

Efeitos moleculares da cafeína sobre os cardiomiócitos

Eduardo Daniel Lima Freitas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado Integrado)

Orientadora: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

maio de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Eduardo Daniel Lima Freitas, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 39495 do curso de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 02 / 05 / 2023

Eduardo Daniel Lima Freitas

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Manuel e Paula e à minha irmã Alexandra por me terem acompanhado e sido a minha rede de suporte desde sempre. Dedico também aos meus avós, à minha madrinha, aos meus afilhados, a todos os meus amigos de coração e à Sara que contribuíram muito para que, de uma forma ou doutra, chegasse aqui.

Agradecimentos

Aos meus pais Manuel e Paula e à minha irmã Alexandra, por sempre terem acreditado em mim e ajudado em tudo, pela força que me deram para ter entrado neste curso e concluir este Mestrado com esta tese. Sem eles, nunca conseguiria ter chegado tão longe e ser quem sou.

À Sara, pelo poço de força que é no meu dia a dia, por ser a pessoa que mais me deu motivação para a conclusão deste trabalho e pela alegria e amabilidade que partilha comigo, até pelas minhas mais pequenas vitórias. No futuro, espero retribuir da mesma forma.

A todos os meus amigos da Covilhã, com quem partilhei estes 6 anos e estão no mesmo barco que eu, pelo suporte que foram longe de casa, por todos os momentos passados e pela entajada que se fez sentir, quer em questões da faculdade, quer em questões da minha vida diária.

Aos mais novos, aos meus afilhados, por quem tenho tanta estima, que vieram abrilhantar e completar o meu percurso quando eu menos esperava, já perto do fim. Espero que estes próximos anos sejam tão bons ou ainda melhores para vocês do que foram para mim e que saibam que podem contar comigo sempre.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Elisa Cairrão, pela total disponibilidade para ser minha orientadora logo desde o início, pelo interesse que mostrou no desenvolvimento desta tese e pela paciência em me ter tirado todas as dúvidas. Só tenho a agradecer a sua simpatia e o facto de ter estado tão presente.

À Covilhã, por me ter dado a maior experiência da minha vida, por me ter acolhido e por se ter tornado a minha casa.

Prefácio

“Nunca um simples grão de café significou tanto”

em memória do Comendador Rui Nabeiro,

fundador da Delta Cafés.

Resumo

A cafeína é a substância psicostimulante mais consumida a nível mundial, estando estabelecida no dia a dia de grande parte da população; o que, pela sua natureza estimulante, possui diversos efeitos no corpo humano. A nível cardiovascular e de forma mais macroscópica, esta substância já foi associada ao aumento do risco de doença coronária, enfarte agudo do miocárdio, arritmias, entre outras variantes patológicas. Contudo os mecanismos moleculares e celulares associado a estes efeitos nefastos a nível cardiovasculares continuam sobre intensa investigação, como o seu efeito na contração muscular, na fisiologia do cálcio, a sua influência nos recetores de rianodina tipo 2 e nos mecanismos de repolarização. Neste sentido, o objetivo desta dissertação será fazer uma revisão de literatura sobre os efeitos moleculares e celulares da cafeína nos cardiomiócitos, de maneira a explorar como tudo se processa intrincadamente a um nível mais microscópico, que posteriormente poderão a vir originar os mais sobejamente conhecidos *outcomes* cardiovasculares supramencionados.

Palavras-chave

Cafeína;cardiomiócitos;miocárdio;cálcio;retículo sarcoplasmático

Abstract

Caffeine is the most consumed psychostimulant substance worldwide, remaining in the day-to-day life of a large part of the population, which, due to its stimulating nature, has several effects on the human body. At a cardiovascular level and more macroscopically, this substance has already been associated with an increased risk of coronary disease, acute myocardial infarction, arrhythmias, among other pathological variants. However, the molecular and cellular movements associated with these harmful effects at the cardiovascular level remain under intense investigation, such as their effect on muscle contraction, calcium physiology, their influence on type 2 ryanodine receptors and on repolarization movements. Regarding this, the objective of this dissertation will be to carry out a literature review on the molecular and cellular effects of caffeine on cardiomyocytes, to explore how everything is intricately processed at a more microscopic level, which may subsequently lead to the most well-known cardiovascular outcomes mentioned above.

Keywords

Caffeine;cardiomyocytes;myocardium;calcium;sarcoplasmatic reticulum

Índice

1	Introdução	1
2	Métodos	3
3	A Cafeína	5
3.1	Breve história, usos e costumes	5
3.2	Consumo de cafeína sobre a forma de café, em Portugal	6
3.3	Composição, farmacocinética e farmacodinâmica	6
3.4	Efeitos gerais da cafeína sobre o corpo humano	8
4	Importância do estudo dos cardiomiócitos	11
5	Princípios da fisiologia elétrica e da contração muscular cardíaca	13
6	Efeitos moleculares da cafeína sobre os cardiomiócitos	17
7	Conclusão	23

Lista de Figuras

Fig.1 – Estrutura química da cafeína.

Fig.2 – Metabolização hepática da cafeína.

Fig. 3 – Esquema com as várias fases dos potenciais de ação nos cardiomiócitos. O *plateau* mais longo devido ao grande influxo de cálcio permite a contração muscular total.

Fig. 4 – Os 3 principais mecanismos para a manutenção dos gradientes de concentração de iões no sarcolema.

