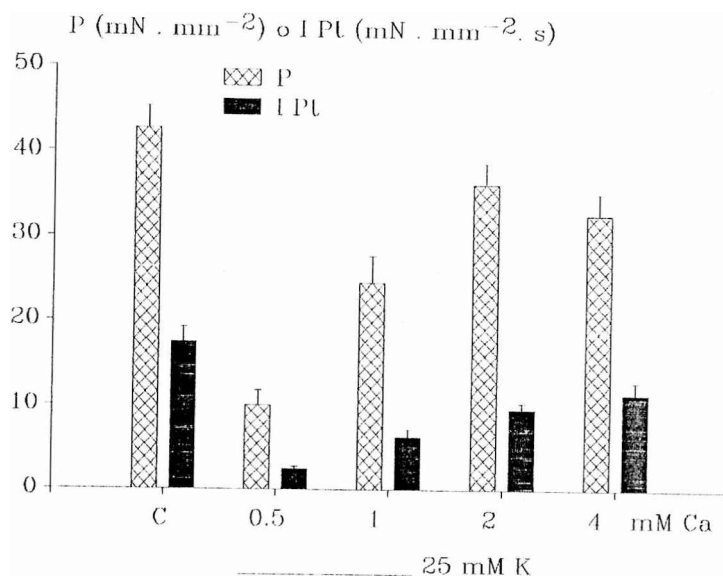
	7 mM K (n=16)	25 mM K (n=8)	
P (mN.mm <sup>2</sup> )	42.7 ± 2.6	10.1 ± 1.7	**
IPt (mN.mm <sup>2</sup> .s)	17.7 ± 2.0	2.4 ± 0.3	**
+P (mN.mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	365.1 ± 35.5	71.8 ± 13.3	**
-P (mN.mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	124.4 ± 9.3	53.1 ± 12.7	**
tC (s)	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.01	
tR (s)	0.79 ± 0.04	0.52 ± 0.05	*
H1 (mJ.g <sup>-1</sup> )	2.11 ± 0.33	0.41 ± 0.14	*
H2 (mJ.g <sup>-1</sup> )	2.32 ± 0.27	1.29 ± 0.38	*
H3 (mJ.g <sup>-1</sup> )	9.07 ± 0.69	3.11 ± 0.41	**
H4 (mJ.g <sup>-1</sup> )	16.7 ± 1.6	0	**

\* p < 0.05, \*\* p < 0.001 (t de Student).

#### 4. Efectos del aumento de la [Ca]<sub>e</sub> sobre el latido aislado del miocardio despolarizado

Dado que la fuerza de contracción y la energía total fueron ampliamente inhibidas por la despolarización, se evaluó si el aumento de la [Ca]<sub>e</sub> era capaz de recuperar el patrón mecánico-energético control. Para ello, una vez alcanzado el nuevo estado estacionario correspondiente al cambio de [Ca]<sub>e</sub> en 25 mM K, se estimuló al músculo con intervalos mayores de 5 minutos (para garantizar el retorno al calor de reposo previo al latido).

Al elevar la [Ca]<sub>e</sub> en 25 mM K aumentó la presión desarrollada (P) hasta valores cercanos al obtenido en el control en 0.5 mM Ca (Fig. 19 b y c). P e IPt alcanzaron un máximo entre 2 y 4 mM Ca, con un valor de alrededor del 85 % del control (7 mM K y 0.5 mM Ca) (Fig. 21). Las velocidades de contracción (+P) y relajación (-P) también se incrementaron con la [Ca]<sub>e</sub> (Fig. 22). La Tabla 4 muestra el análisis estadístico no-paramétrico a posteriori de rangos de Mann-Whitney aplicado a los

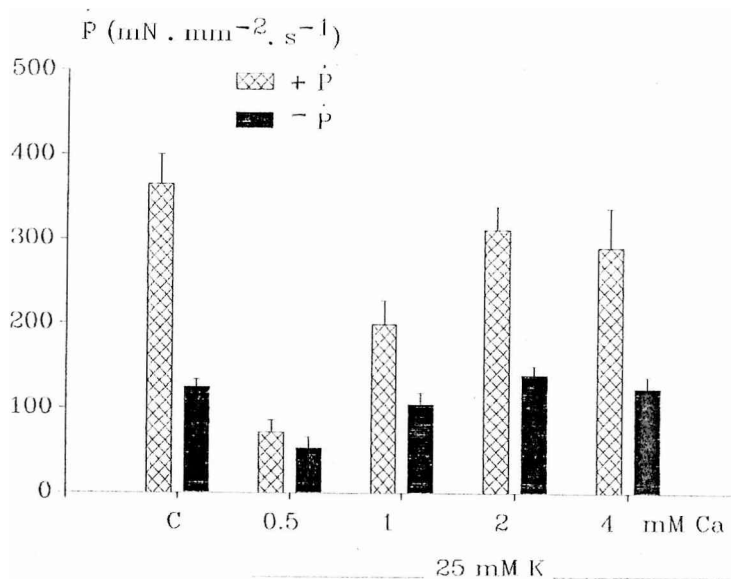


**FIGURA 21:** Máxima presión desarrollada ( $P$ ) e integral presión-tiempo ( $I Pt$ ) de latidos aislados en 7 mM K-0.5 mM Ca (C) y en 25 mM K a diferentes  $[Ca]_e$ . Las barras indican media  $\pm$  ESM,  $n = 16, 8, 11, 15$  y 11 músculos, respectivamente. ANOVA  $p < 0.01$  en ambos parámetros. Ver comparaciones múltiples por rangos en tabla 4.

resultados que se graficaron en forma paramétrica (como media  $\pm$  ESM) en las Figs. 21 y 22. Se consideró para el análisis el conjunto de datos obtenidos para cada condición. Problemas como post-contracciones (en condición control) o muy escasa liberación de calor (en 25 mM y 0.5 mM Ca) impidieron analizar las 5 condiciones en cada músculo. Se realizaron mayor número de experimentos con la condición de 2 mM Ca en el miocardio despolarizado y con la condición control.

Los tiempos a la contracción pico y la relación +P/P no se modificaron al aumentar la [Ca]<sub>e</sub> en 25 mM K, manteniéndose similares al control. La relación -P/P, aumentada por la despolarización, se mantuvo elevada y constante con el aumento de la [Ca]<sub>e</sub> ( $4.7 \pm 0.6$ ,  $4.4 \pm 0.4$ ,  $3.8 \pm 0.2$  y  $4.9 \pm 0.6$ , en 0.5, 1, 2 y 4 mM Ca respectivamente, ANOVA NS, Kruskal-Wallis NS). A pesar de ello, en [Ca]<sub>e</sub> = 4 mM, se enlenteció significativamente el tramo final de la relajación (ver Fig. 19c). En 4 mM Ca y 25 mM K, el tiempo total de la contracción resultó en promedio de  $1.95 \pm 0.08$  s, valor que excede significativamente al tiempo control ( $1.04 \pm 0.08$  s,  $p < 0.001$ ).

El calor total liberado por latido experimentó una mayor variación con la [Ca]<sub>e</sub> que el desarrollo de fuerza (Fig. 23). Este comportamiento fue principalmente debido a las diversas magnitudes de H4 (Tabla 5). Este componente, que no se desarrolló en 0.5 mM Ca, reapareció en 1 mM Ca con características similares a las del latido control (Fig. 24a).



**FIGURA 22:** Máximas velocidades de contracción (+P) y de relajación (-P) desarrolladas por latidos aislados en 7 mM K-0.5 mM Ca (C) y en 25 mM K a diferentes [Ca]<sub>e</sub>. Las barras indican media  $\pm$  ESM, n= 16, 8, 11, 15 y 11 músculos, respectivamente. ANOVA  $p < 0.05$  en ambos parámetros. Ver comparaciones múltiples por rangos en tabla 4.

TABLA 4

Comparación de los parámetros mecánicos presentados en las Fig. 21 y 22

a) P:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	*	*		
2	I	*	*	*	
4	I	*	*	*	NS

b) IPT:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	*	*		
2	I	*	*	*	
4	I	*	*	*	NS

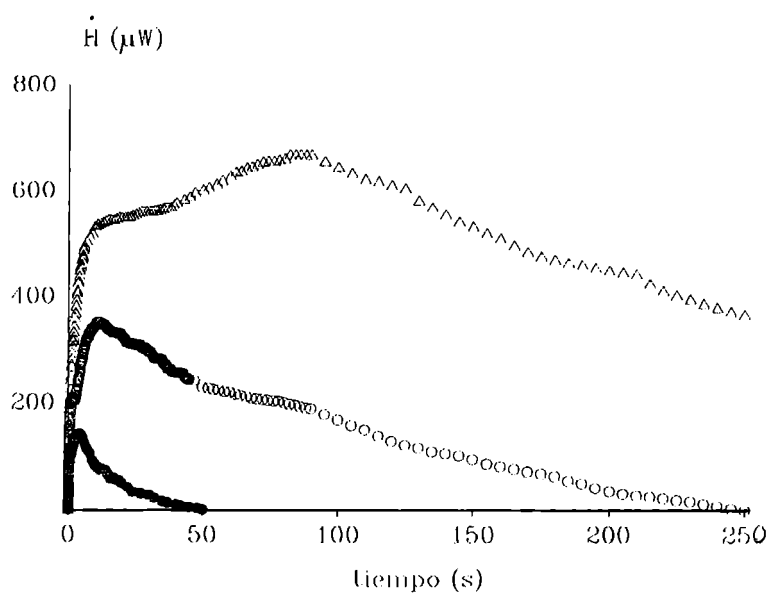
c) +P:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	*	*		
2	I	*	*	*	
4	I	*	*	*	NS

d) -P:

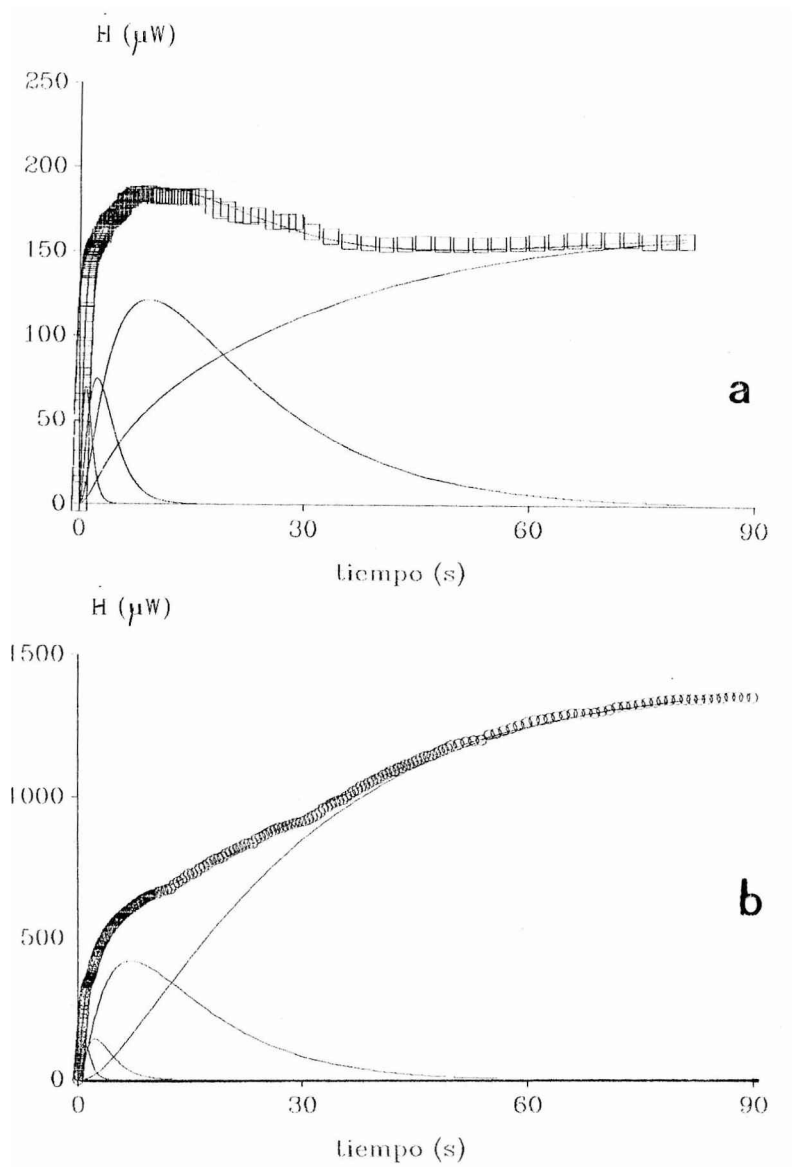
[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	NS	*		
2	I	NS	*	NS	
4	I	NS	*	NS	NS

Análisis a posteriori por prueba de rangos de Mann-Whitney (Siegel, 1990). \*  $p < 0.05$ , NS: no significativo.



**FIGURA 23:** Registros miotérmicos digitalizados y superpuestos de latidos aislados en Krebs-7 mM K y 0.5 mM Ca (◻), en Krebs-25mM K y 0.5 mM Ca (●) y en Krebs-K25mM K y 4 mM Ca (Δ).

En alta  $[Ca]_e$  (2 y 4 mM), el registro miotérmico pudo ser ajustado, hasta el comienzo del enfriamiento final, a una combinación de funciones difusionales. Cuando se empleó una suma de 4 funciones para flujos de calor constante (Ec. 8) se obtuvieron ajustes que fueron rechazados por pruebas de rachas. Se analizó entonces de modo preliminar la forma del pulso de flujo de calor generado a tiempos prolongados. Para ello el registro calorimétrico digitalizado de un latido, comprendido entre los 40 s y el inicio del enfriamiento final, se dividió punto a punto por la función difusional (segundo factor de la Ec. 6, que describe la respuesta demorada del sistema). La curva resultante, que representa a la potencia generada efectivamente en la cámara a cada tiempo, pudo ser ajustada en todos los casos a una función exponencial creciente ( $r > 0.98$ ). En ningún caso la curva pudo ser ajustada a una función lineal creciente. Por lo tanto, se utilizó una función difusional exponencialmente creciente para representar a  $H_4$  en los registros miotérmicos que crecen a tiempos superiores al de integración (latidos en altas  $[Ca]_e$  y 25 mM K). El ajuste de esos registros miotérmicos a una suma de 3 funciones difusionales para flujo de calor constante (Ec. 8) más una función para flujo de calor exponencialmente creciente (Ec. 12) fue satisfactorio ( $r > 0.996$  para  $n > 107$  puntos). Luego de la meseta, el registro miotérmico mostró un decaimiento hasta el  $\dot{H}_r$ , cuya velocidad ( $0.009 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ ) resultó más lenta que la determinada por la constante calorimétrica ( $\mu$ ). Esto indica que la desactivación de esa fuente de calor es gradual, aunque no se distingue la existencia de componentes durante la desactivación. Dado que  $H_4$  es el único componente que tiene generación de calor mantenida es posible obtener su flujo de calor ( $\dot{H}_4$ ) constante o asintótico a partir del correspondiente parámetro de ajuste, como se explicó en el capítulo 7 (Ec. 6 y 12). Los flujos de calor  $\dot{H}_4$  crecieron con el aumento de la  $[Ca]_e$ , como se muestra en la Tabla 5.



**FIGURA 24:** Ajuste de componentes energéticos en los registros miotérmicos digitalizados de latidos aislados en Krebs-25 mM K:

*a-* Latido aislado en 1 mM Ca. Note la meseta final correspondiente a H4.

*b-* Latido aislado en 4 mM Ca. Note a H4 exponencialmente creciente y la diferente escala de potencia.



TABLA 5

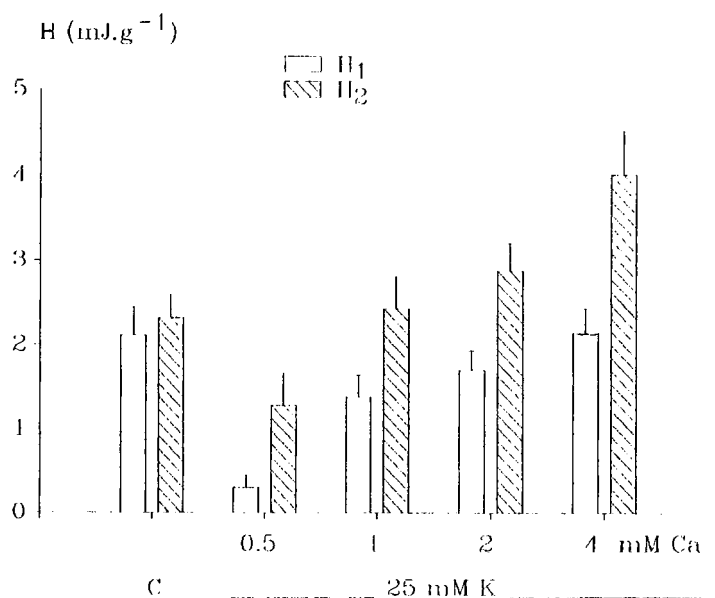
Calor total por latido aislado y flujo de calor del cuarto componente del latido aislado en las diferentes condiciones experimentales

	Ha (mJ.g <sup>-1</sup> ) #	H <sub>4</sub> (mW.g <sup>-1</sup> ) ##	n
7 mM K- 0.5 mM Ca	30.7 ± 3.5	0.183 ± 0.024	16
25 mM K- 0.5 mM Ca	4.6 ± 0.8 *	0	8
25 mM K- 1 mM Ca	64.2 ± 17.8 *	0.305 ± 0.075	11
25 mM K- 2 mM Ca	167.8 ± 31.8 *	0.868 ± 0.163 *	15
25 mM K- 4 mM Ca	264.7 ± 37.0 *	1.300 ± 0.231 *	11

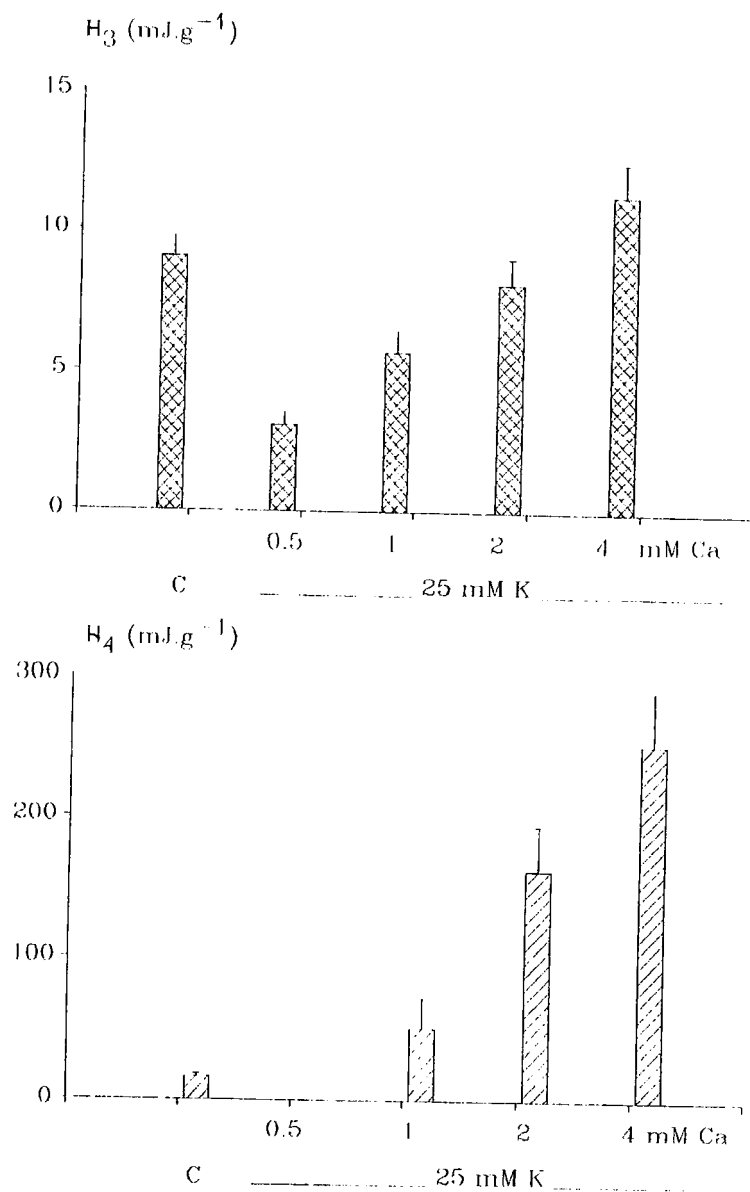
# y ##: ANOVA  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.001$  respecto de 7 mM K-0.5 mM Ca (por comparaciones de rangos de Mann-Whitney).