Fig.5 - Esquema ilustrativo da atuação do NCX e dos outros trocadores de iões nos cardiomiócitos.

Fig.6 - As 3 vias de manejo do cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

Lista de Acrónimos

SR	Retículo Sarcoplasmático
SK	Canais de potássio <i>small conductance</i>
EUA	Estados Unidos da América
NAT2	N-acetiltransferase 2
CYP	Citocromo P
SNC	Sistema Nervoso Central
RyR2	Recetores de rianodina tipo 2
SERCA	ATPase de cálcio do retículo sarcoendoplasmático
NCX	Trocador de sódio e potássio
AMPK	Proteína-quinase atividade por AMP
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
GGT	Gamaglutamiltransferase
ddp	Diferença de potencial
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica

1. Introdução

A cafeína, o psicostimulante mais consumido do mundo, é algo presente no dia a dia do ser humano. Desde a Antiguidade tem vindo a sofrer uma globalização cada vez maior, bem como uma modernização, por todas as suas novas formas de consumo, desde o tradicional café, às novas bebidas energéticas. O que antes, para os persas, era visto como uma substância medicinal, tornou-se agora um hábito cultural e recreativo. As “pausas para o café” a meio de um dia agitado de trabalho, o comportamento de beber um café como alvo de convívio e o exercício de beber cafeína para nos mantermos acordados já são gestos intrinsecamente ligados ao quotidiano um pouco por todo o mundo (1).

Partindo da relevância desta substância, em conjunto com a importância do bom funcionamento do sistema cardiovascular, torna-se importante estudar os efeitos da cafeína nesse sistema. A quantidade de cafeína ingerida diariamente, e se comporta consigo benefícios ou riscos cardiovasculares são temas amplamente discutidos. Nesta tese, demonstrarei a evidência atual na literatura face aos efeitos a nível microscópico (nos cardiomiócitos) da cafeína. A sua relação com a maquinaria celular e os potenciais de ação elétricos que contribuem para o produto final que é a contratilidade miocárdica será revista.

Sendo assim, começarei por dedicar uma secção à cafeína, abordando a sua história, muito brevemente, o consumo em Portugal, a sua farmacocinética e farmacodinâmica e os seus efeitos gerais no nosso organismo. De seguida, salientarei alguns aspetos da relevância do estudo dos cardiomiócitos, bem como da fisiologia elétrica e da contratilidade cardíaca de modo a ter uma melhor perceção do objeto de estudo principal: os efeitos moleculares da cafeína sobre os cardiomiócitos.

2. Métodos

Para esta revisão de literatura, a fonte de pesquisa bibliográfica que usei foi a *PubMed*. As palavras-chave usadas foram “caffeine” (Title/Abstract) AND “cardiomyocytes” (Title) AND “humans”, em diversas combinações com os dois operadores booleanos “AND” e/ou “OR”. A pesquisa apresentou um total de 28 artigos. Os critérios de inclusão adotados foram: artigos publicados nos últimos 10 anos, artigos redigidos em português e inglês e artigos que abordassem estudos em humanos, *in vivo* e *in vitro*. Os critérios de exclusão usados foram: artigos que se referissem exclusivamente a investigação animal, artigos posteriores a 10 anos, artigos de revisão, revisão sistemática e meta análises e artigos redigidos em francês e espanhol.

3. A Cafeína

3.1 Breve história, usos e costumes

Estima-se que o café, para além de ser a bebida consumida mais frequentemente com cafeína, seja a bebida mais popular do mundo, seguido naturalmente da água (2). Nos EUA, cerca de 85% dos adultos consomem cafeína (3). A prevalência da cafeína no consumo humano, quer sobre a forma de café, quer sobre a forma de bebidas energéticas e outras variedades, faz com o seu uso represente tanto um hábito cultural e recreativo, como também um intuito medicamentoso de aumento da vigília, foco e atenção. A cafeína encontra-se também em folhas de chá, grãos de cacau, pastilhas elásticas, bebidas energéticas e em fármacos (4,5). Para além disso, todas as novas formas de café com diferentes sabores e texturas, quer em cadeias de lojas dedicadas a isso, quer devido à venda livre em grandes superfícies, tornam o seu consumo mais num hábito do bem-estar quotidiano, do que propriamente num vício compulsivo.

A cafeína e a sua estrita relação com o café remontam já à história. O café é originado de uma planta chamada *Coffe Arabica*, originada na Etiópia. A sua origem arábica, da palavra “qahwah” que posteriormente deu origem no século XVII ao italiano “caffé” acompanhou a difusão europeia nessa época, do costume arábico de beber café.

Avicenna, médico persa, referiu pela primeira vez na sua obra “O Cânone da Medicina”, o uso do café na Medicina, como algo mais estético ou dermatológico, no caso para “conferir um melhor odor ao corpo e limpar a pele” (2).

A cafeína está incluída numa panóplia de plantas, e pensa-se que não sendo fundamental em termos nutritivos para as plantas, seria usada como mecanismo de defesa, devido ao seu poder pesticida (2).

Vários estudos descrevem esta substância como psicoativa em doses únicas servidas no dia a dia de várias bebidas e o seu consumo diário até 400 mg (ou 5,5 mg por kg num indivíduo de 75 kg), e afirmam que não acarreta riscos deletérios para a saúde. Para ter uma melhor noção em termos de quantidades, estima-se que por exemplo uma Coca-Cola de 350 mL contenha 35 mg de cafeína e que um café expresso de cerca de 150 mL, possa conter cerca de 90-150 mg. Sendo assim, e até pelo consumo elevado e prevalente entre a população mundial adulta, os 400 mg diários são atingidos facilmente, o que

reforça a importância do estudo dos efeitos da cafeína sobre a saúde e sobre o corpo humano (3).

A título de curiosidade, e devido ao seu poderoso efeito estimulante, até 2004, o COI considerava a cafeína como uma substância com efeito dopante.

3.2 Consumo de cafeína sobre a forma de café, em Portugal

A nível mundial, o consumo de cafeína é feito principalmente sobre a forma de café. Em Portugal, 80% da população adulta é consumidora de café. No entanto, os portugueses têm um consumo *per capita* baixo, consumindo em média 4,7 kg/ano, muito abaixo da média europeia (6,7). Segundo dados de 2011, cerca de 80% do consumo é feito em estabelecimentos recreativos como restaurantes, cafés ou bares (8). De forma mais recente, estas tendências têm mudado, visto que a acessibilidade do consumo de café em cápsulas tem aumentado significativamente. O negócio do café perfaz 5% da indústria alimentar da economia portuguesa (7).

O consumo de café, em Portugal, por parte de indivíduos do sexo feminino apesar de ser menor, tende para igualar o consumo no sexo masculino (7).

Numa nota extra, também o consumo de cafeína em território nacional sob a forma de suplementos termogénicos que auxiliam na perda de peso é algo significativo (5).

3.3 Composição, farmacocinética e farmacodinâmica

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é formada, como o próprio nome indica, quando 3 grupos metil são substituídos na substância principal xantina.

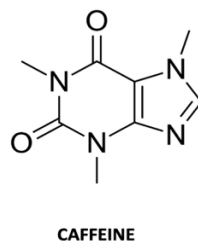


Fig.1 – Estrutura química da cafeína. Adaptado de: (4)

O seu pico de concentração no sangue, após a sua ingestão, dá-se entre os 30-60 minutos, no entanto, varia de indivíduo para indivíduo e de acordo com o esvaziamento gástrico. É absorvida principalmente no intestino delgado, sendo a sua absorção atrasada por

refeições concomitantes. A sua passagem pela barreira hematoencefálica dá-se prontamente e tem uma semivida plasmática estimada de 3-5h, estando presente em vários tecidos do corpo humano (3,4).

A sua metabolização de primeiro passo acontece no fígado pelo citocromo P450 1A2, responsável por mais de 80% da sua *clearance* inicial, rendendo como metabolito a paraxantina. Se outros grupos metil da cafeína forem dimetilados (o 1 ou o 7), podem-se obter teobromina ou teofilina. Para além disso, e apesar de minoritariamente, a xantina oxidase e N-acetiltransferase 2 (NAT2) também contribuem a degradação da cafeína (9). No entanto, a ingestão continuada de cafeína ao longo tempo leva a uma sobre-expressão da CYP450 1A2 e a um aumento da afinidade pela cafeína. Em relação à excreção, uma pequena percentagem é eliminada na urina em forma de cafeína, sofrendo reabsorção tubular em grande parte. Em adição, a cafeína também se encontra distribuída na bÍlis, saliva, sémen e leite materno. A paraxantina, o principal metabolito da cafeína, junto com a teobromina e depois a teofilina, são dimetilados e oxidados no fígado, sendo eliminados na forma de uratos (2).

Os níveis de cafeína mais altos correlacionam-se com uma maior duração do seu efeito (efeitos dose dependentes) devido a um atraso na resposta das enzimas do complexo microsómico enzimático e devido ao acúmulo da paraxantina e outros metabolitos ativos.

A gravidez, doenças hepáticas e cardiovasculares, infeções virais, medicamentos, drogas e tabacos são fatores alterantes da farmacocinética da cafeína (2,6).