Las energías H1, H2 y H3 aumentaron con la [Ca]<sub>e</sub> hasta valores comparables al control (Fig. 25 y 26a). H4 se diferenció considerablemente de los otros componentes por tener una [Ca]<sub>e</sub> umbral mayor que P o que las otras fracciones de calor y crecer relativamente mucho más que ellos. En 4 mM Ca, H4 llegó a representar alrededor de 15 veces el valor control (Fig. 26b). La Tabla 6 muestra el análisis estadístico no-paramétrico a posteriori por rangos de Mann-Whitney aplicado a los resultados que se graficaron en forma paramétrica (como media ± ESM) en las Fig. 25 y 26.

El tercer componente energético H3, único dependiente del desarrollo de fuerza en el latido aislado control, se correlacionó linealmente con P y con IPT al variar la [Ca]<sub>e</sub> en 25 mM K (Fig. 27). Las pendientes de ambas correlaciones fueron NS diferentes de las de los latidos en condición control.



**FIGURA 25:** Calor liberado en los dos primeros componentes (H1 y H2) de los latidos aislados en 7mM K y 0.5 mM Ca (C) y en 25 mM K y diferentes [Ca]<sub>e</sub> (0.5, 1, 2 y 4 mM Ca). Barras indican media  $\pm$  ESM, n= 16, 8, 11, 15 y 11, respectivamente. ANOVA:  $p < 0.05$  (H1) y  $p < 0.01$  (H2). Ver comparaciones múltiples por rangos en tabla 6.



**FIGURA 26:** Calor liberado en el tercer (a) y cuarto componente (b) de los latidos aislados en 7 mM K y 0.5 mM Ca (C) y en 25 mM K y 0.5, 1, 2 y 4 mM Ca. Barras indican media  $\pm$  ESM,  $n = 16, 8, 11, 15$  y  $11$ , respectivamente. ANOVA:  $p < 0.01$  ( $H_3$  y  $H_4$ ). Ver comparaciones múltiples por rangos en tabla 6.

TABLA 6

Comparación de los parámetros energéticos presentados en las Fig. 25 y 26

a) H1:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	NS	*		
2	I	NS	*	NS	
4	I	NS	*	NS	NS

b) H2:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	NS	*		
2	I	NS	*	NS	
4	I	*	*	*	*

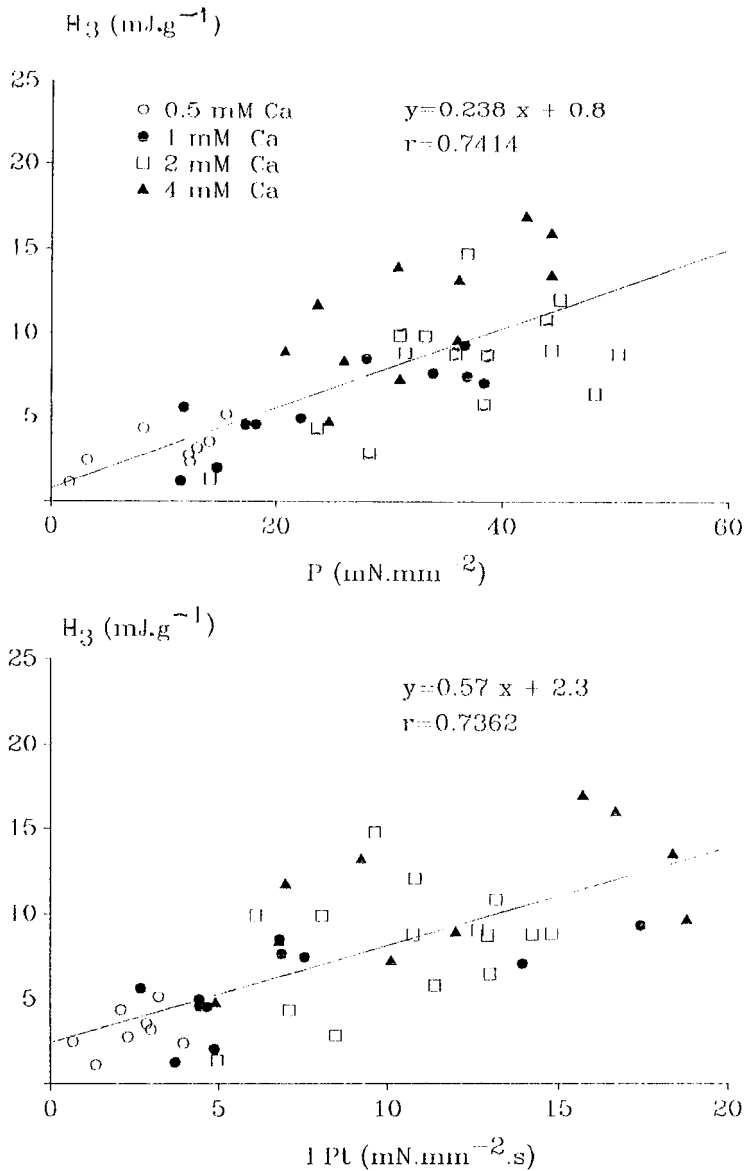
b) H3:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	*	*		
2	I	NS	*	*	
4	I	*	*	*	*

b) H4:

[Ca]e		Control	0.5	1	2
0.5	I	*			
1	I	*	*		
2	I	*	*	*	
4	I	*	*	*	*

Análisis a posteriori por prueba de rangos de Mann-Whitney (Siegel, 1990). \*  $p < 0.05$ , NS: no significativo.



**FIGURA 27:** Correlaciones de  $H_3$  con la presión desarrollada (a) y con la integral presión-tiempo (b) de latidos aislados en 25 mM K y diferentes  $[Ca]_i$ .

a- pendiente =  $0.238 \pm 0.015 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , ordenada =  $0.8 \pm 2.8 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $p < 0.001$ .

b- pendiente =  $0.57 \pm 0.09 \text{ mW}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , ordenada =  $2.3 \pm 2.7 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $p < 0.001$ ,

## 5. Conclusiones

a- El aumento del  $\dot{H}$ , del miocardio provocado por despolarización y aumento de la  $[Ca]_e$  es atribuible a la remoción activa de  $Ca^{12}$  ingresado por canales, con mantenimiento del reposo mecánico.

b- El similar comportamiento de H1, H2, H3 y P del latido aislado ante la despolarización y el aumento de la  $[Ca]_e$  es compatible con la común dependencia que los procesos de activación y ciclaje actomiosínico tienen respecto del  $Ca^{12}$  citosólico.

c- H3 está asociado al ciclaje actomiosínico, aún en distintas condiciones que modifican al inotropismo (longitud del músculo, variación entre preparados,  $[K]_e$ ,  $[Ca]_e$ ).

d- La ausencia de H4 en el latido aislado en 25 mM K y 0.5 mM Ca sugiere que H4 no podría ser la manifestación de la resíntesis del ATP. El calor de la recuperación metabólica aeróbica estaría contenido mayoritariamente en H3.

e- H4 representa una actividad Ca-dependiente pero se comporta en forma diferente a los otros componentes de calor: requiere un umbral superior de  $[Ca]_e$  y alcanza valores muy superiores al control. Los resultados sugieren que H4 no sería dependiente del mismo  $Ca^{12}$  citosólico activador de la contracción.

## 6. Hipótesis a evaluar

Cabe preguntarse si el cuarto componente energético del latido del miocardio despolarizado tiene el mismo origen que el de un latido control. Su desaparición en 0.5 mM Ca cuando aún se genera fuerza, y su crecimiento con la  $[Ca]_e$  cuando P está saturada, sugieren que H4 sería la manifestación de algún mecanismo dependiente de Ca que no está vinculado al ciclo de generación de fuerza. La mitocondria es un posible candidato, puesto que puede movilizar  $Ca^{12}$  con una cinética diferente a la de los mecanismos intervinientes en la contracción.

## Capítulo 11: Efectos de la hipoxia en un latido del miocardio despolarizado en alta $[Ca]_i$

### 1. Fundamentos y objetivos

El muy alto contenido en mitocondrias del miocardio (30-40% del volumen celular) refleja la preponderante dependencia aeróbica del corazón. Por ello, el reemplazo del  $O_2$  del medio por  $N_2$  puede ser empleado para disminuir la actividad mitocondrial. La actividad mitocondrial puede estar vinculada a la recuperación de los niveles de fosfatos de alta energía (Gibbs, 1969) o a cualquier otro proceso acoplado a la respiración mitocondrial.

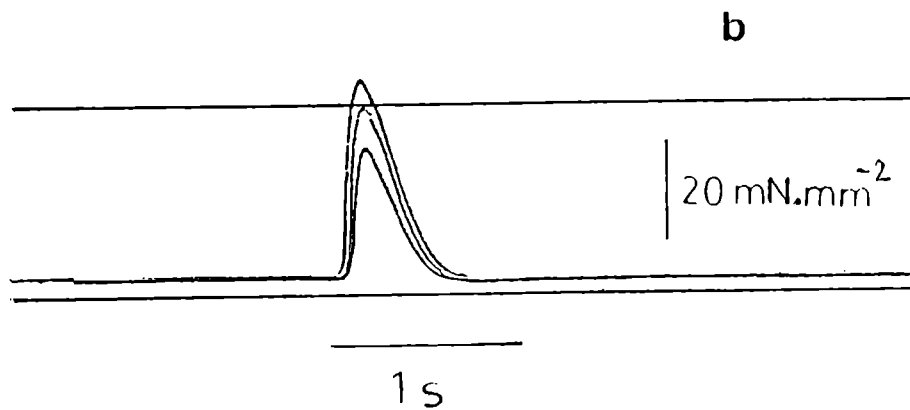
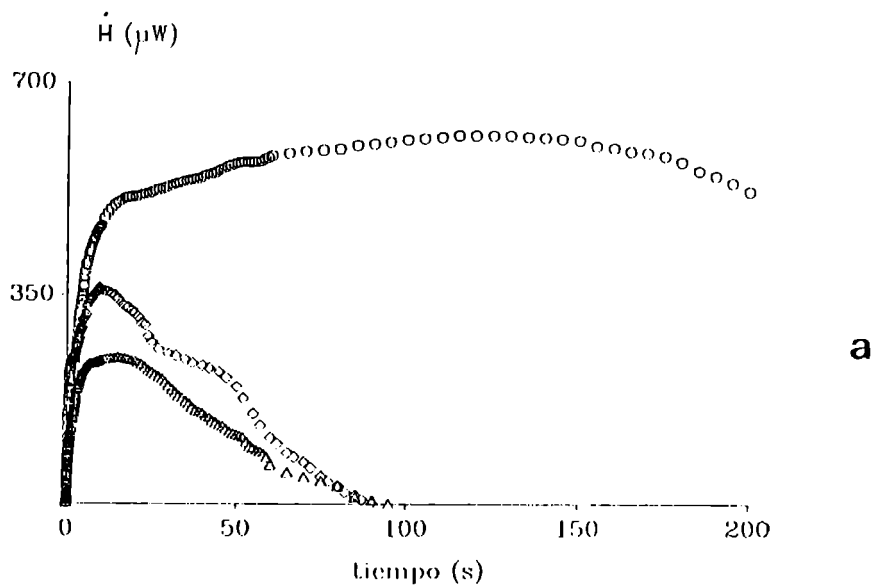
Con el objeto de evaluar la hipótesis de que en el latido aislado en 25 mM K y alta  $[Ca]_i$ , H4 tendría el mismo origen mitocondrial que en el latido aislado control, los corazones en condición de 25 mM K y 2 mM Ca fueron sometidos a hipoxia severa.

### 2. Efectos de la hipoxia sobre el calor de reposo

El calor de reposo estacionario en 25 mM K y 2 mM Ca disminuyó desde  $7.0 \pm 0.4 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  hasta  $2.2 \pm 0.5 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ) a los 15 minutos del reemplazo de  $O_2$  por  $N_2$ . La presión intraventricular de reposo, en cambio, no se modificó por la hipoxia.

### 3. Efectos sobre el cuarto componente energético de una contracción aislada

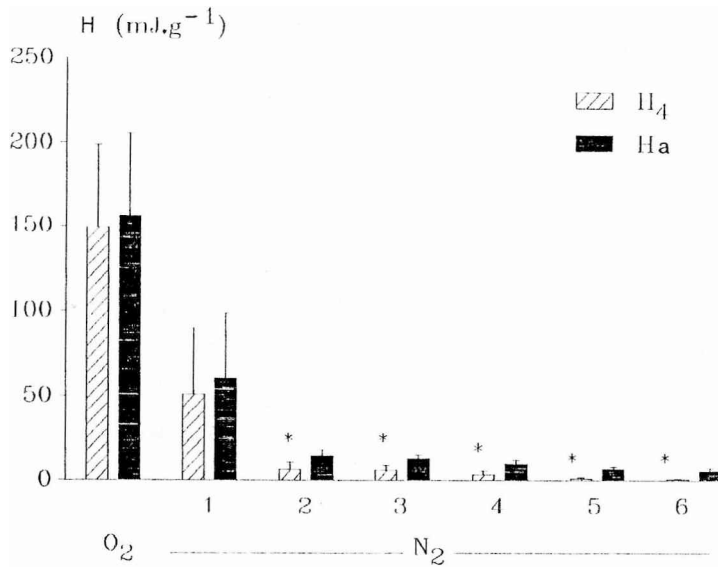
Una vez reemplazada la perfusión aeróbica por la burbujeada con  $N_2$  se efectuaron latidos aislados cada 5 minutos desde los 3 minutos del cambio. El calor total por latido aislado en 25 mM K y 2 mM Ca disminuyó considerablemente en el primer latido hipóxico, en el que la P desarrollada fue escasamente reducida (Fig. 28). Esa disminución del calor total fue principalmente debida a la reducción de H4 (ANOVA  $p < 0.01$ ), que perdió sus características de flujo de calor exponencialmente creciente.



**FIGURA 28:** *a-* Primeros 200 s de los registros miotérmicos digitalizados superpuestos de un latido aislado en 25 mM K y 2 mM Ca en presencia de  $\text{O}_2$  ( $\circ$ ), del primer latido aislado obtenido a los 3 minutos de hipoxia ( $\diamond$ ) y del tercer latido hipóxico ( $\triangle$ ).

*b-* Registros superpuestos de  $P$  correspondientes a los mismos latidos del inciso *a-*.



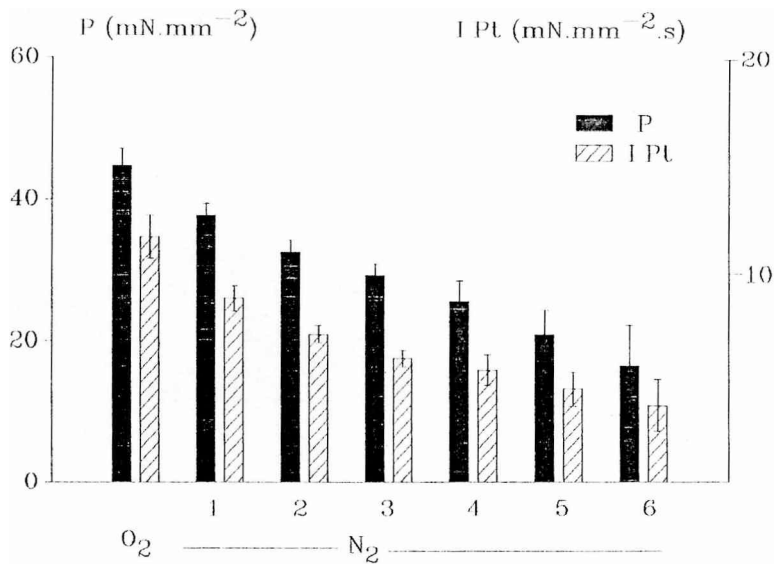


**FIGURA 29:** Magnitudes de  $H_4$  y del calor total ( $H_a$ ) liberado en un latido efectuado en 25 mM K y 2 mM Ca en presencia de  $\text{O}_2$  y por los sucesivos latidos aislados hipóxicos. Las barras indican media  $\pm$  ESM,  $n=5$ . \*: no significativamente diferente de cero.

H4 descendió en el primer latido al 33 % de los  $149 \pm 49 \text{ mJ.g}^{-1}$  ( $n=5$ ) producidos en presencia de  $\text{O}_2$ , mientras la presión desarrollada P sólo se redujo al 84% de su valor aeróbico (Fig. 29 y 30). Este comportamiento confirma la hipótesis del origen de H4 como una actividad acoplada a la respiración mitocondrial, disparada durante la contracción y altamente dependiente de la  $[\text{Ca}]_i$  en el miocardio parcialmente despolarizado.

#### 4. Efectos de la hipoxia sobre el desarrollo de fuerza y los tres primeros componentes energéticos

En la condición de aerobiosis, P y las diferentes energías exhibieron magnitudes no significativamente diferentes de las correspondientes a los latidos aislados en 2 mM Ca presentados en las Fig. 21 a 26 (por prueba de rangos de Mann-Whitney). En los sucesivos latidos aislados efectuados cada 5 minutos en 25 mM K, 2 mM Ca e hipoxia, P e IPT disminuyeron progresivamente (Fig. 30 y Tabla 7). En el sexto latido hipóxico P alcanzó un  $37 \pm 12$  % del valor obtenido en aerobiosis. Este descenso fue más pronunciado que el observado en 7 mM K-0.5 mM Ca, en que P sólo disminuyó a un  $67 \pm 4$  % de la P obtenida en  $\text{O}_2$  (capítulo 9). No se observaron modificaciones en la presión de reposo (ausencia de contractura), en los tiempos de contracción o relajación, ni en las velocidades relativas  $+P/P$  y  $-P/P$ . Las energías de los tres primeros componentes disminuyeron progresivamente en los sucesivos latidos hipóxicos (Fig. 31 y Tabla 8).



**FIGURA 30:** Disminución progresiva de  $P$  e  $IPt$  en sucesivos latidos hipóxicos en 25 mM K y 2 mM Ca. Las barras indican media  $\pm$  ESM,  $n=5$ . ANOVA:  $p < 0.01$  para ambos parámetros. Ver las comparaciones múltiples en tabla 7.