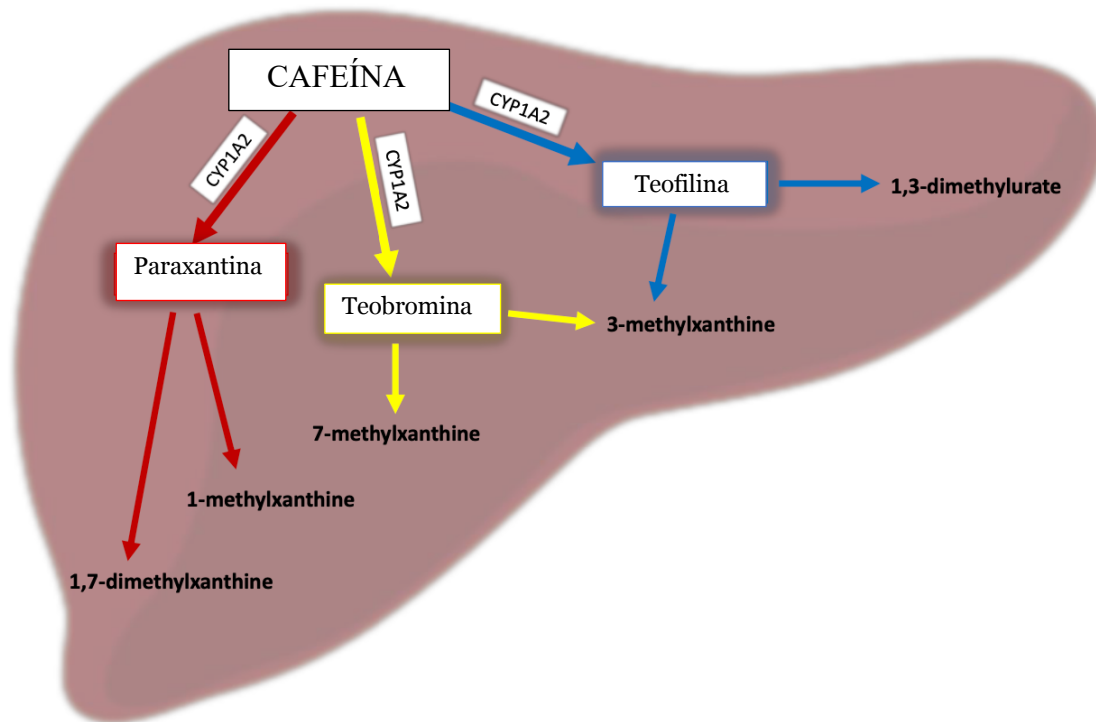


Fig.2 – Metabolização hepática da cafeína. Adaptado de: (4)

3.4 Efeitos gerais da cafeína sobre o corpo humano

Nesta subsecção incidirei de forma abreviada sobre as interações da cafeína com os principais sistemas de órgãos do corpo humano.

Uma das ações mais conhecidas deste psicoativo consiste no antagonismo não seletivo dos recetores da adenosina. A competição pelos recetores A1 e A2A crê-se que será responsável pelos efeitos comportamentais da cafeína devido à inibição da libertação de glutamato, noradrenalina, serotonina e acetilcolina pela adenosina. Ou seja, a cafeína tem sido associada à modulação da agressividade pelos seus efeitos serotoninérgicos. Este efeito de remoção do tónus da adenosina endógeno, é o que causa o efeito estimulante em período de várias horas de vigília, pela ligação da cafeína aos recetores A1 no prosencéfalo basal, tal como efeitos indiretos provocados pela noradrenalina. Os seus efeitos antagonistas nos recetores da adenosina também estão envolvidos na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas como o Parkinson ou a doença de Alzheimer, ao manter intacto as vias dopaminérgicas, removendo a inibição da adenosina no córtex estriado (3,10,11).

A cafeína aumenta o estado de alerta em pessoas fatigadas, sendo um efeito dose-dependente. Doses moderadas, nomeadamente entre 100 e 300 mg, resultam num aumento do estado de vigília, enquanto se crê que doses acima dos 400 mg podem causar ansiedade, principalmente em consumidores não habituais de cafeína ou pessoas com hábitos de sono saudáveis (3,10).

A cafeína também tem efeitos positivos na manutenção da atenção, humor, nos processos cognitivos superiores como o tempo de reação, na aprendizagem e, em medida crónica, na melhoria da memória provavelmente devido à neuroprotecção que exerce (3).

A cafeína promove os efeitos estimulantes da dopamina na atividade física. Ela também melhora o desempenho cognitivo, pensando-se que cerca de 150 mg desta aumenta esse desempenho por 10 horas, no mínimo, melhorando parâmetros como o tempo de reação, por exemplo. O seu efeito ansiogénico é dose-dependente e a concentrações mais baixas estimula também a atividade física. Pensa-se que este seu efeito ergogénico se relaciona com o que já foi mencionado acerca do SNC (antagonismo da adenosina), mais especificamente a diminuição da perceção da dor, ao retardar o aparecimento da sensação de fadiga e ao diminuir a sensação de esforço (4,12). Doses moderadas de cafeína ingeridas antes do exercício têm, então, um efeito benéfico no exercício de resistência (9). Num substrato musculoesquelético, autores admitem que a diminuição da atividade nervosa poderá estar conectada a um maior recrutamento de fibras musculares. A nível mais molecular, e de vital importância constituindo o objeto de estudo desta tese, fala-se também que a cafeína mantém os recetores de rianodina abertos nas células musculares e nos cardiomiócitos, induzindo uma libertação maior da reserva de cálcio pelo SR e a inibição da sua retirada para o SR, aumentando a contratilidade muscular, força e velocidade. A cafeína também tem sinergia com os picos de adrenalina e melhoram a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (4).

A nível cardiovascular, investigadores refere que o consumo de cafeína aumenta ligeiramente a pressão arterial, quer sistólica quer diastólica (13). A partir de uma certa quantidade ingerida, em que não existe consenso, desenvolve-se tolerância em relação à cafeína, o que resulta em que efeito hipertensor não seja tão marcado. O inotropismo provocado pela ação da cafeína terá a contribuição do aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular, da sensibilização dos recetores de dopamina e da libertação de noradrenalina (14). Foram também observados em estudos o aumento da atividade miogénica na microvasculatura (4). Abordando mais especificamente os fenómenos de condução elétrica do coração, a cafeína tem um efeito arritmogénico. Isto seria mediado

por provocar uma maior liberação de dopamina e noradrenalina, através do antagonismo dos recetores de adenosina. As taquiarritmias são, então, provocadas devido a um aumento da ativação dos recetores β_1 (2). O antagonismo do efeito vasodilatador da adenosina e o aumento da atividade simpática, podem levar a diminuição do recrutamento capilar e a uma redução da perfusão miocárdica (15). Outro mecanismo arritmogénico e que é consonante com o aumento da contratilidade cardíaca, é a inibição das fosfodiesterases por parte da cafeína, aumentando a concentração de cAMP e cGMP (2). Logo, um consumo elevado de cafeína, pode aumentar o risco de doença coronária (4,12).