TABLA 7

Comparación de los parámetros mecánicos de latidos presentados en la Fig. 30 en 25 mM K-2 mM Ca y aerobiosis (O<sub>2</sub>) y sucesivos latidos hipóxicos (N)

a) P:

	O <sub>2</sub>	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5
N-1	I *					
N-2	I *	*				
N-3	I *	*	NS			
N-4	I *	*	*	*		
N-5	I *	*	*	NS	NS	
N-6	I *	*	*	*	NS	NS

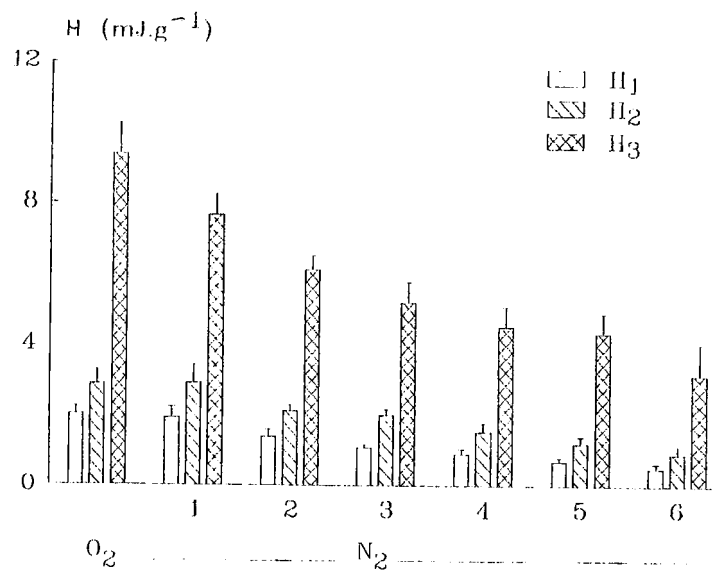
b) IPT:

	O <sub>2</sub>	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5
N-1	I *					
N-2	I *	*				
N-3	I *	*	*			
N-4	I *	*	*	NS		
N-5	I *	*	*	NS	NS	
N-6	I *	*	*	NS	NS	NS

Análisis a posteriori por prueba de rangos de Mann-Whitney.

\*  $p < 0.05$ , NS: no significativo,  $n=5$  en cada condición, todas las condiciones en cada músculo.

La energía del tercer componente, H3, se correlacionó con las P gradualmente disminuídas por el reemplazo de O<sub>2</sub> por N<sub>2</sub> en los sucesivos latidos ( $r=0.7988$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 32). La pendiente de esta recta representa la energía vinculada al ciclaje actomiosínico por unidad de presión desarrollada en hipoxia. Su valor ( $0.17 \pm 0.02 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) resultó un 74 % del obtenido para igual condición (25 mM K y 2mM Ca) en presencia de O<sub>2</sub> (pendiente:  $0.23 \pm 0.08 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $r=0.583$ ,  $n=19$ ,  $p < 0.01$ ). Este resultado es similar al encontrado en los latidos aislados control en hipoxia y reitera la vinculación de H3 con los mecanismos de hidrólisis del ATP actomiosínico y con al menos una fracción



**FIGURA 31:** Disminución de H1, H2 y H3 en los sucesivos latidos aislados hipóxicos en 25 mM K y 2 mM Ca. Barras indican media  $\pm$  ESM, n=5. ANOVA:  $p < 0.01$  para los tres parámetros. Ver las comparaciones múltiples en tabla 8.

de su correspondiente recuperación metabólica aeróbica.

TABLA 8

Comparación de los parámetros energéticos de los latidos presentados en la Fig. 31 en 25 mM K-2 mM Ca y aerobiosis (O<sub>2</sub>) y sucesivos latidos hipóxicos (N)

a) H1:

	O <sub>2</sub>	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	
N-1	I	NS					
N-2	I	NS	NS				
N-3	I	*	*	NS			
N-4	I	*	*	NS	NS		
N-5	I	*	*	*	*	NS	
N-6	I	*	*	*	*	NS	NS

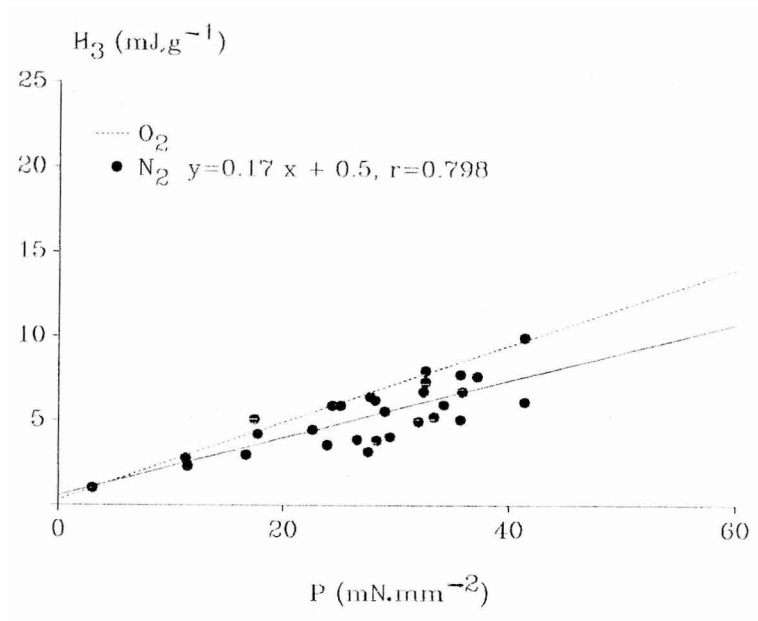
b) H2:

	O <sub>2</sub>	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	
N-1	I	NS					
N-2	I	NS	NS				
N-3	I	NS	NS	NS			
N-4	I	*	*	*	NS		
N-5	I	*	*	*	*	NS	
N-6	I	*	*	*	*	*	NS

c) H3:

	O <sub>2</sub>	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	
N-1	I	NS					
N-2	I	*	*				
N-3	I	*	*	*			
N-4	I	*	*	*	NS		
N-5	I	*	*	*	NS	NS	
N-6	I	*	*	*	*	NS	NS

Análisis por prueba de rangos de Mann-Whitney. \*  $p < 0.05$ , NS: no significativo, n=5 en cada condición, todas las condiciones en cada músculo.



**FIGURA 32:** Correlación de  $H_3$  vs.  $P$  de los sucesivos latidos aislados hipóxicos obtenidos a partir de 5 músculos en 25 mM K y 2mM Ca. Pendiente =  $0.17 \pm 0.02 \text{ mJ}\cdot\text{mN}^{-1}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , ordenada =  $0.5 \pm 1.2 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $p < 0.001$ . La recta punteada indica la correlación obtenida a partir de latidos aislados de 19 músculos en 25 mM K, 2 mM Ca y aerobiosis ( $y = 0.23x + 0.3$ ).

Los tres primeros componentes energéticos del latido aislado en 25 mM K y 2 mM Ca disminuyeron en proporciones similares al desarrollo de fuerza en los sucesivos latidos hipóxicos (Fig. 31). Esto está de acuerdo con el origen común de los eventos vinculados al desarrollo de fuerza (H3) y los de activación (H1 y H2). La disminución de H1 y H2, sugiere que la caída progresiva de P provocada por la hipoxia estaría asociada a una disminución de la disponibilidad de Ca citosólico.

## 5. Conclusiones

a- La contundente dependencia aeróbica de H4 permite caracterizarlo como una manifestación térmica estrechamente acoplada a la respiración mitocondrial.

b- La ausencia de contractura y de cambios en la relación -P/P durante la hipoxia severa sugiere que las reservas de ATP no estarían agotadas.

c- La dependencia de H3 respecto de la fuerza generada en 25 mM K e hipoxia reitera su vinculación con la actividad ATPasa actomiosínica cualquiera sea la condición que modifique el inotropismo, y ratifica la existencia en H3 de una fracción del metabolismo de recuperación.

d- La disminución progresiva que la hipoxia provocó en H1 y H2 sugiere que el inotropismo negativo observado en la hipoxia está asociado a la disminución de la disponibilidad de Ca citosólico.



## Capítulo 12: Efectos del bloqueo de los canales de Ca sobre el comportamiento mecánico-energético de un latido

### 1. Fundamentos y objetivos

De lo descrito en los capítulos precedentes surge que H4 (proceso o procesos acoplados a la respiración mitocondrial) se activa durante una contracción tanto en condición control como en el miocardio despolarizado, por lo que no es dependiente de la corriente de Na<sup>+</sup>. Podría hipotetizarse una vinculación de H4 con la corriente de Ca. Para analizar la vinculación de H4 con la corriente de Ca se estudió el comportamiento de los latidos aislados en el miocardio despolarizado y en el control frente al tratamiento con verapamilo. El verapamilo es una droga que bloquea principalmente a los canales de Ca en el estado inactivado (Kanaya y col. 1983) por lo que su efecto es dependiente del potencial de membrana.

### 2. Efectos del verapamilo sobre el latido aislado en 25 mM K y 2 mM Ca

En 5 experimentos se efectuaron latidos aislados en la condición de despolarización parcial (Krebs-K25) y 2 mM Ca, antes y después del agregado de verapamilo 0.4  $\mu$ M a la perfusión. Tanto P como las energías de los 4 componentes de los latidos aislados previos al tratamiento con verapamilo fueron no significativamente diferentes de los correspondientes a los latidos aislados en 2 mM Ca mostrados en las Fig. 21 a 26 (por prueba de rangos de Mann-Whitney). El primer latido aislado efectuado en presencia de verapamil desarrolló, en promedio, el 60 % de la P que tenía en su ausencia (Fig. 33 y 34). No hubo diferencias significativas en los promedios de P o de las energías de los 4 componentes entre los sucesivos latidos obtenidos en cada músculo en presencia de verapamilo (Fig. 34 y 35, Tablas 9 y 10). Esta característica, sumada a la elevada dispersión estadística de los promedios,

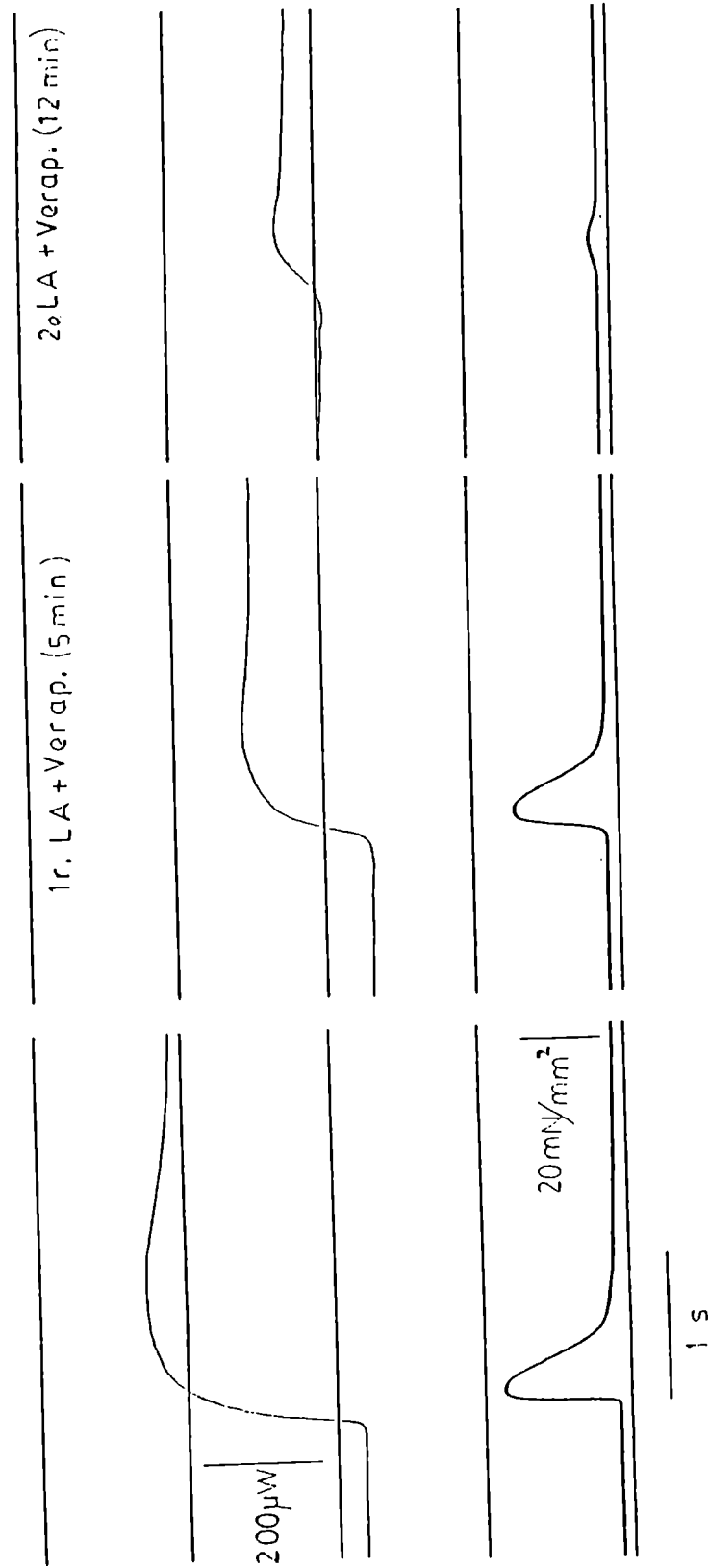
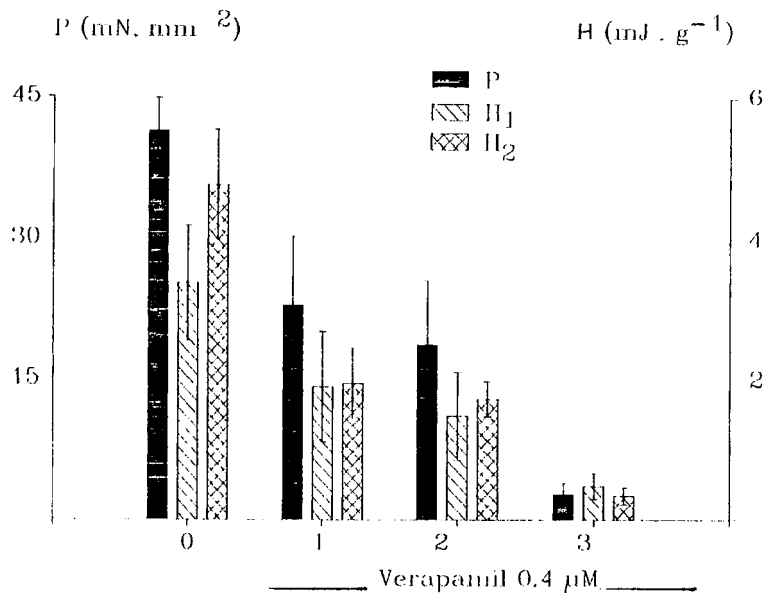


FIGURA 33: Comparación de los primeros 2.5 s de los registros de P y de la producción de calor de latidos aislados en el miocardio parcialmente despolarizado y 2 mM Ca en ausencia y en presencia de verapamilo 0.4  $\mu\text{M}$ . Se indica el tiempo transcurrido en presencia del verapamilo.



**FIGURA 34:** a- Efectos de  $0.4 \mu\text{M}$  de verapamilo sobre  $P$ ,  $H_1$  y  $H_2$  de los sucesivos latidos efectuados en  $25 \text{ mM K}$  y  $2 \text{ mM Ca}$  (0 indica sin verapamilo), las barras expresan medias  $\pm$  ESM de 5, 5, 4 y 2 latidos, respectivamente. ANOVA:  $p < 0.01$  para  $P$ ,  $H_1$  y  $H_2$ . Las comparaciones múltiples se analizan en la tabla 9.

sugiere que el bloqueo respondería a otra variable diferente del número de sucesivos latidos.

Por otra parte, el grado de disminución de H4 (cayó al 12 % en el primer latido) (Fig. 35) fue mucho mayor que los de los otros tres componentes de calor y de P.

TABLA 9

Comparación de los parámetros mecánico-energéticos presentados en la Fig. 34  
latidos aislados en 25 mM K-2 mM Ca (O) y sucesivos latidos tratados con verapamilo (V)

a) Comparaciones múltiples de P:

	O	V-1	V-2
V-1 I	*		
V-2 I	*	NS	
V-3 I	*	NS	NS

b) Comparaciones múltiples de H1:

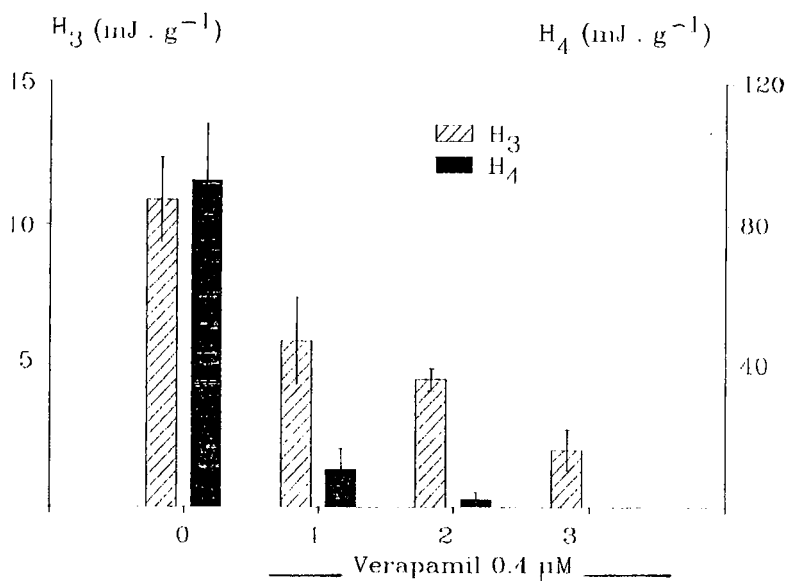
	O	V-1	V-2
V-1 I	NS		
V-2 I	NS	NS	
V-3 I	*	NS	NS

c) Comparaciones múltiples de H2:

	O	V-1	V-2
V-1 I	*		
V-2 I	*	NS	
V-3 I	*	NS	NS

Análisis por prueba de rangos de Mann-Whitney.

\*  $p < 0.05$ , NS: no significativo; n=5, 5, 4 y 2 para O, V-1, V-2 y V-3, respectivamente.



**FIGURA 35:** Efectos de  $0.4 \mu\text{M}$  de verapamilo sobre  $H_3$  y  $H_4$  de sucesivos latidos efectuados en  $25 \text{ mM K}$  y  $2 \text{ mM Ca}$  (0 indica sin verapamilo), las barras expresan medias  $\pm$  ESM de 5, 5, 4 y 2 latidos, respectivamente. ANOVA:  $p < 0.01$  para  $H_3$  y  $p < 0.001$  para  $H_4$ . \* no significativamente diferente de cero. Las comparaciones múltiples se analizan en la tabla 10.

TABLA 10

Comparación de los parámetros mecánico-energéticos presentados en la Fig. 35  
latidos aislados en 25 mM K-2 mM Ca (O) y sucesivos latidos tratados con verapamilo (V)

a) Comparaciones múltiples de H3:

	O	V-1	V-2
V-1	I *		
V-2	I *	NS	
V-3	I *	NS	NS

b) Comparaciones múltiples de H4:

	O	V-1	V-2
V-1	I *		
V-2	I *	NS	
V-3	I *	NS	NS

Análisis por prueba de rangos de Mann-Whitney.