No sistema digestivo, e devido à sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, as enzimas hepáticas (AST, GGT e ALT) e a bilirrubina apresentam-se em níveis mais baixos. A cafeína faz subir a produção de suco gástrico e aumenta a produção de gastrina, levando a um relaxamento do músculo liso gastrointestinal (16). Também há um maior estímulo para secreção do ácido clorídrico, o que ocasiona aumento da inflamação da mucosa (16). Um efeito mais negativo acaba por ser a sua interferência com a absorção de ferro e a diminuição da disponibilidade biológica do zinco (4,17).

Em relação ao sistema urinário, aumenta a taxa de filtração glomerular devido à disrupção do mecanismo de feedback tubuloglomerular em que a arteríola aferente, em resposta ao maior débito urinário e por ligação da adenosina, contrai. A cafeína também provoca um aumento na natriurese e da produção de urina, impedindo a reabsorção proximal de sódio (18). Provoca também instabilidade do músculo detrusor da bexiga quando ingerida em grandes quantidades (acima de 400 mg/dia). É facilitadora da sensação de urgência miccional e aumenta a frequência miccional (4).

4. Importância do estudo dos cardiomiócitos

A doença cardiovascular é a principal causa de morte no mundo, matando cerca de 18 milhões de pessoas por ano (19). A pandemia por COVID-19 fez com que a pesquisa na área cardiovascular parasse. Nalguns casos, inclusive, investigações quer clínicas quer farmacológicas tiveram de começar do zero novamente, o que fez com que o conhecimento científico nesta área estagnasse (19). Tomando estes acontecimentos como mote, é essencial continuar-se a pesquisa afincadamente em tudo o que envolva doenças ou riscos cardiovasculares, já que acarretam consigo uma carga de mortalidade muito pronunciada.

Em termos celulares, os cardiomiócitos são as células fundamentalmente responsáveis pela contração muscular cardíaca sustentada, que é influenciada pela matriz extracelular, vascularização, sistema nervoso autônomo e agentes inflamatórios, entre outros (20). A aurícula contém substratos miocárdicos importantes que contribuem para a criação de arritmias, deste modo, tornando relevante a aplicação do seu estudo na cafeína, que tem efeito arritmogénico conhecido (4,21). No caso dos cardiomiócitos ventriculares, e sendo sabido que não tem automaticidade para gerar potenciais de ação (pacemaker), as arritmias podem-se verificar, mas seriam sempre provenientes da não condução dos potenciais de ação, ou de um ritmo focal aberrante (20).

Transtornos de condução focais nos ventrículos, como despolarizações precoces ou tardias podem ser causadas pela incorreta ativação e funcionamento das correntes iónicas, bem como da maquinaria celular (canais) envolvidos neste processo. Pelas propriedades sinciciais dos cardiomiócitos ventriculares, isto pode afetar a contração dos cardiomiócitos adjacentes, levando a uma contração muscular cardíaca dessincronizada (20). Esta dessincronia também pode ser provocada pela falta de conexão juncional entre as *gap junctions* dos cardiomiócitos, resultando conseqüentemente em atividade arritmogénica focal (22).

Conclui-se então, que os cardiomiócitos, por todas estas propriedades, e por serem a unidade fundamental do coração, têm toda a relevância em serem estudados.

5. Princípios da fisiologia elétrica e da contração muscular cardíaca

Os potenciais de ação das células musculares cardíacas, também designadas de cardiomiócitos, têm 5 fases. Os potenciais de ação definem-se como mudanças repentinas na voltagem da membrana celular, por um estímulo elétrico. A duração de um potencial de ação em cardiomiócitos estima-se que seja de entre 200 e 400 ms. As concentrações dos iões Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} são maiores fora da célula do que dentro, enquanto no caso do K^+ se verifica o inverso (23).

As fases do potencial no cardiomiócitos costumam ser numeradas de 0 a 4. Em repouso, a diferencial de potencial entre o meio extracelular e o meio intracelular costuma rondar os -90 mV (23,24). Esta diferença, na fase 4, é mantida principalmente por correntes para o exterior de potássio, segundo o seu gradiente, através dos canais K_1 (canais de potássio *inward rectifiers*) (23). Devido ao efeito sincicial entre os miócitos que conduzem o estímulo, acontece a fase 0 (fase de despolarização rápida) que faz com que os canais rápidos de Na^+ e os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L fazendo com que o sódio e o cálcio entrem na célula, concomitantemente com o fecho dos canais de K^+ , e que rapidamente se atinja uma diferença de potencial de 120 mV.