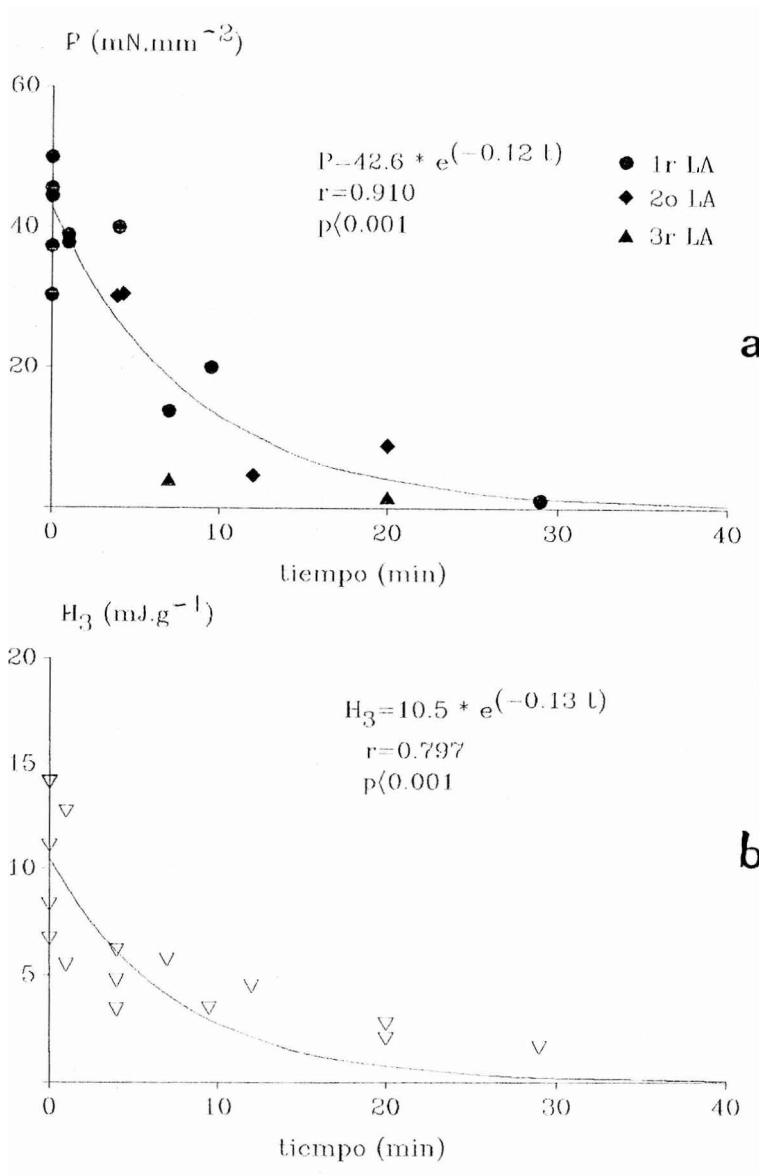
\*  $p < 0.05$ , NS: no significativo;  $n=5, 5, 4$  y  $2$  para O, V-1, V-2 y V-3, respectivamente.

Dado que el verapamilo bloquea a los canales en estado inactivado, se hipotetizó que su efecto sobre los latidos aislados podría ser consecuencia de un bloqueo de los canales durante el reposo previo y no ser debido al número de estimulaciones. Como se presentó en el capítulo 10, el verapamilo inhibió progresivamente al  $\dot{H}_i$  en 25 mM K y 2 mM Ca. Para evaluar la hipótesis se analizó el desarrollo de P del primer latido aislado efectuado en cada músculo en función del tiempo de exposición al verapamilo. P disminuyó en forma monoexponencial en función del tiempo de bloqueo ( $r=0.898$ ,  $p < 0.001$ , parámetro pre-exponencial:  $42.0 \pm 2.7 \text{ mN}\cdot\text{mm}^2$ , constante:  $-0.09 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ ). Luego se analizaron conjuntamente las P de los dos o tres latidos sucesivos obtenidos en cada músculo en función del tiempo de exposición al verapamilo. No se obtuvieron diferencias entre los parámetros de la función de ajuste monoexponencial del conjunto de latidos y los respectivos parámetros de ajuste del primer latido aislado

(Fig. 36a, Tabla 11). Esto implica que el grado de bloqueo es principalmente función del tiempo de exposición a verapamil del tejido despolarizado, y no del número de latidos aislados efectuados. Los componentes de calor H1, H2 y H3 exhibieron constantes exponenciales de tiempo de bloqueo similares a la de P y parámetros pre-exponenciales similares a sus respectivos valores en ausencia de verapamil (Fig. 36b y 37, Tabla 11). Al igual que por variación de la  $[Ca]_e$ , las energías del tercer componente resultaron correlacionarse con P ( $r=0.696$ ) y con  $I_{Pt}$  ( $r=0.672$ ) con pendientes estadísticamente no diferentes de las obtenidas a  $[Ca]_e$  constante o por variación de la  $[Ca]_e$ .

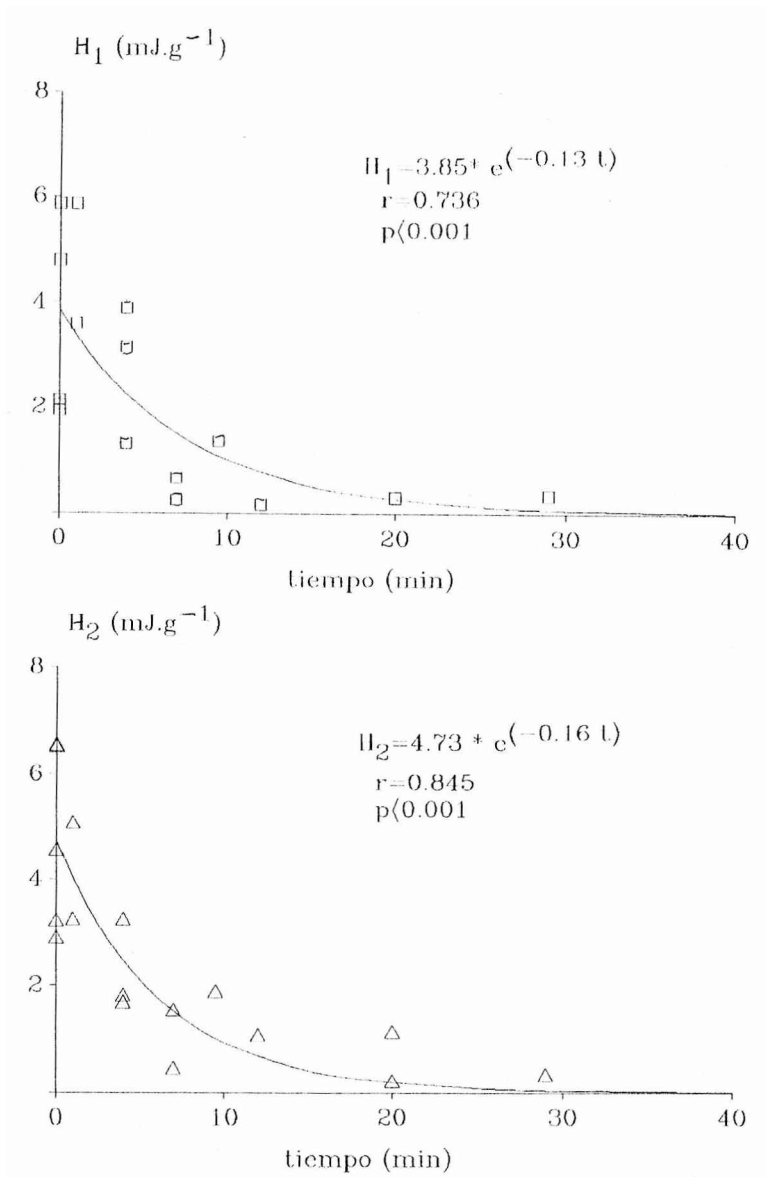
A diferencia de los otros componentes, H4 fue inhibido por el verapamilo en forma independiente del tiempo (Fig. 38) aún en los latidos en que P fue escasamente afectado. Esto indica que H4 es más sensible al bloqueante cálcico que P.

Los efectos del verapamilo en 25 mM K, que no revirtieron por el reposo entre latidos, pudieron ser revertidos después de 5 minutos del cambio a la  $[K]_e$  de 7 mM, aún en presencia de verapamilo. Los parámetros mecánicos y energéticos aumentaron alrededor de 10 veces en el primer latido efectuado después del cambio desde 25 mM K-2 mM Ca a 7 mM K-0.5 mM Ca, ambos en presencia de verapamil. El primer latido en 7 mM K posterior al bloqueo recuperó cualitativamente el patrón energético de un latido aislado control con reaparición del cuarto componente. Los parámetros mecánicos y energéticos resultaron en promedio un  $66.4 \pm 3.4$  % de los correspondientes al latido aislado control inicial previo a la despolarización y el bloqueo con verapamilo.

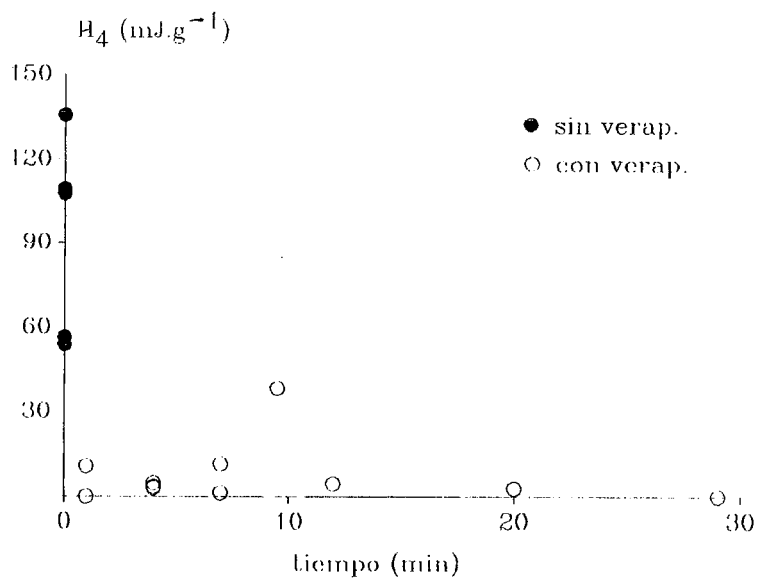


**FIGURA 36:** Dependencia de la presión desarrollada (a) y del componente de calor asociado a la misma (b) respecto del tiempo transcurrido en presencia de verapamilo en el miocardio despolarizado y 2 mM Ca. En (a) se muestran con distintos símbolos los puntos correspondientes al 1o., 2o. y 3r. latido aislado efectuado en cada músculo.





**FIGURA 37:** Dependencia de los dos primeros componentes de calor de un latido efectuado en 25 mM K y 2 mM Ca respecto del tiempo transcurrido en presencia de verapamilo.



*FIGURA 38: Variación del cuarto componente de calor de un latido aislado efectuado en 25 mM K y 2 mM Ca respecto del tiempo transcurrido en presencia de verapamilo.*

TABLA 11

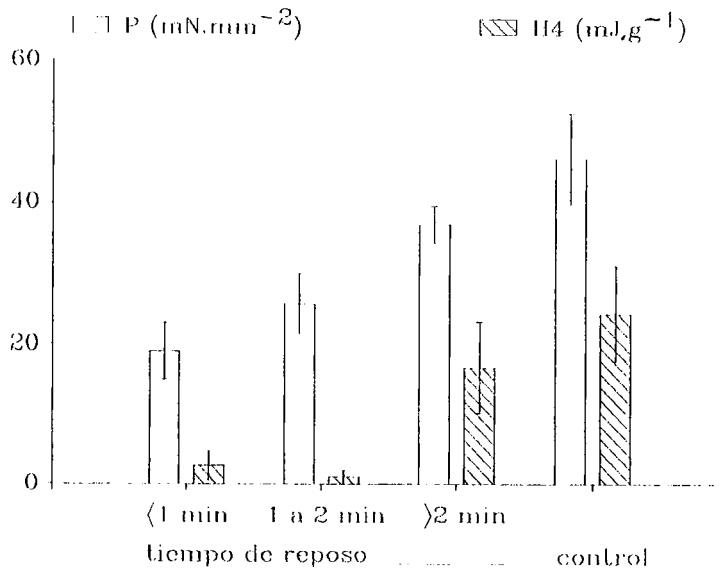
Bloqueo de los parámetros mecánico-energéticos de los latidos aislados en el miocardio despolarizado y 2 mM Ca dependiente del tiempo de exposición al verapamilo.

Función de ajuste: $\Lambda_t = A_0 \cdot e^{(-b \cdot t)}$				
Parámetro	$A_0$	$b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$r$	Sin verapamilo
P ( $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ )	$42.6 \pm 2.86$	$0.118 \pm 0.024$	0.910	$41.4 \pm 3.43$
H1 ( $\text{mJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$3.85 \pm 0.55$	$0.134 \pm 0.056$	0.737	$3.35 \pm 0.73$
H2 ( $\text{mJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$4.73 \pm 0.45$	$0.163 \pm 0.045$	0.845	$4.75 \pm 0.70$
H3 ( $\text{mJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$10.5 \pm 1.06$	$0.133 \pm 0.040$	0.797	$10.9 \pm 1.51$

En todas las correlaciones:  $p < 0.001$

### 3. Efectos del verapamilo sobre el latido aislado en condición control

El componente H4 representa a una actividad estrechamente acoplada a la respiración mitocondrial tanto en el latido aislado control como en el latido aislado del miocardio despolarizado. Sin embargo, hay diferencias considerables de magnitud entre ambas condiciones. Estas diferencias están vinculadas al Ca en el miocardio despolarizado. Para determinar si H4 del latido aislado control también está vinculado al influjo de Ca por canales se analizaron latidos aislados con variable grado de bloqueo. El verapamilo no bloqueó a un latido posterior a un reposo mayor de 5 minutos en el miocardio polarizado (7 mM K). Por lo tanto, en primer lugar se debió estimular repetidamente al músculo para conseguir el bloqueo y utilizar una dosis un orden de magnitud superior. La estimulación a 0.2 Hz en presencia de verapamilo 4  $\mu\text{M}$  anuló el desarrollo de fuerza en el tercer a cuarto latido del tren.



**FIGURA 39:** Reversión del bloqueo inducido por verapamilo en el desarrollo de presión (P) y en la energía H4 de un latido aislado en 7 mM K y 0.5 mM Ca después de diversos períodos de reposo (n= 6, 4, 5 y 4, respectivamente). Ver el análisis estadístico en la tabla 12.

TABLA 12

Comparación de los parámetros mecánico-energéticos presentados en la Fig. 39 latidos en 7 mM K-0.5 mM Ca y verapamilo luego de variables períodos de reposo.

a) Comparaciones múltiples de P:

	<1 min	1-2 min	>2 min
1-2 min I	NS		
>2 min I	*	NS	
control I	*	*	NS

b) Comparaciones múltiples de H4:

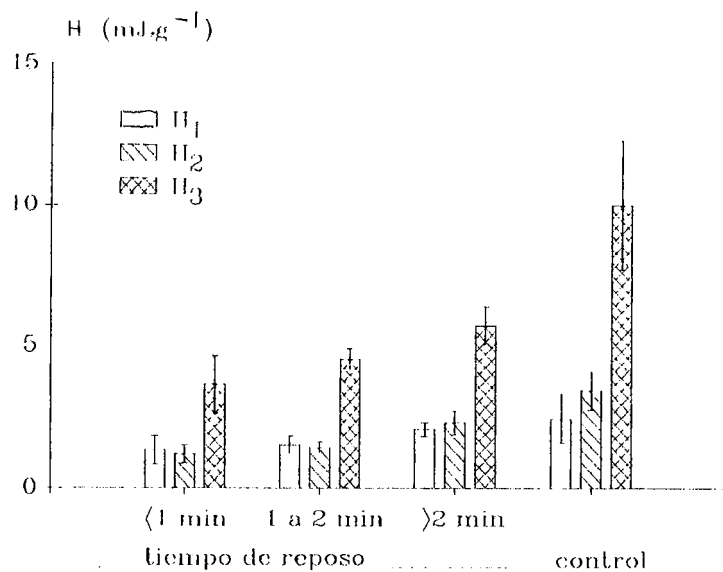
	<1 min	1-2 min	>2 min
1-2 min I	NS		
>2 min I	*	*	
control I	*	*	NS

Análisis por prueba de rangos de Mann-Whitney (Siegel, 1990).

\*  $p < 0.05$ , NS: no significativo; n=6, 4, 5 y 4 en < 1 min, 1-2 min, >2 min y control, respectivamente.

Seguidamente, se suspendió la estimulación permitiendo reposos mecánicos de variable duración (mayores de 50 s). Luego de ese período, y registrando el trazado miotérmico, se efectuó un latido aislado. Ese protocolo se realizó repetidamente en 4 músculos. P y las energías de los cuatro componentes de los latidos previo al tratamiento fueron no significativamente diferentes de los presentados en la Tabla 1 (por prueba de rangos de Mann-Whitney). Luego del bloqueo con verapamilo, P se recuperó en forma dependiente de la duración del reposo posterior al bloqueo (Fig. 39). La Fig. 39 muestra que H4 tuvo una cinética de recuperación ( $t_{1/2} > 2$  min) mucho más lenta que P ( $t_{1/2} < 1$  min). Los otros componentes de calor fueron desbloqueados en tiempos y grados comparables a los de P (Fig. 40).

Los resultados indican que los componentes energéticos asociados a la activación por  $\text{Ca}^{+2}$  (H1 y H2) y al ciclaje actomiosínico (H3) dependerían del mismo  $\text{Ca}^{+2}$  activador de la contracción disparado por el influjo de los canales de Ca. En cambio, el efecto en H4 estaría manifestando que el proceso celular asociado al mismo sería inhibido por verapamil por una vía diferente al bloqueo de la corriente de Ca.



**FIGURA 40:** Reversión del bloqueo inducido por verapamilo en las energías  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$  de un latido aislado en 7 mM K y 0.5 mM Ca después de diversos períodos de reposo ( $n = 6, 4, 5$  y  $4$ , respectivamente). Ver el análisis estadístico en la tabla 13.

TABLA 13

Comparación de los parámetros mecánico-energéticos presentados en la Fig. 40 latidos en 7 mM K-0.5 mM Ca y verapamilo luego de variables períodos de reposo.

a) Comparaciones múltiples de H1:

	< 1 min	1-2 min	> 2 min
1-2 min I	NS		
> 2 min I	NS	NS	
control I	*	*	*

b) Comparaciones múltiples de H2:

	< 1 min	1-2 min	> 2 min
1-2 min I	NS		
> 2 min I	*	*	
control I	*	*	NS

c) Comparaciones múltiples de H3:

	< 1 min	1-2 min	> 2 min
1-2 min I	NS		
> 2 min I	NS	NS	
control I	*	*	NS

Análisis por prueba de rangos de Mann-Whitney.

\*  $p < 0.05$ , NS: no significativo; n=6, 4, 5 y 4 en < 1 min, 1-2 min, > 2 min y control, respectivamente.

#### 4. Conclusiones:

a- El grado de bloqueo de los parámetros mecánico-energéticos por el verapamilo en el miocardio parcialmente despolarizado es función del grado de bloqueo de los canales de Ca activados durante el reposo mecánico previo y no depende del número de estimulaciones previas.

b- Los procesos de activación por  $Ca^{+2}$  (manifestados en H1 y H2) y de acoplamiento



actomiosínico y recuperación metabólica (asociados a H3) dependerían, al igual que el desarrollo de fuerza P, del mismo  $Ca^{12}$  activador dependiente de la corriente de  $Ca^{12}$  (pues exhiben iguales cinéticas de bloqueo y desbloqueo por el verapamilo).

c- H4 fue inhibido por el verapamilo aún cuando P fue escasamente inhibido en el miocardio despolarizado y se desbloqueó mucho más lentamente que P al retornar a la condición control. Ambos resultados sugieren que el mecanismo asociado a H4 sería directamente afectado por el verapamilo, mediante una vía diferente a la del bloqueo de la corriente de Ca que dispara la contracción.

d- Con un prolongado reposo en el miocardio repolarizado, el bloqueo por verapamilo debido a despolarización o estimulación repetida fue revertido. Esto implica que, tanto los eventos del ciclo contráctil como la actividad Ca-dependiente acoplada a la respiración mitocondrial, responden a la reversión del bloqueo del influjo de Ca y/o a la remoción del verapamilo de sus sitios de acción.