Na fase 1, existe uma pequena diminuição da ddp, ou seja, uma pequena repolarização. Os canais rápidos de sódio encerram e os canais de K^+ transientes (K_t) abrem-se (23). Os canais de cálcio tipo-L mantém-se no seu estado aberto e este ião continua a entrar na célula, havendo seguidamente um período de estabilização no potencial que se crê ser nos 110 mV (fase 2, “plateau”) (24). É nesta fase também que o cálcio intracelular, nomeadamente do SR, é libertado, contribuindo para a contração muscular mecânica. Na fase de repolarização rápida, fase 3, os cardiomiócitos repolarizam através do fecho dos canais de cálcio do tipo L e da abertura dos canais de potássio *delayed rectifiers* (ddp: -90 mV) (24). A manutenção, posteriormente, da abertura dos canais K_1 leva ao retorno do potencial de ação para o original (23).

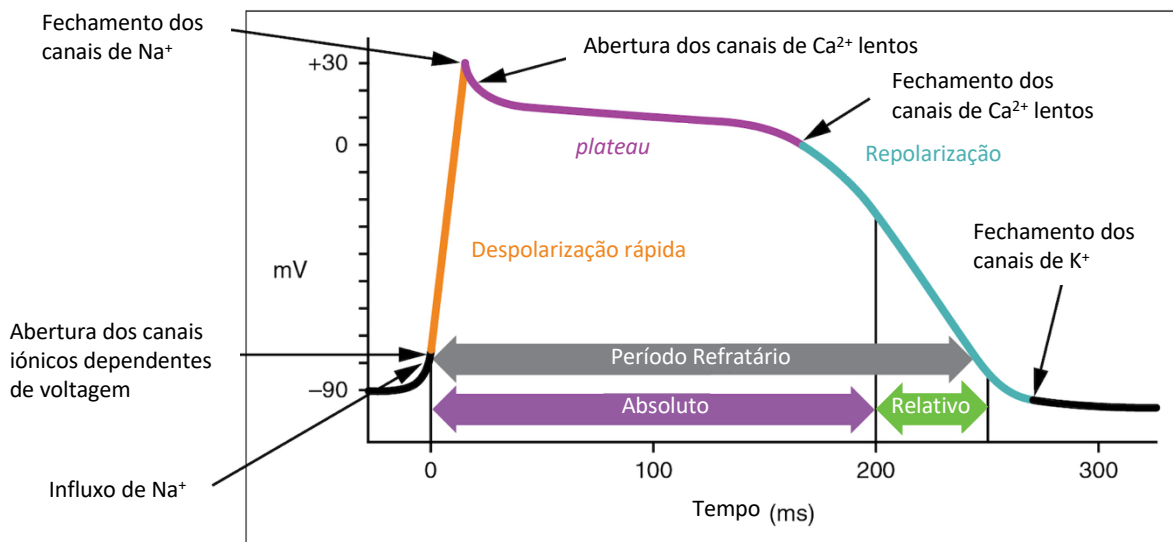


Fig. 3 – Esquema com as várias fases dos potenciais de ação nos cardiomiócitos. O *plateau* mais longo devido ao grande influxo de cálcio permite a contração muscular total. Adaptado de: (25)

Existem, também, mecanismos responsáveis para a manutenção do potencial de repouso no sarcolema. Um deles é a Na^+/K^+ -ATPase que faz o transporte de 3 íons de Na^+ para fora da célula e de 2 íons de K^+ para fora da célula. Isto faz com que o sódio que na despolarização havia entrado na célula seja removido e que se reponham os níveis intracelulares de K^+ (23).

O segundo grande mecanismo para a manutenção do potencial eletroquímico de repouso da célula é o NCX, que se revelará importante para as ações da cafeína. Este transportador, não dependente de ATP, faz a troca de 3 íons Na^+ por um de Ca^{2+} . Pode funcionar nas 2 direções dependendo do potencial de ação e da quantidade destes íons disponível, no entanto, supõe-se que exerça a sua ação maioritária no sentido da saída de cálcio das células (23,26).

O terceiro mecanismo responsável pela restauração da diferença de potencial é a Ca^{2+} -ATPase, que medeia o efluxo de cálcio para fora da célula contra o seu gradiente de concentração, tornando o meio intracelular mais negativo (23,27).

Para concluir, o conceito de período refratário absoluto significa que a célula está completamente despolarizada e por isso não consegue despolarizar na presença de qualquer tipo de estímulo (fases 1 e 2 do potencial de ação). No período refratário relativo, por sua vez, o cardiomiócito está parcialmente repolarizado e pode responder a um estímulo, desde que seja suficientemente intenso (fase 3 até ao limiar de despolarização). Este período é clinicamente relevante, devido a já poderem ocorrer

contrações, representando um substrato para a gênese de arritmias. É um mecanismo importantíssimo na regulação da contração muscular mediada por impulsos elétricos, já que impede a contração miocárdica excessiva. Dessa forma existe uma contração muscular contínua e organizada por todo o miocárdio, mantendo a boa função cardíaca (24).