## ***DISCUSSION***

### Capítulo 13: Vinculación de los componentes energéticos con mecanismos celulares de una contracción miocárdica:

Esta tesis analiza el patrón mecánico-energético de contracciones musculares cardíacas. De ese análisis es posible extraer conclusiones acerca de la utilización de la energía química por diversos eventos celulares.

Cuando un músculo es colocado en el interior de la cámara del calorímetro de flujo utilizado (Ponce-Hornos y col., 1982a), se registra un flujo de calor constante (calor de reposo) que representa al metabolismo basal. Durante la contracción, el registro del flujo de calor revela la existencia de varios componentes miotérmicos sobre el flujo de calor de reposo (Fig. 3 y 4). La diferenciación de componentes individuales en las respuestas miotérmicas ha sido abordada hasta el momento mediante un análisis originalmente propuesto por Bugnard en 1934 y aplicado a las mediciones efectuadas con termopilas (Alpert y Mulieri, 1982a). Dado que ese análisis asume secuencialidad entre los componentes miotérmicos (ver capítulo 3, punto 5) su aplicación implicaría asumir que ciertos eventos celulares se producirían luego de finalizada la contracción. Por ejemplo, la aplicación del análisis de Bugnard al registro calorimétrico de un latido aislado asumiría que las fracciones de calor que registran su máximo a  $\approx 10$  s y  $\approx 100$  s, comenzarían a generarse después de  $\approx 1$  s y  $\approx 10$  s, respectivamente. Considerando que dichas fracciones pueden incluir (como posteriormente se demostró) el calor asociado al ciclaje actomiosínico resulta imposible asumir tal desfasaje entre los eventos de una contracción. La imposibilidad de aplicar ese método al registro miotérmico de un latido aislado hizo necesario analizar cómo responde el sistema calorimétrico a generaciones de calor de corta duración, del orden de las asociadas a los eventos de una contracción.

Dado que el sistema calorimétrico empleado (Ponce-Hornos y col. 1982a) integra la respuesta

a un flujo de calor liberado con una cierta demora (Ponce-Hornos y col., 1992) el análisis de las generaciones cortas de calor requirió un estudio previo. Registros calorimétricos a alta sensibilidad mostraron la existencia de una sigmoidicidad inicial en la respuesta a un flujo de calor mantenido y constante. Esta respuesta pudo ser representada por una función difusional para lámina plana (Crank, 1956), que considera un retardo exponencial en la detección del flujo de calor por las unidades termosensibles. Siempre que se considere el registro calorimétrico mientras está activada la fuente de calor, la función difusional permite estimar la potencia que está siendo liberada (Fig. 6). Cuando la generación de calor es prolongada, la liberación de un flujo de calor constante se refleja en una meseta luego de alrededor de 80 a 100 s. Por el contrario, una respuesta calorimétrica creciente a tiempos mayores al de integración refleja el crecimiento en el flujo de calor liberado dentro de la cámara. En cualquiera de esas generaciones de calor mantenidas, las correspondientes funciones difusionales permiten estimar parámetros como el flujo de calor (constante o máximo) o la velocidad de aumento lineal o exponencial del mismo. Es decir que, para los eventos exotérmicos que duran más que el tiempo de integración, el registro calorimétrico refleja la cinética del proceso.

En el caso de que las generaciones de calor sean de corta duración (inferior al tiempo de integración de la respuesta) la potencia constante liberada aún puede estimarse siempre que se considere el período previo a la desactivación de la fuente de calor (Fig. 6). Esto requiere saber cuándo se desactiva el evento exotérmico. Si se trata de los eventos celulares de una contracción, el tiempo de desactivación de los mismos es desconocido. Tampoco se conoce la forma del pulso de calor liberado por un evento celular. El hecho de que se desconozca la duración del pulso de calor corto no impide estimar la energía liberada en el mismo, la cual puede calcularse integrando la función de ajuste hasta el tiempo de máxima respuesta de calor (Ec. 8 y 10, Fig. 7). Por otra parte, es posible calcular la energía liberada en un pulso corto independientemente de la forma del mismo. Esto implica que

cualquiera que sean la duración o la forma del pulso corto de calor, es posible calcular la energía que se debió liberar en la cámara para producir una dada inflexión ascendente del registro calorimétrico. Por lo tanto, el método de resolución de componentes permite calcular la energía liberada por un evento celular de corta duración sin especular acerca de la duración del proceso ni de la forma del pulso de calor.

En una respuesta calorimétrica formada por varios máximos y puntos de inflexión, la diferenciación de componentes de calor puede ser efectuada por ajuste del registro a una combinación lineal de funciones difusionales simples. Esta combinación resultó efectiva en la determinación del número y de las energías individuales de diversas fuentes de calor aplicadas simultáneamente dentro de la cámara con diferentes tiempos de desactivación. Un desfasaje de 200 ms en el tiempo de aplicación de dos fuentes no originó diferencias en la respuesta calorimétrica respecto de la aplicación simultánea. De acuerdo a esto es posible asumir, en este rango, inicios de generación simultáneos en los componentes de calor de una contracción miocárdica. Esto es importante, ya que si bien la unión de Ca a TnC y el ciclaje actomiosínico podrían iniciarse desfasados, este desfasaje sería menor que 200 ms (Chapman, 1983). A pesar de esto, en ocasiones se han elegido arbitrariamente los tiempos de duración o desfasaje (Alpert y Mulieri, 1982a). Esta arbitrariedad es probablemente involuntaria y surge de la utilización del método de Bugnard que implica análisis secuencial.

Una combinación lineal de tres componentes difusionales transitorios más uno mantenido por alrededor de 80 a 150 s fue estadísticamente la mejor resolución obtenida para las curvas de calor de un latido aislado. En el calor liberado por un latido en estado estacionario se diferenciaron temporalmente tres componentes y una fracción suprabasal calculable por diferencia. Eso implica una resolución con un mayor número de componentes que el descrito hasta el momento en una contracción miocárdica (Mulieri y Alpert, 1982; Chapman y Gibbs, 1974). Con el método de las termopilas se ha logrado la

resolución de dos componentes y una fracción calculable por diferencia en una contracción estacionaria (Alpert y Mulieri, 1982a). El componente descrito en esta tesis como H4 no fue detectado por el método de las termopilas y se lo incluía en la fracción diferencia. La razón principal es que con las termopilas no se realizan mediciones a tiempos tan prolongados después de una contracción (generalmente no se determinan contracciones aisladas) o después del cese de la estimulación estacionaria. Eso último se ha debido fundamentalmente a que, para efectuar la medición, el músculo debe ser removido del baño con lo que períodos prolongados de medición podrían generar períodos "isquémicos". Por otra parte, con los métodos de termopilas se ha utilizado la eliminación del desarrollo de fuerza para registrar sólo el calor de eventos independientes de la misma (por pre-acortamiento, con hiperosmolaridad, o por liberación rápida) (Mulieri y Alpert, 1982; Gibbs y col., 1988, ver Introducción). En cambio, el método aquí utilizado permitió, en presencia de desarrollo de fuerza, la cuantificación simultánea de diversas fracciones. Esto implica una menor interferencia en los eventos determinantes del calor independiente de la fuerza, como la liberación de  $\text{Ca}^{12}$ , su unión a TnC o la actividad de las bombas de Ca. Como se mencionase, el método de las termopilas somete al músculo a una condición más injuriosa ya que el músculo debe ser removido de la solución en que estaba sumergido antes de efectuar la medición. Esto sólo permite estimular al músculo repetidamente durante un corto período fuera de la solución (Alpert y Mulieri, 1982a; Gibbs y col., 1988).

Las mediciones calorimétricas del calor de reposo del ventrículo de rata ( $4.1 \pm 0.2 \text{ mW.g}^{-1}$ ) resultaron similares a las reportadas por el método de las termopilas en ventrículo de rata (Holubarsch y col., 1985) y en células aisladas de ventrículo de rata (Ponce-Hornos y col., 1990). El calor total promedio por latido estacionario ( $14.2 \text{ mJ.g}^{-1}$ ) es similar al reportado en el músculo papilar de rata estimulado a 0.2 Hz ( $12.5$  a  $15 \text{ mJ.g}^{-1}$ ) (Holubarsch y col., 1982; Holubarsch y col., 1985).

En el ciclo contracción-relajación cardíaco, los eventos celulares obligados que producen

liberación de calor al hidrolizar ATP son el ciclaje actomiosínico y la remoción activa de iones, principalmente  $\text{Ca}^{+2}$ . Además, la unión de  $\text{Ca}^{+2}$  a sitios enlazantes específicos (TnC) e inespecíficos y la actividad mitocondrial de síntesis del ATP consumido son procesos exotérmicos. Un único componente (H3) resultó correlacionable linealmente con la presión intraventricular desarrollada (P) y con el mantenimiento de la misma (IPt) y por ende vinculable al ciclaje actomiosínico. La correlación fue similar para latidos aislados y estacionarios, lo cual indica que los cambios inotrópicos dependientes de la frecuencia no modifican la economía muscular. La relación H3/P ( $0.23 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) fue comparable a las estimaciones de calor por unidad de fuerza obtenidas por otros métodos ( $0.22$  a  $0.33 \text{ mJ} \cdot \text{mN}^{-1} \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) (Alpert y Mulieri, 1982a; Gibbs, 1987). Estas estimaciones provienen de la pendiente de la relación de calor total vs. fuerza en papilar de conejo en estado estacionario pre-acortado gradualmente. Puesto que H3 es el único componente del calor total que varía con P, la relación H3/P puede ser comparada con aquellas estimaciones. Expresada la relación H3/P en su forma adimensional ( $P/H3 \cdot \delta_{\text{músculo}}$ ) se obtiene el "coeficiente isométrico de calor" (CIQ) como índice de la economía muscular. Los resultados muestran un  $\text{CIQ} = 4.1 \pm 0.5$  ( $\delta_{\text{músculo}} = 1.06 \text{ g/cm}^3$ , Hill 1965) para los latidos aislados y estacionarios en condición control ( $7 \text{ mM K}$  y  $0.5 \text{ mM Ca}$ ). Puesto que en el músculo esquelético es donde mejor se ha podido separar la fracción de calor asociada al ciclaje actomiosínico respecto de las fracciones independiente de la fuerza y de recuperación, su CIQ sería la mejor estimación de economía muscular para el desarrollo de fuerza. En el músculo esquelético se han descrito CIQ de 8 a 10 (Hill, 1965; Alpert y Mulieri, 1982a). El CIQ obtenido en los presentes resultados está muy alejado de ese valor, lo cual sugiere que H3 contendría una fracción de calor mayor que la liberada sólo por el ciclaje de ATP actomiosínico. De hecho, en los experimentos realizados en hipoxia el CIQ aumentó a 5.5, indicando que parte del calor contenido en H3 es sensible al  $\text{O}_2$  y posiblemente debido a la resíntesis de ATP por fosforilación oxidativa. El CIQ obtenido en la hipoxia aún está alejado del

de 7.9 estimado en músculo cardíaco a partir del consumo de fosfocreatina en anoxia (Pool y Sonnenblick, 1967) o del reportado para músculo esquelético. Es posible que la diferencia se deba a la falta de eliminación total de la fracción de recuperación. Esto puede deberse a una permanencia del  $O_2$  del medio (por permeación a través del sistema y la atmósfera circundante) y/o a la estimulación de la glicólisis anaeróbica (Ponce-Hornos y col., 1982a). En este sentido, el flujo de calor de reposo obtenido en hipoxia ( $2.9 \pm 0.5 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue superior al esperable para la formación anaeróbica de lactato medida en el miocardio (Ponce-Hornos y col., 1982a; Dietrich y Elzinga, 1992). Por lo tanto, el calor de reposo indica la existencia de una utilización de energía química adicional a la esperable sólo para el metabolismo anaeróbico. Una posible contribución aeróbica podría entonces explicar la escasa disminución de la relación H3/P durante la hipoxia.

Existe una gran indefinición en la bibliografía especializada acerca de cuándo se recupera el ATP consumido en un latido cardíaco. Mientras que Gibbs asume cierto grado de simultaneidad (Gibbs y Chapman, 1979a), Alpert y col. sostienen la hipótesis de no diferenciación temporal (Alpert y Mulieri, 1982a; Holubarsch y col. 1982). Los presentes resultados muestran que dos componentes, H3 y H4, son sensibles a la hipoxia. Sin embargo, en el caso de H4 existen resultados que hacen difícil su definición como fracción responsable de la recuperación. Entre ellos cabe destacar la independencia de H4 respecto de la demanda (no crece linealmente con el número de latidos repetidos ni con P), su escasa participación en el latido de un tren estacionario (la FSB es un 15% del calor por latido) o su virtual desaparición en el latido obtenido en el miocardio despolarizado y 0.5 mM Ca. Por lo tanto, el calor de recuperación del ATP debería estar mayoritariamente contenido en H3, puesto que H1 y H2 no disminuyeron por hipoxia. La relación entre las entalpías de hidrólisis y de resíntesis de ATP es alrededor de 1:1 (Curtin y Woledge, 1978). Si H3 reflejara el ciclaje actomiosínico y la recuperación de todo el ATP consumido (incluido el utilizado en la remoción de  $Ca^{+2}$  manifestada como H2), el calor



correspondiente al ciclaje actomiosínico resultaría aproximadamente igual a  $(H1-H2)/2$ . Expresada esa fracción de calor como cociente respecto de  $P$ , se obtiene un CIQ de alrededor de 11. Este valor es comparable al descrito para músculo esquelético (Hill, 1965). Esto sugiere que, dentro de los límites de detección de este sistema calorimétrico, la recuperación parece desarrollarse simultáneamente con el ciclaje actomiosínico (en H3).

El hecho de que  $H1$  y  $H2$  sean independientes de la fuerza desarrollada y aparezcan tempranamente los señalan como candidatos al que en músculo esquelético ha sido definido como "calor de activación" o "calor independiente de la fuerza" (Hill, 1965; Mulieri y Alpert, 1982; Gibbs y col., 1988). En músculo esquelético se ha informado, a  $0^\circ$  y  $15^\circ\text{C}$ , la existencia de dos componentes en el calor independiente de la fuerza medido por estiramiento del músculo (Mulieri y Alpert, 1982). Los mismos han sido adjudicados a unión de  $\text{Ca}$  a  $\text{TnC}$  y a la remoción citosólica del mismo, respectivamente, y guardan una magnitud relativa de 0.4:0.6 (Mulieri y Alpert, 1982). La misma diferenciación ha sido mucho menos notoria y de menor magnitud en el calor de activación medido en papilar en medio hiperosmótico (Mulieri y Alpert, 1982). En general,  $(H1 + H2)$  resulta superior a las estimaciones obtenidas por pre-acortamiento gradual ( $1.6 \text{ mJ.g}^{-1}$ ) o por el método de manitol hiperosmótico ( $1.1 \text{ mJ.g}^{-1}$ ) en el papilar de rata (Loiselle y Gibbs, 1979; Mulieri y Alpert, 1982; Gibbs y col., 1988). Estas intervenciones han sido criticadas por alterar la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  (Gibbs y col., 1988). La condición de longitud óptima es mantenida durante la activación del músculo en el método de "quick-release" (el músculo es activado a longitud óptima y luego es rápidamente acortado a fin de evitar el desarrollo de fuerza). Si bien no se han informado valores de calor de activación en ventrículo de rata por ese método, las mediciones realizadas en papilar de conejo ( $2.6$  a  $4 \text{ mJ.g}^{-1}$  según la  $[\text{Ca}]_i$ ) son más elevadas que las obtenidas en el mismo tejido por pre-acortamiento o hiperosmolaridad (Gibbs y col., 1988). Así, la conservación de la osmolaridad y de la longitud óptima rinde valores de calor de activación más elevados

que los tratamientos que alteran esas condiciones. En los presentes experimentos, la magnitud conjunta  $H1 + H2$  (4.4 a 4.8  $\text{mJ.g}^{-1}$ ) y la magnitud relativa ( $H1$  es el 40 % de la suma) resultan compatibles con las estimaciones de calor de activación de músculo esquelético obtenidas por Homsher (1.02  $\text{mcal.g}^{-1}$ ) y por Mulieri y Alpert (0.87  $\text{mcal.g}^{-1}$ ) (Mulieri y Alpert, 1982). A esto debe agregarse que las posibles evaluaciones han sido efectuadas sin alterar al músculo en su longitud inicial o en su capacidad de generar fuerza.

Los latidos efectuados a diversas  $[\text{Ca}]_i$  en 25 mM K muestran que  $H1$  y  $H2$  son dependientes de la  $[\text{Ca}]_i$  (Fig. 25). Los resultados están de acuerdo con la hipótesis planteada por Mulieri y Alpert de que las dos fases de calor de activación de músculo esquelético se asociarían a la unión de Ca a TnC y a la remoción de Ca, respectivamente (Mulieri y Alpert, 1982). La unión de Ca a TnC conduce a un aumento de la presión intraventricular desarrollada. Además, la ausencia de  $H1$  en el calor liberado por la extrasistolia indica que el proceso, cuya manifestación térmica es  $H1$ , no se activa por el segundo estímulo pareado (Fig. 15 y 16). La coincidencia de que esta extrasistolia no se acompañe de cambios en la P generada (que a longitud constante implicaría que tampoco existen cambios en la unión de Ca a TnC) refuerza la asociación de  $H1$  con el calor de unión de  $\text{Ca}^{+2}$  a TnC.

Cálculos aproximados de calor de la unión de Ca a Tn-C y de la remoción del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico pueden cotejarse con los valores obtenidos de  $H1$  y  $H2$ . La liberación de calor para la saturación de la TnC con  $\text{Ca}^{+2}$  sería de 2.6 a 3.2  $\text{mJ.g}^{-1}$  (asumiendo 0.1 g miofibrillas. $\text{g}^{-1}$  de músculo, una entalpía de unión Ca-TnC de -26 a -32  $\text{kJ.mol}^{-1}$  de sitio de unión de Ca, una estequiometría de 1  $\text{Ca}^{+2}$  : 1 Tn-C y 1  $\mu\text{mol Ca.g}^{-1}$  de miofibrillas; Hofmann y Fuchs, 1987; Imaizumi y col., 1990; Mulieri y Alpert, 1982). El valor promedio de  $H1$  obtenido en condición control (1.9  $\text{mJ.g}^{-1}$ ) sugeriría un 59 a 73 % de saturación de la TnC. Este grado de saturación de Tn-C es compatible con el valor de P promedio medido de 33.4  $\text{mN.mm}^{-2}$ , puesto que en fibra pelada se ha reportado un 70 % de saturación de TnC

para este rango de fuerza (Hofmann y Fuchs, 1987). Por lo tanto, los valores de H1 también son compatibles con el grado de unión de Ca a TnC esperable para la P desarrollada.

El segundo componente de calor transitorio e independiente de la fuerza (H2) podría, por su dependencia de la [Ca], estar vinculado a los mecanismos de remoción (Ca-ATPasas e intercambiador Na/Ca). Aunque no se han obtenido evidencias experimentales unívocas que indiquen el origen de H2, algunos cálculos permiten contrastar esta interpretación. La energía necesaria para la remoción del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico puede estimarse teóricamente a partir de la cantidad de Ca enlazado a Tn-C. Con una entalpía de hidrólisis de PCr de  $-44 \text{ kJ.mol}^{-1}$  y asumiendo las posibilidades extremas de participación total de la Ca-ATPasa del RS (estequiometría de 2Ca/ATP) o de la Ca-ATPasa del sarcolema (1Ca/ATP) el calor de remoción de la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  asociada a TnC (estimable a partir del H1 promedio) estaría comprendido entre 1.3 y 3.2  $\text{mJ.g}^{-1}$  (sin incluir la recuperación aeróbica del ATP consumido). Los valores de H2 están en ese rango, lo cual es compatible con que H2 esté asociado a la remoción de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico.

Caracterizados los tres componentes transitorios de calor por su asociación con eventos celulares involucrados en el ciclo contracción-relajación, cabe preguntarse cuál es el origen de H4. Su notable sensibilidad a la hipoxia demuestra su vinculación mitocondrial. Se ha indicado que la presión parcial de  $\text{O}_2$  podría controlar directamente a la respiración mitocondrial (Balaban y Heineman, 1989) y es conocido que ésta regula a la fosforilación oxidativa. Por otra parte, H4 y la FSB del latido estacionario demostraron provenir del mismo proceso y, como se discutió anteriormente, la FSB representaría una escasa proporción de la recuperación metabólica del ATP esperable en un latido estacionario. Por lo tanto, la energía H4 del latido aislado ( $\approx 50\%$  del calor total) debe representar a otra actividad dependiente de la respiración mitocondrial y activable durante un latido. Esa actividad crece durante las primeras tres estimulaciones repetidas hasta originar la FSB de un tren estacionario, probablemente por

alcanzarse un nivel estacionario en el estímulo disparador que, como se observó en el miocardio despolarizado, estaría vinculado al Ca. La existencia de esta FSB no descrita anteriormente por los métodos de termopilas tiene consecuencias importantes. La principal es que estaría incluida en el calor independiente de la generación de fuerza determinado cuando el músculo es gradualmente preacortado (Gibbs y Chapman, 1979a; Gibbs y col., 1988). Por lo tanto, la estimación del calor independiente de la fuerza como la ordenada al origen de la correlación de calor total vs. fuerza podría estar sobreestimada por la FSB.

## Capítulo 14: Energética de la participación del Ca extracelular en la contracción miocárdica:

### 1- Modificaciones en la disponibilidad de Ca extracelular

#### a- Dependencia al Ca extracelular del calor de reposo del miocardio despolarizado

La despolarización parcial con 25 mM K incrementó en dos fases (transitoria y estacionaria) al  $\dot{H}_r$ , al igual que lo reportado para 50 mM K (Ponce-Hornos y col., 1992). Estudios previos describieron que el 95 % del aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario provocado por 50 mM K (en 0.5 mM Ca) es debido a estimulación de la actividad de la Na,K-ATPasa (Ponce-Hornos y col., 1992). Posteriores aumentos de la  $[Ca]_e$  dieron nuevos aumentos bifásicos en el  $\dot{H}_r$ , sin que se modificara considerablemente la presión de reposo. Es conocido que el  $\dot{H}_r$  no varía con la  $[Ca]_e$  en  $[K]_e$  cercanas a la fisiológica (Ponce-Hornos y Taquini, 1986; Loiselle, 1987). Por lo tanto, la dependencia del  $\dot{H}_r$  con la  $[Ca]_e$  podría vincularse al influjo de Ca, puesto que la despolarización lleva el  $E_m$  a un valor cercano al de activación de los canales de Ca. El Ca ingresado debería ser removido para conservar el reposo mecánico, consumiendo energía química y liberando calor. Esto está avalado por el hecho de que en presencia de verapamilo, el  $\dot{H}_r$  estacionario disminuyó en función del tiempo de exposición al bloqueante de los canales de Ca (Fig. 18). Los resultados sugieren que en estas condiciones existe un ingreso basal de  $Ca^{+2}$  vía canales L, que es removido sin que alcance los miofilamentos. A este respecto conviene destacar que evidencias electrofisiológicas indican que entre -40 mV y -30 mV ( $E_m$  aproximadamente alcanzado con 25 mM K, Molyvdas y Sperelakis, 1983) habría un 6 a 18% de activación de los canales de Ca (Pietrobon y Hess, 1990; Campbell y Giles, 1990; Varró y col. 1993). El hecho de que el verapamilo haya bloqueado a  $\dot{H}_r$  hasta los niveles correspondientes a una  $[Ca]_e = 0.5$  mM (Fig. 18) sugiere que el Ca que ingresaría por esa vía en esta última condición sería una pequeña cantidad.

Alternativamente, podría postularse que el  $\text{Ca}^{+2}$  ingresado en el miocardio despolarizado podría inducir la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  del RS y recaptación del ión en forma cíclica contribuyendo a la meseta del  $\dot{H}_r$ . Sin embargo, la ausencia de cambios del  $\dot{H}_r$  estacionario por tratamiento con 2 mM de cafeína descarta esta posibilidad. Esa concentración de cafeína es capaz de elevar, en  $[\text{K}]_e$  cercana a la fisiológica, al calor de reposo estacionario (Bonazzola y Ponce-Hornos, 1987) por aumento de la liberación y ciclaje de Ca del RS. Ha sido descripto (Ponce-Hornos y col., 1992) que la despolarización (en 0.5 mM Ca) provoca un incremento transitorio de la liberación de calor de reposo que, al ser cafeína-sensible, podría atribuirse a una liberación transitoria de Ca del RS. En consecuencia, la despolarización podría deplecionar parcialmente al RS, hecho que está de acuerdo con que la fuerza desarrollada, aún a  $[\text{Ca}]_e$  saturante sea inferior a la del control (ver Fig. 21). Una parcial depleción del RS en el miocardio despolarizado podría explicar que el Ca del RS no contribuya al aumento estacionario del  $\dot{H}_r$ , y que la cafeína no lo modifique.

La remoción del Ca ingresado por los canales lentos se debería efectuar fundamentalmente a nivel sarcolemal. Si esto así no fuera, la remoción del Ca ingresado por parte del RS implicaría una acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$  en esa organela. Dos mecanismos sarcolemales, el intercambiador  $\text{Na}/\text{Ca}$  o la  $\text{Ca-ATPasa}$ , pueden remover  $\text{Ca}^{+2}$  y ambos lo hacen con una estequiometría de 1 Ca : 1 ATP. Si los cambios en el  $\dot{H}_r$  estacionario provocados por el aumento de la  $[\text{Ca}]_e$  pudiesen atribuirse a cambios en la actividad de los sistemas sarcolemales mencionados (Fig. 17) podrían calcularse flujos de Ca removidos de 12, 25 y 37  $\text{nmol Ca} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  para los cambios de  $[\text{Ca}]_e$  desde 0.5 a 1, 2 y 4 mM Ca, respectivamente. Flujos de Ca de esta magnitud podrían ser removidos por el intercambiador  $\text{Na}/\text{Ca}$ , puesto que se ha descripto un flujo de 75  $\text{nmol Ca} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  por esa vía en una célula latiendo en estado estacionario con 1 mM Ca extracelular (Langer y Rich, 1992). El pequeño aumento observado en la presión de reposo en 4 mM Ca y 25 mM K (3  $\text{mN} \cdot \text{mm}^2$ ) sugiere que en esas condiciones sería más

difícil el mantenimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico de reposo mecánico.

En conclusión, el aumento del  $\dot{H}_r$  estacionario observado por incremento de la  $[\text{Ca}]_e$  en 25 mM K está asociado a la remoción de un flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  ingresado por los canales de Ca, con mantenimiento del reposo mecánico. Esto implica cierta activación basal de los mecanismos sarcolemales de remoción de  $\text{Ca}^{+2}$ .

b- Ca extracelular y energías vinculadas al ciclo contracción-relajación en el miocardio parcialmente despolarizado

Las pendientes de H3 vs. P y de H3 vs. IPt no se modificaron por variación de la  $[\text{K}]_e$  o de la  $[\text{Ca}]_e$ . Esto sugiere que estas modificaciones en el inotropismo debidas a una variación en la disponibilidad de Ca citosólico no alteran la economía muscular para el desarrollo de fuerza. La constancia de la economía muscular frente a la variación de la  $[\text{Ca}]_e$  ha sido descripta en el ventrículo polarizado de perro y de conejo en estado estacionario (Ponce-Hornos y Taquini, 1986). El parámetro de estimación de la economía en ese caso ha considerado el cociente entre la fuerza y el calor total por latido ( $H_a$ ). Si la misma estimación se aplica a los latidos aislados del miocardio de rata despolarizado se obtendría una disminución de ese índice de economía con el aumento de la  $[\text{Ca}]_e$ . Sin embargo, las diferencias se deben fundamentalmente a H4, ya que el cociente adimensional  $P/(H1+H2+H3)$  es constante. Por lo tanto, la disminución de la economía por latido del miocardio de rata despolarizado puede adjudicarse a la actividad mitocondrial Ca-dependiente, mientras la economía para el desarrollo de fuerza no varía con la  $[\text{Ca}]_e$ . Este aspecto puede remarcarse como un claro ejemplo de la importancia que la utilización del cociente adimensional  $P/H3$  (y por ende la diferenciación entre componentes) tiene para la estimación de la economía del desarrollo de fuerza.

La disminución de H1 cuando se despolariza el tejido sugiere una reducción en el nivel de

activación de los miofilamentos, que explicaría la reducción de P. Por otra parte, H1 aumenta con la  $[Ca]_e$  en el miocardio despolarizado hasta saturarse en un valor cercano al H1 control (Fig. 25). La parcial depleción del RS podría contribuir a que no se alcancen grados de unión de  $Ca^{+2}$  a TnC (evaluables como H1) y P superiores a los obtenidos en la condición control. Sin embargo, puesto que la P a  $[Ca]_e$  saturante es algo inferior a la P control mientras H1 es similar, algún otro mecanismo que afecte al desarrollo de fuerza pico podría estar participando. El aumento de H2 en relación al valor control, para un H1 constante, sugiere la participación de un mecanismo de remoción energéticamente más caro. Si bien es especulativo, esto sería posible si hubiese una mayor participación de los mecanismos sarcolemales (1 Ca/ATP) en el latido del miocardio despolarizado.

Un comportamiento dual de la despolarización sobre la relajación puede verse en 4 mM Ca, aumento de la -P/P (ya evidente a menores  $[Ca]_e$  y adjudicable a mayor remoción sarcolemal) seguido por una demora en el tramo final de la relajación (Fig. 19c). Una disminución en la capacidad de retención de Ca por el RS podría desencadenar una demora tardía en la relajación. Evidencias a favor de esta hipótesis son las presentadas en el capítulo 10 y los resultados de Ponce Hornos y col. (Ponce-Hornos y col. 1992) en los que se evidencia una menor participación energética de una fracción cafeína-dependiente.

La despolarización parcial no afectó a la  $[Ca]_e$  en la que P se satura. La saturación de P en 2 mM Ca en el miocardio despolarizado (Fig. 21) es comparable a la descrita (1.5 mM Ca) en el músculo papilar de rata adulta (Bers y col. 1981). Además, esa  $[Ca]_e$  coincide con la reportada para la saturación de la corriente de  $Ca^{+2}$  en cardiomiocitos aislados de rata (Wang y col., 1993). Por lo tanto, los resultados son compatibles con la activación de los miofilamentos por una fracción del Ca citosólico inferior a la que participaría en cada  $[Ca]_e$  en  $[K]_e$  control. Esto podría vincularse con una menor participación del Ca del RS (que estaría parcialmente deplecionado), con una mayor remoción de  $Ca^{+2}$



(a nivel sarcolemal) o con un menor influjo de Ca por los canales, pero sin cambios en la economía del ciclaje actomiosínico.

c- Vinculación diferencial de los componentes energéticos de un latido con la corriente de Ca

El verapamilo tiene una conocida dependencia de la frecuencia de estimulación porque actúa sobre los canales en estado activado e inactivado (Mc Donald y col., 1980; Kanaya y col., 1983). La despolarización parcial provoca una activación de canales de Ca durante el reposo mecánico tal que la caída de P en presencia de verapamilo se hace función del tiempo de exposición al bloqueante y no de la frecuencia de estimulación (ver Fig. 36, Tabla 8). La ocurrencia de 2 o 3 contracciones aisladas en cada músculo no afectó a la dependencia del grado de bloqueo respecto del tiempo. Estos resultados indican que la activación de los canales por la despolarización y el consiguiente bloqueo progresivo de los mismos por el verapamilo durante el reposo mecánico es el principal determinante de la disminución del desarrollo de fuerza. De acuerdo al comportamiento clásico de esta droga (Kanaya y col., 1983) el efecto sobre P fue revertido repolarizando al miocardio con [K]<sub>o</sub> cercana a la fisiológica aún en presencia de verapamilo.

El comportamiento de los tres primeros componentes de calor de un latido frente al verapamilo fue similar al de P, tanto en el miocardio despolarizado (Tabla 11) como en el miocardio polarizado (Fig. 39 y 40). Esto reafirma el origen común de los componentes energéticos observables H1, H2 y H3 con los eventos determinantes del ciclo contracción-relajación (activación de TnC, remoción del Ca<sup>12</sup> citosólico, ciclaje actomiosínico y resíntesis del ATP consumido). En cambio, H4 exhibió una particular sensibilidad al bloqueo de la corriente de Ca<sub>v</sub>, independiente del tiempo de exposición al verapamilo (Fig. 38) y una más lenta restauración ( $t_{1/2} > 2$  min) que los parámetros mecánicos y energéticos del latido control (Fig. 39). Esto indica que H4 es la manifestación de un evento que sería afectado por el

verapamilo de un modo diferente a la acción bloqueante que éste ejerce sobre los canales de Ca (y que afecta a los parámetros contráctiles).

d- Hacia el origen del cuarto componente energético de una contracción

El efecto más notable de la  $[Ca]_i$  sobre el calor total liberado por una contracción aislada (Fig. 23) lo constituyó la particular dependencia del cuarto componente. H4 presentó un umbral de  $[Ca]_i$  superior al que exhibieron el desarrollo de presión, la fracción de calor asociada a la fuerza (H3) y los componentes de calor vinculados a la activación (H1 y H2). Sin embargo, H4 creció mucho más que dichos componentes con la  $[Ca]_i$  aún en niveles en que P y la  $I_{Ca}$  están saturados (2 y 4 mM Ca). Por otra parte, la considerable y diferencial disminución de H4 en el primer latido hipóxico (Fig. 30) demuestran que, al igual que en el latido control, el crecimiento de H4 por alta  $[Ca]_i$  en el miocardio despolarizado es provocado por un proceso estrictamente acoplado a la respiración mitocondrial. Su sensibilidad a la disminución del nivel de  $O_2$  tisular resultó tan alta que se inhibió totalmente antes del tiempo de máximo nivel de lactato tisular, estimado en 15 a 20 min (Ponce-Hornos y col. 1982a).

La existencia de H4, tanto en condición control como en el miocardio despolarizado (a  $[Ca]_i > 1$  mM), y su asociación a una actividad Ca-dependiente acoplada a la respiración mitocondrial permiten hipotetizar acerca del proceso que lo origina. El Ca podría estimular directamente a la fosforilación oxidativa para responder a mayores demandas de ATP (Crompton, 1990; Balaban y Heineman, 1989). Alternativamente, el  $Ca^{+2}$  podría activar algún mecanismo celular que consume energía química requiriendo la consecuente resíntesis mitocondrial. La primera opción conduciría a una acumulación de ATP celular en cada latido, puesto que la demanda se mantiene constante en estos experimentos. Dado que el nivel de ATP celular permanece constante a través de una amplia variedad de demandas (Ingwall y Bittl, 1987) puede descartarse que H4 refleje la simple estimulación de la fosforilación oxidativa. Debe

existir entonces un mecanismo que o bien consume ATP o desacopla la fosforilación oxidativa. En cualquier caso, el mecanismo debe ser dependiente de Ca. Si este consumo de ATP fuera dependiente de la reserva citosólica de CrP, el calor asociado al consumo y consecuente recuperación mitocondrial debería reducirse a no menos del 50 % de su valor aeróbico en anoxia. Esto se deduce de que la relación estequiométrica de las entalpías de hidrólisis y síntesis del ATP es aproximadamente 1:1 (Curtin y Woledge, 1978). Sin embargo, la hipoxia disminuyó H4 a menos de la mitad en el primer latido cuando P fue prácticamente inafectada (tanto en condición control como en despolarización) y en contracciones subsiguientes H4 desapareció antes de que lo hiciera la actividad contráctil. Un mecanismo acoplado a la respiración mitocondrial y dependiente de Ca podría ser la captación de Ca por el uniporter mitocondrial, que disipa el gradiente protón-motriz ( $d\mu_{H^+}$ ). El  $Ca^{+2}$  puede ser captado y precipitado en la matriz mitocondrial, o ser ciclado fútilmente desacoplando parcialmente la respiración de la fosforilación oxidativa (Lehninger, 1974; Carafoli, 1985). Los flujos de calor  $\dot{H}_r$  registrados (Tabla 5) son compatibles con flujos de Ca a través del uniporter mitocondrial.

H4 resultó sensible a la acción del verapamilo con una cinética diferente (más rápida) a la de P o a las de los otros componentes de calor (Fig. 36 a 38). En el latido aislado control H4 exhibió un más lento desbloqueo de la acción del verapamilo que P o que los otros componentes de calor (Fig. 39). Este comportamiento indica, ya sea que H4 dependería del Ca ingresado por canales por una vía más sensible que aquella de la cual depende P, o bien que el mecanismo que desencadena H4 es directamente inhibido por el verapamilo. En este sentido se han descrito otros sitios de acción del verapamilo, como por ejemplo el intercambiador Na/Ca de la mitocondria (Cox y Matlib, 1993) que está vinculado a la organela determinante de H4. Es de remarcar que este mecanismo de intercambio Na/Ca es parte del postulado ciclo fútil.

El comportamiento de H4 podría entonces ser compatible con un ciclaje fútil mitocondrial de Ca,

aunque no es descartable algún otro mecanismo dependiente de Ca directamente acoplado a la respiración mitocondrial.

## 2- Efectos de la hipoxia en el miocardio parcialmente despolarizado

Además de la fuerte inhibición de H4 discutida anteriormente, la hipoxia severa produjo una disminución progresiva de la presión desarrollada sin aumento detectable en la presión de reposo (Fig. 28). Este efecto podría ser análogo al descrito en la falla cardíaca hipóxica, para la que se han sugerido mecanismos tales como: a) una disminución en el contenido de ATP y CrP (Poole y col., 1966; Hearse, 1979; Nayler y col. 1979), b) desarrollo de acidosis intracelular resultante del aumento del lactato y H<sup>+</sup> por estimulación de la glicólisis (Allen y Orchard, 1983b), lo cual reduce la fuerza por efecto directo sobre las proteínas contráctiles (Fabiato y Fabiato, 1978; Allen y Orchard, 1983a), ó c) una disminución en el influjo y/o liberación de Ca<sup>12</sup> citosólico (Nayler y col. 1979; Allen y Orchard, 1983b).