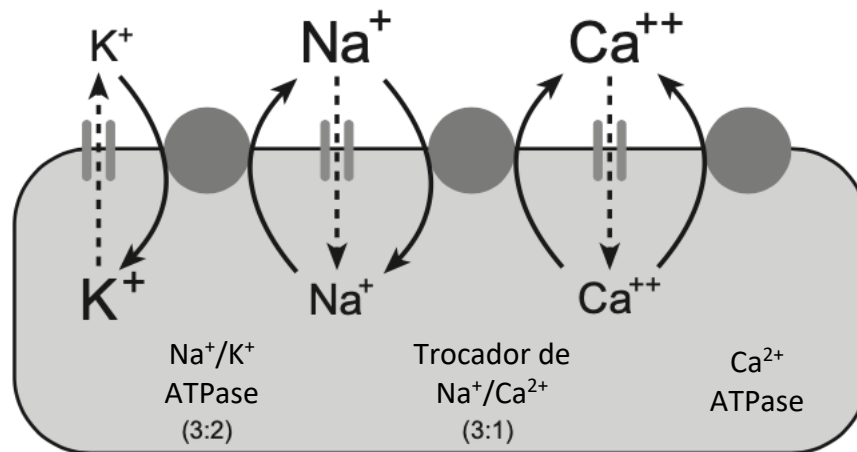


Fig. 4 – Os 3 principais mecanismos para a manutenção dos gradientes de concentração de íons no sarcolema. Adaptado de: (23)

6. Efeitos moleculares da cafeína sobre os cardiomiócitos

Nas secções anteriores, foram revistos os princípios da fisiologia cardíaca necessários à compreensão dos efeitos da cafeína nos cardiomiócitos.

Na verdade, não há consenso científico sobre os efeitos major da cafeína, a nível cardiovascular. Muitos estudos já foram realizados sobre a toma de bebidas energéticas e os supostos efeitos deletérios da cafeína presente nessas bebidas, no entanto novas evidências sugerem que esses efeitos seriam mediados não em específico pela cafeína, mas sim devido a outros estimulantes concomitantemente presentes. A título de exemplo, a taurina presente nestas bebidas é reportada como tendo um efeito inotrópico, todavia, em conjugação com a cafeína, a contratilidade miocárdica aumenta ainda mais (28). A cafeína também altera o comportamento contrátil dos cardiomiócitos da aurícula direita. Apesar da cafeína em elevadas quantidades levar a overdose e a consequente taquicardia pelos seus efeitos arritmogénicos (29), este aumento do cronotropismo foi mais acentuado com a mesma quantidade de cafeína ingerida, mas através de bebidas energéticas, até porque não se verificou um prolongamento do intervalo QT nem do efeito cronotrópico com uma ingestão isolada de cafeína (28).

Já num substrato microscópico, grande parte da sua ação inotrópica vai passar pelo retículo sarcoplasmático, ao interferir com a atividade dos recetores de rianodina tipo 2 (30). Pequenas concentrações de cafeína interferem na quantidade basal de Ca^{2+} presente e no potencial elétrico de disparo, contudo, doses mais elevadas interferem nos recetores de rianodina já previamente referidos (31). Infere-se, então, que a cafeína atua nos cardiomiócitos através de um mecanismo dose-dependente. Os recetores RyR_2 , quando fosforilados, medeiam o efluxo de iões de cálcio do retículo sarcoplasmático (32)(33). Em cada ciclo de contração-relaxamento muscular, o Ca^{2+} entra no citoplasma através destes últimos recetores, mas também através dos canais tipo-L de Ca^{2+} presentes no sarcolema (34).

A cafeína, agonista do RyR (35), liga-se a este recetor mediando e amplificando as suas ações, ao reduzir o seu limiar de ativação pelo cálcio luminal (36)(37), prolongando a sua depleção de cálcio livre no tempo e reduzindo o seu conteúdo no retículo sarcoplasmático (SR), o que faz com que a corrente despolarizante de cálcio se mantenha mais tempo (33,38). Num referencial cartesiano, ver-se-ia esse aumento do potencial no eixo das ordenadas que mede a amplitude e no eixo do x, que mede o tempo. Abordando a

contração muscular influenciada pela cafeína, o aumento repentino da amplitude da corrente de Ca^{2+} é simultâneo com o início da cessação das contrações, seguindo-se de uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} no citosol com resolução das contrações (39). Sendo assim, a cafeína reveste-se de elevada importância no estudo das reservas de cálcio do SR, induzindo a sua libertação total no citoplasma e não permitindo a sua recaptação pela abertura deste (40)(41). Essa amplificação denota-se pelo facto de os potenciais de cálcio atingirem um pico maior e mais abrupto e, conseqüentemente, decaírem de forma mais marcada e repentina, ou seja, traduz-se num aumento da amplitude do potencial (42). Como existe uma atividade elétrica mais desorganizada relacionada à maior disponibilidade de cálcio livre no citosol, os picos de cálcio são mais frequentes, aumentando a frequência cardíaca (43)(44). O influxo de cálcio através dos canais Ca^{2+} tipo-L também constitui um estímulo para a saída de cálcio do SR. Esse efluxo do Ca^{2+} do SR, embora de forma muito menos considerável que os canais tipo-L, também constitui um estímulo para a ativação dos canais SK (que são ativados por Ca^{2+} e libertam iões K^+ segundo o gradiente de concentração, ou seja, para o meio extracelular), o que revela que a cafeína acaba por ter um papel indireto na repolarização (45).