Los resultados experimentales presentados sugieren que los niveles de ATP no estarían críticamente disminuídos en la vecindad de los miofilamentos y de los sistemas de remoción de Ca<sup>12</sup>, pues la presión de reposo y los tiempos de relajación permanecieron constantes durante los sucesivos latidos hipóxicos. Una falta de paralelismo entre el desarrollo de fuerza y el nivel de ATP se ha reportado tanto en caídas de la fuerza sin reducción del nivel de ATP (Feinstein, 1962) como en una reducción del nivel de ATP no acompañada por disminución de la fuerza (Kammermeier, 1987; Nayler y col. 1979). Otras evidencias indican que el corazón no agota necesariamente sus reservas de ATP durante la hipoxia (Clague y col. 1994) siendo posible que esté compartamentalizado. En los presentes experimentos el nivel de ATP para el adecuado ciclaje actomiosínico y la remoción de Ca<sup>12</sup> podría haber sido conservado por un aumento de la glicólisis anaeróbica (Ponce-Hornós y col., 1982; Dietrich y

Elzinga, 1992) o por un remanente de metabolismo aeróbico debido a la contaminación residual de  $O_2$  en la perfusión. El calor de reposo del corazón perfundido con Krebs-25 mM K y 2 mM Ca descendió desde  $7.0 \pm 0.4$  a  $2.2 \pm 0.5$  mW/g durante la hipoxia. Este último valor es no significativamente diferente del hallado en 7 mM K e hipoxia y, al igual que en aquél, supera al calor adjudicable a glicólisis anaeróbica. Esto implica la existencia de metabolismo aeróbico por contaminación de las soluciones de perfusión con  $O_2$ , además de una posible estimulación de la glicólisis anaeróbica. Ambos factores, junto a las reservas de CrP podrían mantener el nivel de ATP por encima del necesario para la escasa demanda a la que está sometido el corazón cuando se efectúan latidos aislados.

En los sucesivos latidos aislados en hipoxia en el miocardio despolarizado se observó una progresiva disminución de H1, H2, H3 y P (Fig. 30 y 31). Esto sugiere que la hipoxia produciría una progresiva disminución en la disponibilidad de  $Ca^{+2}$  citosólico. Los resultados son concordantes con los de Nayler y col. quienes detectaron disminución de la retoma de  $^{47}Ca^{+2}$  en septum interventricular de conejo durante la hipoxia (Nayler y col. 1979). También fue descrita una caída en los transitorios de  $Ca^{+2}$  detectables por aequorina por la inhibición conjunta de la fosforilación oxidativa y de la glicólisis (Allen y Orchard, 1983 b). Por otra parte, la disminución observada en H1 y H2 descartaría a la acidosis intracelular como única causa de la disminución de la fuerza, puesto que fue demostrado que ella no reduce el transitorio de  $Ca^{+2}$  citosólico (Allen y Orchard, 1983 a). Se ha descrito que en miocitos ventriculares de rata en anoxia ( $pO_2 < 0.02$  torr) la caída en la amplitud de la contracción está asociada a un acortamiento del potencial de acción sin alteración de la liberación de  $Ca^{+2}$  del RS ni de la sensibilidad de los miofilamentos (Stern y col., 1988). Estas evidencias sugieren que la disminución de la disponibilidad de  $Ca^{+2}$  citosólico observada en el miocardio despolarizado hipóxico podría estar asociada a una disminución del influjo de  $Ca^{+2}$ . Esto es compatible con que el miocardio despolarizado parece depender más del Ca extracelular que del proveniente del RS (ver punto 1 a-).

La disminución de P y de la energía de los tres primeros componentes luego de 30 minutos de hipoxia fue mayor en el miocardio parcialmente despolarizado (25 a 37% de los valores aeróbicos) que en el miocardio control (64 a 75% de los valores aeróbicos). En este último, se observó disminución en H1 pero no en H2, lo cual indicaría una disminución de la unión Ca-TnC sin disminución del nivel de Ca citosólico. Esto es compatible con que la acidosis citosólica sea la causa del pequeño efecto inotrópico negativo. En el miocardio despolarizado, efectos inhibitorios aditivos de la elevada  $[K]_i$  y de la hipoxia sobre la corriente de Ca y de la depleción del RS podrían ser la explicación para la disminución de la disponibilidad de  $Ca^{+2}$  y el mayor efecto inotrópico negativo.

## RESUMEN

El entendimiento de los procesos energéticos que desembocan en el ciclo contracción-relajación es fundamental en un tejido como el músculo cardíaco que, pesando menos del 1% del peso corporal total, utiliza más del 10% del  $O_2$  del reposo. Con este objeto se analizó, mediante una metodología miotérmica, el patrón mecánico-energético asociado a contracciones cardíacas y se establecieron los orígenes de la dispersión que al respecto se encuentra en la literatura. De este análisis se pueden extraer conclusiones acerca de la utilización de energía química por distintos eventos celulares. En particular, se analizó la influencia del Ca extracelular sobre dicho patrón a través de intervenciones experimentales que afectan a mecanismos sarcolemas.

Debido a que el músculo libera fracciones de calor en un tiempo inferior a 1 s y el calorímetro responde con un tiempo medio de integración de 20 s, el análisis miotérmico requirió el estudio previo de la respuesta calorimétrica ante generaciones de calor de corta duración (transitorias). Como resultado de la evaluación teórica correspondiente y la subsiguiente validación experimental se ha logrado (a) estimar valores de potencia mientras ésta se genera en la cámara calorimétrica aún si sólo se cuenta con los primeros milisegundos de registro, (b) calcular las energías individuales, ya sean transitorias o estacionarias, aún cuando varias fuentes de calor son liberadas simultáneamente en la cámara calorimétrica.

Una vez resuelto el aspecto teórico-metodológico descrito, se analizó el calor liberado durante una única contracción miocárdica en condiciones de óptima generación de fuerza isométrica. Pudieron cuantificarse simultáneamente las energías de cuatro componentes de calor (tres transitorios y uno estacionario) mientras se estudiaba su comportamiento mecánico. Diferentes intervenciones experimentales permitieron establecer las correspondencias entre los componentes de calor y eventos celulares que

ocurren obligatoriamente durante el ciclo contracción-relajación cardíaco. Se presentan evidencias experimentales que indican que, en el calor total liberado por el músculo cardíaco, pueden diferenciarse seis fracciones, cuyas características y relación con diferentes eventos celulares pueden resumirse en:

a- Calor de mantenimiento del reposo mecánico ( $\dot{H}_r$ ) asociado con el metabolismo basal del músculo y, en condición de despolarización parcial, con la remoción activa del  $\text{Ca}^{+2}$  ingresado por canales. En esta última condición fue posible analizar la cinética de inhibición de los canales para una condición dada y dar evidencia experimental sobre el origen de las desviaciones y/o errores cometidos en la evaluación del metabolismo basal.

b- Dos fracciones de calor de comparativamente rápida evolución, independientes de la fuerza desarrollada pero dependientes de la  $[\text{Ca}]_i$  y de la corriente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Las magnitudes de dichos componentes son compatibles con el calor de unión de  $\text{Ca}^{+2}$  a TnC (H1) y con el calor de remoción activa del  $\text{Ca}^{+2}$  puesto en juego en la contracción (H2). Se presentan evidencias que muestran la inconveniencia de efectuar la evaluación de los componentes independientes de la generación de fuerza en ausencia de la misma.

c- Un componente de calor dependiente del desarrollo de fuerza (H3) que incluye una fracción asociada al ciclaje actomiosínico y otra vinculable a la resíntesis aeróbica del ATP consumido durante el ciclo contráctil. Un análisis apropiado permite mostrar una economía de la generación de fuerza en el músculo cardíaco comparable a la del músculo esquelético. El similar comportamiento que exhibieron H3, P, H1 y H2 por modificaciones en la disponibilidad de Ca citosólico (variación de la  $[\text{K}]_i$ , de la  $[\text{Ca}]_i$  o bloqueo del influjo de Ca) los vinculan al mismo Ca activador de la contracción.

d- Un componente de calor suprabasal (H4), independiente de la fuerza, que se mantiene estable durante alrededor de 100 s posteriores a la contracción aislada o al cese de la estimulación estacionaria y está vinculado a un proceso acoplado a la respiración mitocondrial. Este componente, hasta ahora



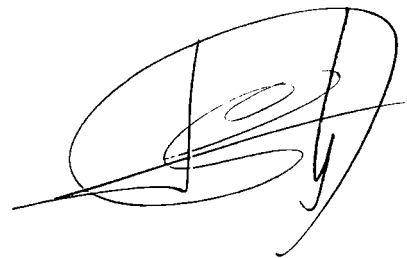
nunca descrito mostró ser dependiente de un Ca diferente del Ca activador de la contracción, y crece especialmente en condición de elevado ciclaje sarcolemal de Ca durante el reposo mecánico. Es particularmente sensible a verapamilo pero con una cinética diferente a la del bloqueo de la corriente de Ca. Este componente señala la existencia de una capacidad de respuesta de la mitocondria a los eventos citosólicos del ciclo contráctil, diferente a la que exhiben los eventos vinculados al  $\text{Ca}^{+2}$  activador de la contracción.

Las variaciones observadas en el  $\dot{H}r$  y en los parámetros mecánico-energéticos de una contracción permiten extraer conclusiones secundarias. Entre ellas se destacan: la activación de los canales de Ca durante el reposo mecánico del miocardio despolarizado y su bloqueo progresivo por verapamilo explican que éste bloquee a una contracción post-reposo. Por otra parte, la disminución progresiva de H1 y H2 en los sucesivos latidos aislados hipóxicos en el miocardio despolarizado sugiere que el inotropismo negativo observado sería debido a la disminución de la disponibilidad de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico.

El haber logrado un modelo establecido del comportamiento energético del músculo cardíaco (habiendo identificado los errores que motivan la dispersión existente a este respecto en la literatura y cómo corregirlos) facilitará el estudio energético del músculo cardíaco tanto en sus aspectos farmacológicos como fisiopatológicos.

*Alino Comolani*

*Alino Comolani*



BIBLIOGRAFIA:

- Adelstein RS, Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann Rev Biochem* 49:921-956, 1980.
- 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, Kurihara S. Calcium transients in mammalian ventricular muscle. *Eur Heart J* 1:5-15, 1980. Citado por: Chapman RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* H535-H552, 1983.
- Allen DG, Orchard CH. Intracellular calcium concentration during hypoxia and metabolic inhibition in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 339:107-122, 1983a.
- Allen DG, Orchard CH. The effect of pH on intracellular calcium transients in mammalian heart muscle. *J Physiol* 335: 555-567, 1983b.
- 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, 1982a.
- Alpert NR, Mulieri LA. Heat, mechanics, and myosin ATPase in normal and hypertrophied heart muscle. *Federation Proc* 41: 192-198, 1982b.
- Balaban RS, Heineman FW. Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Molec and Cell Biochemistry* 89: 191-197, 1989.
- Barceñas-Ruiz L, Beuckelman DJ, Wier WG. Sodium-calcium exchange in heart: membrane currents and changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Science* 238:1720-1722, 1987.
- Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 265: C533-C540, 1993.
- Beeler GW Jr, Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J Physiol (Lond)* 207:211-229, 1970.
- 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, Christensen DM, Nguyen TX. Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction? *J Mol Cell Cardiol* 20: 405-414, 1988.
- 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.

Bers DM, Philipson KD, Nishimoto AY. Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta* 601: 358-371, 1980.

Blanchard EM, Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res* 55:382-391, 1984.

Blaustein MP, Russell JM. Sodium-calcium exchange and calcium-calcium exchange in internally dialyzed squid giant axons. *J Membrane Biol* 22:285-312, 1975.

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

Bonazzola P, Ponce-Hornos JE. Effects of caffeine on energy output of rabbit heart muscle. *Basic Res Cardiol* 82:428-436, 1987.

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

Bugnard L. The relation between total and initial heat in single muscle twitches. *J Physiol (Lond)* 22:509-519, 1934. Citado por: 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, 1982a.

Burton AC. The importance of the shape and size of the heart. *Am Heart J* 54:801-810, 1957. Citado por: 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.

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

Campbell DL, Giles W. Calcium currents. En: *Calcium and the heart*, ed. by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, chapter 2, 27-84, 1990.

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

Carafoli E. Sarcolemmal calcium pump. In: *Calcium and the heart*, edited by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, chapter 4, p.109-126, 1990.

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

Clague JR, Rich TL, Langer GA. Calcium flux and compartmentation in hypoxic cultured neonatal rat cardiac cells. *Am J Physiol*, 1994 (en prensa)

Coll KE, Joseph SK, Corkey BE, Williamson JR. Determination of the matrix free  $\text{Ca}^{12}$  concentration and kinetics of  $\text{Ca}^{12}$  efflux in liver and heart mitochondria. *J Biol Chem* 257:8696-8704, 1982.

Collins JH, Greaser ML, Potter JD, Horn MJ. Determination of the amino acid sequence of troponin C from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 252:6356-6362, 1977. Citado por: Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.

Coraboeuf E. Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues. *Am J Physiol* 234(2):H101-H116, 1978.

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

Cox DA, Matlib MA. Modulation of intramitochondrial free  $\text{Ca}^{12}$  concentration by antagonists of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{12}$  exchange. *TIPS* 14: 408-413, 1993.

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

Crompton M. The regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{12}$  transport in heart. *Curr Top Membr Transport* 25:231-276, 1985.

Crompton M. The role of  $\text{Ca}^{12}$  in the function and dysfunction of heart mitochondria. En: *Calcium and the heart*, ed. by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, chapter 6, 167-198, 1990.

Crompton M, Heid I. The cycling of calcium, sodium and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem* 91:599-608, 1978.

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, Heid I, Carafoli E. The activation by potassium of the sodium-calcium carrier of cardiac mitochondria. *FEBS Lett* 115:257-259, 1980.

Curtin N, Woledge R. Energy changes and muscular contraction. *Physiol Rev* 58:690-761, 1978.

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 JB, Gibbs CL. An energetic model of muscle contraction. *Biophys. J.* 12:227-236, 1972.

- Chapman JB, 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. Heat and fluorescence changes in cardiac muscle: effects of substrate and calcium. *J Mol Cell Cardiol* 8:545-558, 1976.
- Chapman JB, Gibbs CL, Loiselle DS. Myothermic, polarographic and fluorometric data from mammalian muscles. Correlations and an approach to biochemical synthesis. *Federation Proc* 41:176-184, 1982.
- Chiarandini DJ, Sanchez JA, Stefani E. Effect of calcium withdrawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibres of the frog. *J Physiol* 303: 153-163, 1980.
- Dawson MJ. Nuclear magnetic resonance. En: *Cardiac Metabolism*. Drake-Holland AJ, Noble NIM, eds. John Wiley & Sons. New York. 1983.
- Dietrich DLL, Elzinga G. ATP formation and energy demand in anoxic heart muscle of the of the rabbit. *Am J Physiol* 263: H526-H532, 1992.
- DiPolo R, Beauge L. Interaction of physiological ligands with the Ca pump and NaCa exchange in squid axons. *J Gen Physiol* 84:895-914, 1984.
- Dixon WJ; Massey FJ. Introduction to statistical analysis. Mc Graw, Hill, ed. USA. 1969.
- Documente Geigy. Tablas Científicas. Ed. by Geigy SA. Basilea, Suiza, 1965.
- 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.
- Ebashi S. Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca-troponin-tropomyosin system. *Essays Biochem* 10:1-36, 1974. Citado por: Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.
- Eisner DA, Lederer WJ. Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am J Physiol* 236:C189-C202, 1985.
- 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, 1981.
- Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245:C1-C14, 1983.
- Fabiato A. Inositol(1,4,5)-triphosphate-induced release of Ca<sup>12</sup> from the sarcoplasmic reticulum of

skinned cardiac cells. *Biophys J* 49:190a, 1986.

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.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Ann Rev Physiol* 41: 473-484, 1979.

Feher JJ, Fabiato A. Cardiac sarcoplasmic reticulum. Calcium uptake and release. En: *Calcium and the heart*. Chapter 7. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.

Feinstein MB. Effects of experimental congestive heart failure, ouabain, and asphyxia on the high-energy phosphate and creatine content of guinea-pig heart. *Circulation Research* 10:333-346, 1962. Citado por: Kammermeier H, Schmidt P, Jungling E. Free energy change of ATP-hydrolysis: a casual factor of early hypoxic failure of the myocardium?. *J Mol Cell Cardiol* 14: 267-277, 1982.

Fleckenstein A. History of calcium antagonists. *Circ Res* 52 (suppl 1):3-16, 1983.

Gadian DG, Hoult DI, Radda GK, Seely PJ, Chance B, Barlow C. Phosphorus nuclear magnetic resonance studies on normoxic and ischemic cardiac tissue. *Proc Natl Acad Sci* 73: 4446-4448, 1976.

Gibbs, CL. Changes in cardiac heat production with agents that alter contractility. *Aust J exp Biol med Sci* 45:379-392, 1967.

Gibbs CL. The energy output of normal and anoxic cardiac muscle. In: *Comparative physiology of the heart: current trends*, edited by FV Mc Cann. Basel: Birkhauser, p.78-92, 1969. Citado por: 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. Cardiac energetics. *Physiol. Rev.* 58: 174-254, 1978.

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

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

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.

Hadley RW, Lederer, WJ. Comparison of the effects of BAY K 8644 on cardiac  $Ca^{12}$  current and  $Ca^{12}$  channel gating current. *Am J Physiol* 262: H472-H477, 1992.

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.

Hansford RG, Castro F. Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium ion concentration in suspension of heart mitochondria with low, plausibly physiological contents of total  $Ca^{12}$ . *J Bioenerg Biomembr* 14:361-375, 1982.

Hayat LH, Crompton M. The effects of  $Ca^{12}$  and adenine nucleotides on the sensitivity of the heart mitochondrial  $Na^1$ - $Ca^{12}$  carrier to extramitochondrial  $Ca^{12}$ . *Biochem J* 244:533-538, 1987.

Hearse DJ. Oxygen deprivation and early myocardial contractile failure: a reassessment of the possible role of adenosine triphosphate. *Am J Cardiol* 44:1115-1121, 1979.

Hess P, Tsien RW. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309:453-456, 1984. Citado por: Campbell DL, Giles W. Calcium currents. En: *Calcium and the heart*, ed. by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, chapter 2, 27-84, 1990.

Hilgemann DW, Langer GA. Transsarcolemmal calcium movements in arterially perfused rabbit right ventricle measured with extracellular calcium-sensitive dyes. *Circ Res* 54:461-467, 1984.

Hill AV. Length of muscle, and the heat and tension developed in an isometric contraction. *J Physiol London* 60:237-263, 1925. Citado por: Hill AV. *Trails and Trials in Physiology*. Edward Arnold Publishers Ltd, 1965.

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

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

Holubarsch C, Goulette RP, Mulieri LA. Heat production during hypoxic contracture of rat myocardium. *Circ Res* 51: 777-786, 1982.

- Holubarsch C, Goulette RP, Litten RZ, Martin BJ, Mulieri LA, Alpert NR. The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium. *Circ Res* 56:78-86, 1985.
- Homsher E, Mommaerts WFHM, Ricchiutti NV, Wallner A. Activation heat, activation metabolism and tension-related heat in frog semitendinosus muscles. *J Physiol* 220: 601-625, 1972.
- Hossey MM, Landuzki M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J Membrane Biol* 104: 81-105, 1988.
- Hume JR, Uehara A. "Creep currents" in single frog atrial cells may be generated by electrogenic Na/Ca exchange. *J Gen Physiol* 87:857-884, 1986.
- 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.
- Ingwal JS, Bittl JA. Regulation of heart creatine kinase. En: *Cardiac energetics. Basic mechanisms and clinical implications*. Jacob R, Just H, Holubarsch, eds. Springer-Verlag New York. 1987.
- Inui M, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem* 262:15637-15642, 1987.
- Isenberg G, Klochner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 395:30-41, 1982. Citado por: Campbell DL, Giles W. Calcium currents. En: *Calcium and the heart*, ed. by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, chapter 2, 27-84, 1990.
- Kanaya S, Arlock P, Katzung BG, Hondeghem LM. Diltiazem and verapamil preferentially block inactivated cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol* 15: 145-148, 1983.
- Kammermeier H. High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. En: *Cardiac energetics. Basic mechanisms and clinical implications*. Jacob R, Just H, Holubarsch, eds. Springer-Verlag New York. 1987.
- Kerrick WGL, Malencik DA, Hoar PE, Potter JD, Coby RL, Pocinwong S, Fischer EH.  $Ca^{+2}$  and  $Sr^{+2}$  activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers arch* 386:207-213, 1980. Citado por: Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.
- 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.
- Kimura J, Miura Y. Effects of intracellular sodium and calcium on sodium-calcium exchange current. *J Mol Cell Cardiol* 20:S19, 1988.
- Klee CB, Vanaman TC. Calmodulin. In: *Advances in protein chemistry*, vol 35. New York: Academic Press, 213-321, 1982.



- Kokubun S, Irisawa H. Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium control current of guinea-pig single ventricular cells. *Jap J Physiol* 34:599-611, 1984.
- Kranias EG. Regulation of Ca<sup>+2</sup> transport by cyclic 3',5'-AMP-dependent and calcium-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 844:193-199, 1985.
- Kushmerick MJ. Energetics studies of muscles of different types. En: *Cardiac energetics. Basic mechanisms and clinical implications*. Jacob R, Just H, Holubarsch, eds. Springer-Verlag New York. 1987.
- Kuwata JH, Langer GA. Rapid, non-perfusion-limited calcium exchange in cultured neonatal myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol* 21:1195-1208, 1989.
- Lai AF, Meissner G. The muscle ryanodine receptor and its intrinsic Ca<sup>+2</sup> channel activity. *J Bioenergetics Biomemb* 21 (2):227-245, 1989.
- Langer GA. Sodium-calcium exchange in the heart. *Ann Rev Physiol* 44:435-439, 1982.
- Langer GA. Calcium at the sarcolemma: Its role in control of myocardial contraction. In *cardiac muscle: The regulation of excitation and contraction*, chapter 10, Academic Press Inc, 1986.
- Langer GA. Calcium exchange and contractile control. En: *Calcium and the heart*, chapter 11, edited by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, 1990.
- Langer GA. Myocardial calcium compartmentation. *Trends Cardiovasc Med* 4:103-109, 1994.
- Langer GA, Frank JS, Rich TL, Orner FB. Calcium exchange, structure and function in cultured adult myocardial cells. *Am J Physiol* 252: H314-H324, 1987.
- Langer GA, Nudd LM. Effects of cations, phospholipases and neuraminidase on calcium binding to "gas-dissected" membranes from cultured cardiac cells. *Circ Res* 53: 482-490, 1983.
- Langer GA, Rich TL. Phospholipase D produces increased contractile force in rabbit ventricular muscle. *Circ Res* 56:146-149, 1985.
- 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, Peskoff A, Post JA. How does the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>+2</sup> exchanger work in the intact cardiac cell?. *J Mol Cell Cardiol* 25: 637-639, 1993.
- Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent

phosphorylations. *Biochemistry* 18:5150-5156, 1979.

Leavis PC, Rosenfeld SS, Gergely J, Grabarek Z, Drabikowski W. Proteolytic fragments of troponin C. Localization and high and low affinity  $\text{Ca}^{+2}$  binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J Biol Chem* 253:5452-5459, 1978.

Leisey JR, Grotyohann LW, Scott DA, Scaduto RC. REgulation of cardiac mitochondrial calcium by average extramitochondrial calcium. *Am J Physiol* 265: H1203-H1208, 1993.

Lehninger AL. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of  $\text{Ca}^{+2}$  by mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1520-1524, 1974.

Loiselle DS. Some factors modifying the metabolism of the  $\text{K}^{+}$ -arrested guinea-pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 15[Suppl 1]:286P, 1983.

Loiselle DS. The rate of resting heat production of rat papillary muscle. *Pflug Arch* 405:155-162, 1985a.

Loiselle DS. The effect of temperature on the basal metabolism of cardiac muscle. *Pflug Arch* 405:163-169, 1985b.

Loiselle DS. Cardial 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.

Luttgau HA, Niedergerke R, The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J Physiol (Lond)* 143: 486-505, 1958. Citado por: Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular muscle. En: *The heart and cardiovascular system*, cap. 26. Fozzard HA et al. eds. Raven Press. New York, 1986.

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

Mc Donald TF, Pelzer D, Trautwein W. On the mechanism of slow calcium channel block in heart. *Pflugers Arch* 385: 175-179, 1980.

Mc Donald RH jr., Taylor RR, Cingolani HE. Measurement of myocardial developed tension and its relation to oxygen consumption. *Am J Physiol* 211:667-673, 1966.

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

Molyvdas PA, Sperelakis N. Comparison of the effects of several calcium-antagonistic drugs (slow-channel blockers) on the electrical and mechanical activities of guinea-pig papillary muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 5:162-169, 1983.

Morad M, Cleemann L. Role of  $\text{Ca}^{+2}$  channel in development of tension in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 19:527-553, 1987.

Morad M, Reeck S, Rao M. Potassium chloride versus voltage clamp contractures in ventricular muscle. *Science* 211:485-487, 1981.

Movsesian MA, Nishikawa M, Adelstein RS. Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 259: 8029-8032, 1984. Citado por: Feher JJ, Fabiato A. Cardiac sarcoplasmic reticulum. Calcium uptake and release. En: *Calcium and the heart*. Chapter 7. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.

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.

Nayler WG, Poole-Wilson PA, Williams A. Hypoxia and calcium. *J Mol Cell Cardiol* 11:683-706, 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.

Opie LH. Metabolism of the heart in health and disease. II. *Am Heart J* 77:100-122, 1969. Citado por: 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.

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.

Peskoff A, Post JA, Langer GA. Sarcolemmal calcium binding sites in heart: II. Mathematical model for diffusion of calcium released from the sarcoplasmic reticulum into the diadic region. *J Membr Biol* 129:59-69, 1992.

Philipson KD. Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles. *Ann REv Physiol* 47:561-571, 1985.

Philipson KD. The cardiac  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. En: *Calcium and the heart*, chapter 3, edited by GA Langer, Raven Press Ltd., New York, 1990.

Philipson KD, Bers DM, Nishimoto AY. The role of phospholipids in the Ca binding of isolated sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol* 12:1159-1173, 1980a.

Philipson KD, Bers DM, Nishimoto AY, Langer GA. Binding of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Na}^+$  to sarcolemmal membranes: relation to control of myocardial contractility. *Am J Physiol* 238:H373-H378, 1980b.

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

Philipson KD, Langer GA, Rich TL. Charged amphiphiles regulate heart contractile and sarcolemma-Ca interactions. *Am J Physiol* 248:H147-H150, 1985.

Philipson KD, Nishimoto AY.  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{+2}$  exchange in inside-out cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 257(9):5111-5117, 1982.

Philipson KD, Nishimoto AY. Stimulation of Na-Ca exchange in cardiac sarcolemmal vesicles by phospholipase D. *J Biol Chem* 259:16-19, 1984.

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

Pietrobon D; Hess P. Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature* 346:651-655, 1990.

Pitts BJR. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 254:6232-6235, 1979. Citado por: Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular muscle. En: *The heart and cardiovascular system*, cap. 26. Fozzard HA et al. eds. Raven Press. New York, 1986.

Ponce-Hornos JE. Energetics of calcium movements. In: *Calcium and the heart*, edited by GA Langer, Raven Press. Ltd. New York, chapter 8, p.269-298, 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. Sodium-calcium exchange in mammalian myocardium: the effects of lithium. *J Mol Cell Cardiol* 12:1367-1382, 1980.

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, 1982b.

Ponce-Hornos JE, Marquez MT, Bonazzola P. Influence of extracellular potassium on energetics of resting heart muscle. *Am J Physiol* 262:H1081-H1087, 1992.

Ponce-Hornos JE, Parker JM, Langer GA. Heat production in isolated heart myocytes: differences among species. *Am J Physiol* 258:H880-H886, 1990.

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

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

Pool PE, Sonnenblick EH. The mechanochemistry of cardiac muscle. I. The isometric contraction. *J Gen Physiol* 50:951-965, 1967.

Poole PE, Covell JW, Chidsey CA, Braunwald E. Myocardial high energy phosphate stores in acutely induced hypoxic heart failure. *Circulation Res* 19: 221-229, 1966.

Porzig H, Li Z, Nicoll DA, Philipson KD. Mapping of the cardiac sodium-calcium exchanger with monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265: C748-C756, 1993.

Post JA, Kuwata JH; Langer GA. A discrete Na/Ca exchange dependent,  $Ca^{+2}$  compartment in cultured neonatal rat heart cells. Characteristics, localization and possible physiological function. *Cell Calcium* 14: 61-71, 1993.

Post JA; Langer GA. Cellular origin of the rapidly exchangeable calcium pool in the cultured neonatal rat heart cell. *Cell Calcium* 13:627-634, 1992.

Post JA, Langer GA, Op den Kamp JAF, Verkleij AJ. Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and "gas dissected" membranes. *Biochim Biophys Acta* 943:256-266, 1988.

Potter JD. The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. *Arch Biochem Biophys* 162:436-441, 1974. Cited por: Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.

Potter JD, Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 250:4628-4633, 1975.

Potter JD, Hsu FJ, Pownall HJ. Thermodynamics of  $Ca^{+2}$  binding to troponin-C. *J Biol Chem* 252:2452-2454, 1977.

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.

Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium concentration. *J Physiol* 192:479-492, 1967. Cited por: Campbell DL, Giles W. Calcium currents. En: *Calcium and the heart*, ed. by GA Langer; Raven Press Ltd., New York, chapter 2, 27-84, 1990.

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

Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external

ion composition. *J Physiol London* 195:45-70, 1968.

Rhode E. Über den Einfluss der mechanischen Bedingungen auf die Tätigkeit und den Sauerstoffverbrauch der Warmbluterherzens. *Naunyn-Schmeidebergs Arch Exptl Pathol Pharmacol* 68:401-434, 1912. Citado por: 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.

Ricchiuti NV, Gibbs CL. Heat production in a cardiac contraction. *Nature* 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.

Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Kranias EG, Potter JD, Solaro RJ. The effect of troponin I phosphorylation on the  $\text{Ca}^{+2}$  binding properties of the  $\text{Ca}^{+2}$ -regulatory site of bovine cardiac troponin. *J Biol Chem* 257:260-263, 1982.

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

Rousseau E, Smith JS, Henderson JS, Meissner G. Single channel and  $^{45}\text{Ca}$  flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys J* 50:1009-1014, 1986.

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

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

Schatzmann HJ. ATPase-dependent  $\text{Ca}^{++}$  extrusion from human red cells. *Experientia* 22:364-368, 1966.

Sham JSK, Jones LR, Morad M. Phospholamban mediates the  $\beta$ -adrenergic-enhanced  $\text{Ca}^{+2}$  uptake in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol* 261:H1344-H1349, 1991.

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

Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular muscle. En: *The heart and cardiovascular system*, cap. 26. Fozzard HA et al. eds. Raven Press. New York, 1986.

Sheu SS, Sharma VK, Banerjee SP. Measurement of cytosolic free calcium concentration in isolated rat ventricular myocytes with quin 2. *Circ Res* 55:830-834, 1984.

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

Siegel S. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas. 1970.

Siess M. Cardiac energetics: significance of mitochondria. En: *Cardiac energetics. Basic mechanisms and clinical implications*. Jacob R, Just H, Holubarsch (eds.). Springer-Verlag New York. 1987.

Solaro J, Briggs FN. Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *Circ. Res.* 34:531-540, 1974.

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

Somlyo AV, Schumman H, Somlyo AP. Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis. *Nature* 268:556-558, 1977.

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.

Spencer RGS, Balschi JA, Leigh JS, Ingwall JS. ATP synthesis and degradation rates in the perfused rat heart. *Biophys J* 54: 921-929, 1988.

Sperelakis N, Schneider JA. Metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. *Am J Cardiol* 37:1079-1085, 1976.

Stern MD, Silverman HS, Houser SR, Josephson RA, Capogrossi MC, Nichols CG, Lederer WJ, Lakatta EG. Anoxic contractile failure in rat heart myocytes is caused by failure of intracellular calcium release due to alteration of the action potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6954-6958, 1988.

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

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

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.

Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the heart*. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.

- Tsien RW. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45:341-358, 1983.
- Tytgart 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 Eerd JP, Takahashi K. Determination of the complete amino acid sequence of bovine cardiac troponin C. *Biochemistry* 15:1171-1180, 1976.
- Varró A, Lathrop DA, Hester SB, Nánási PP, Papp JGY. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 88:93-102, 1993.
- Wakabayashi S, Goshima K. Kinetic studies on sodium-dependent calcium uptake by myocardial cells and neuroblastoma cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 642:158-172, 1981. Citado por: Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular muscle. En: *The heart and cardiovascular system*, cap. 26. Fozzard HA et al. eds. Raven Press. New York, 1986.
- Wang SY, Winka L, Langer GA. Role of calcium current and sarcoplasmic reticulum calcium release in control of myocardial contraction in rat and rabbit myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 25:1339-1347, 1993.
- Wegener AD, Jones LR. Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *J Biol Chem* 259:1834-1841, 1984. Citado por: Feher JJ, Fabiato A. Cardiac sarcoplasmic reticulum. Calcium uptake and release. En: *Calcium and the heart*. Chapter 7. Langer GA, ed. Raven Press. New York. 1990.
- Wendt IR, Gibbs CL. Recovery heat production of mammalian fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol* 230:1637-1643, 1976.
- Wendt IR, Loiselle DS. The effects of external calcium concentration on activation heat on cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 13 (Suppl 3):8P, 1981.
- 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.
- Wier WG. Calcium transients during excitation-contraction coupling in mammalian heart: aequorin signals of canine Purkinje fibers. *Science* 207:1085-1087, 1980.
- Wilkie DR. Thermodynamics and the interpretation of biological heat measurements. *Prog Biophys* 10:259-298, 1960.
- Wolska BM, Lewartowski B. Calcium in the In Situ mitochondria of rested and stimulated myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 23:217-226, 1991.



Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann Rev Biophys Biophys Chem* 16:535-559, 1987. Citado por: Thompson RB, Warber KD, Potter JD. Calcium at the myofilaments. En: *Calcium and the Heart*. Ed. G.A. Roth. Raven Press, N. York, 1990.

## ANEXOS

1- Abreviaturas:

Å: amstrong ( $10^{-8}$  m)

ADP: difosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

$\beta$ : constante de velocidad de retardo en la detección de la señal calorimétrica ( $s^{-1}$ )

c: calor específico

Ca-ATPasa: adenosintrifosfatasa que transporta  $Ca^{12}$

$[Ca^{12}]_e$ : concentración de calcio extracelular

$[Ca^{12}]_i$ : concentración de calcio intracelular

$[Ca^{12}]_m$ : concentración de calcio intramitocondrial

(Ca)<sub>i</sub>: actividad intracelular de Ca

CIQ: coeficiente isométrico de calor

CrP: creatina fosfato

EGTA: etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetol eter)-N,N,N',N'-tetraacético

$E_m$ : diferencia de potencial de la membrana

$E_x$ : potencial de equilibrio del ión X

f: frecuencia de estimulación del músculo (Hz)

F: constante de Faraday

$f_c$ : factor de calibración del calorímetro ( $\mu W/\mu V$ )

FSB: fracción de calor suprabasal ( $mJ.g^{-1}$ )

g: gramo, si no se aclara otra cosa se entenderá: de tejido húmedo

$\Delta H$ : cambio de entalpía molar de una reacción química ( $kJ.mol^{-1}$ )

H1:	energía del primer componente de calor de un latido ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
H2:	energía del segundo componente de calor de un latido ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
H3:	energía del tercer componente de calor de un latido ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
H4:	energía del cuarto componente de calor de un latido ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Ha:	calor activo por latido ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$H_{\text{FSB}}$ :	flujo de calor de la fracción suprabasal ( $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$H_r$ :	flujo de calor de reposo ( $\text{mW}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$H_t$ :	flujo de calor total ( $\text{mW}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$H_4$ :	flujo de calor del cuarto componente ( $\text{mW}\cdot\text{g}^{-1}$ o $\mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$H_p$ :	flujo de calor removido de la cámara calorimétrica por la perfusión (mW)
h:	hora
Hz:	hertz ( $\text{ciclos}\cdot\text{s}^{-1}$ )
I:	intensidad de corriente
IH:	calor inicial
IPt:	integral presión desarrollada - tiempo ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{s}$ )
$\text{IP}_3$ :	inositol trifosfato
$\infty$ :	infinito
J:	joule
$J_p$ :	flujo de perfusión ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ )
kDa:	kilodalton
kJ:	kilojoule
$K_{0.5}$ :	concentración de sustrato que ocupa el 50% de los sitios específicos de unión
Kg:	kilogramo, si no se aclara otra cosa se entenderá: de tejido húmedo

mcal:	milicaloría
mg:	miligramo
min:	minuto
mJ:	milijoule
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mM:	milimolar
mmol:	milimol
mN:	milinewton
ms:	milisegundo
mV:	milivoltio
mW:	miliwatt
$\mu$ :	constante de velocidad de enfriamiento del sistema calorimétrico ( $s^{-1}$ )
$\mu$ M:	micromolar
$\mu$ mol:	micromol
n:	número de moles participantes estequiométricamente en una reacción
$N_2$ :	nitrógeno molecular
Na-K-ATPasa:	adenosintrifosfatasa que transporta $3Na^+$ y $2K^+$
(Na) <sub>i</sub> :	actividad intracelular de sodio
nmol:	nanomol ( $10^{-9}$ mol)
$O_2$ :	oxígeno molecular
p:	potencia eléctrica aplicada (mW)
P:	máxima presión intraventricular desarrollada durante una contracción ( $mN \cdot mm^{-2}$ )

- +P: máxima velocidad de desarrollo de presión ( $+dP/dt$ ) ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- P: máxima velocidad de relajación ( $-dP/dt$ ) ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- PA: potencial de acción
- $P_i$ : fosfato inorgánico
- PP: presión de perfusión (mm Hg)
- Q: calor
- R: resistencia eléctrica
- R: constante universal de los gases
- RH: calor de recuperación
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RS: retículo sarcoplásmico
- s: segundo
- SL: sarcolema
- t: tiempo
- T: temperatura absoluta
- $t_c$ : tiempo total de la contracción (desde 0 al  $t_p$ ) (s)
- tg: tangente
- Tm: tropomiosina
- TnC: troponina C
- $t_{1/2}$ : tiempo en el cual una magnitud desciende a la mitad de su valor
- $t_p$ : tiempo al pico o máximo de una curva
- $t_r$ : tiempo total de relajación (desde  $t_p$  al final) (s)
- V: voltio o voltaje

$V_{\max}$ : velocidad máxima de una enzima o transportador

vs.: versus

W: watt

w: trabajo externo

## FE DE ERRATAS

Página	línea	donde dice:	debe decir:
26	10-11	40 a 50 nmol Ca.g <sup>-1</sup> tejido húmedo.s <sup>-1</sup>	40 a 50 nmol Ca.g <sup>-1</sup> tejido húmedo por latido.
73	9	Tanto para la aplicación de 2 como de 3 fuentes.....	Tanto para el ajuste a 2 como a 3 componentes
90	leyenda Fig. 12		*: NS diferente de cero
101	16	es similar al $\dot{H}_r$ ,	es similar al $\Delta \dot{H}_r$ ,
104	20-21	..-P/P desde 1.4±0.1 (en 7 mM K) a 2.1±0.3 en 25 mM K (p<0.05).	..-P/P desde 3.1±0.2 (en 7 mM K) a 4.7±0.6 en 25 mM K (p<0.05).