A contração muscular dos cardiomiócitos é influenciada pela cafeína, também, na medida em que a sua frequência de contração está associada à sensibilidade à cafeína, aumentando com a dose administrada. Eventualmente, atinge-se uma determinada dose máxima que é responsável pelo esvaziamento completo do SR, o que cessa a contração espontânea nos cardiomiócitos (31). Também as correntes espontâneas despolarizantes nos cardiomiócitos são inibidas pela cafeína, apesar de estarem inicialmente aumentadas aquando da aplicação da mesma, pela sensibilização dos recetores RyR2. Esse efeito desaparece, devido à depleção das reservas do retículo sarcoplasmático. No entanto, de realçar que, pese embora este mecanismo de redução do ritmo de *pacemaker* por atraso na despolarização diastólica, a cafeína não consegue eliminar os potenciais de ação elétricos espontâneos (46).

O poder inotrópico positivo da cafeína é limitado pela atividade da SERCA (ATPase de Cálcio do Retículo Sarcoendoplasmático) que é um dos mecanismos responsáveis pela *clearance* de cálcio do citosol, depois da despolarização e ajuda a mediar o mecanismo excitação-contração induzido pelo cálcio (47,48). À semelhança do previamente mencionado, o trocador de sódio e cálcio (NCX) presente no sarcolema, responsável pela remoção de cálcio do citosol pela troca com o Na^+ extracelular, é também um fator limitante na atuação da cafeína como agente despolarizante, já que o Ca^{2+} diastólico diminui com o auxílio deste trocador (40)(49). A libertação de Ca^{2+} induzida pela cafeína,

ativa o NCX, que atua de acordo com a subida e descida do cálcio citosólico (50). No entanto, autores comprovam que a contribuição do NCX é muito mais significativa para a resolução do pico de cálcio citoplasmático induzido pela cafeína, sendo o causador fundamental da restauração das reservas de Ca^{2+} (40). A sua inibição gerou picos de cálcio provocados pela cafeína maiores, tal como uma presença maior de Ca^{2+} sistólico. A própria cafeína, ao manter os recetores de rianodina abertos, inibe essa via de recaptação do cálcio para o SR, o que realça ainda mais o papel importante do NCX sobre a homeostasia do Ca^{2+} , alterada pela cafeína (51). Todos estes fenómenos são indicativos que o aumento do cálcio intracelular e o aumento consequente da corrente de iões através do NCX geram a atividade espontânea destas células (31). Na verdade, autores afirmam inclusivamente que uma baixa concentração de cafeína pode levar a uma diminuição do Ca^{2+} disponível no citoplasma para a contração muscular. O mecanismo que se pensa subjacente é que a cafeína em baixa concentração leve também a uma pequena quantidade de Ca^{2+} libertada pelo SR, que pode ser o necessário para atingir o limiar de ativação do NCX, e que por sua vez, causaria uma exteriorização do Ca^{2+} e à baixa do seu nível intracelular (30).

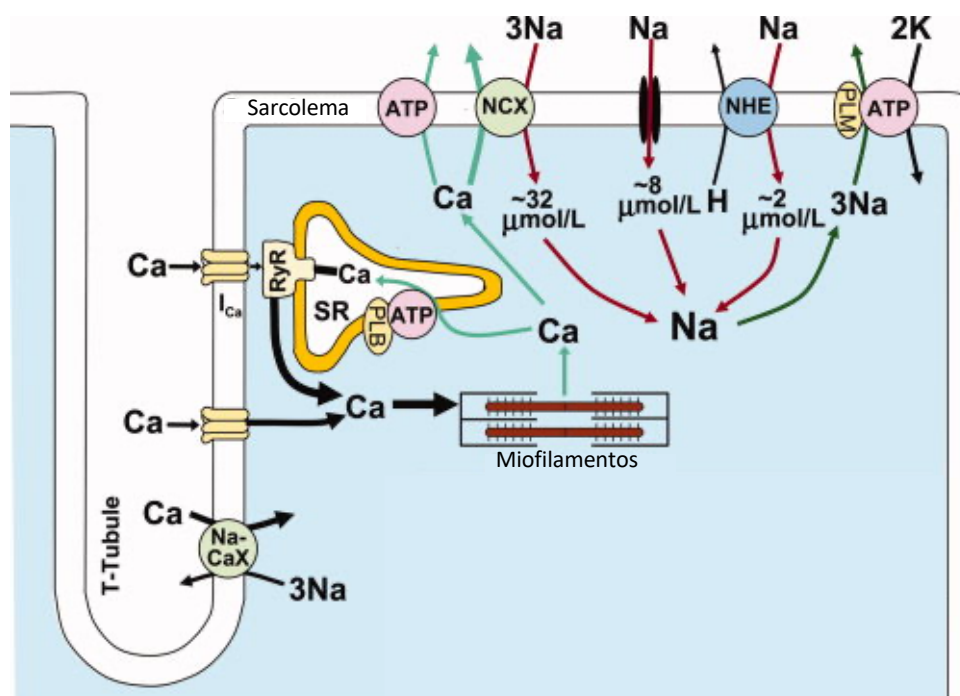


Fig.5 – Esquema ilustrativo da atuação do NCX e dos outros trocadores de iões nos cardiomiócitos. Adaptado de: (52)

Outros mecanismos que contribuem menos para essa remoção do Ca^{2+} , mas também patentes, são a ATPase de Ca^{2+} na membrana plasmática ou a mitocôndria (34). Todos

estes processos necessitam de estar operacionais para que, de forma eficaz, se consiga que o Ca^{2+} esteja pronto a ser libertado na seguinte contração (53).

Foi investigado também que as mitocôndrias intervêm na homeostasia do Ca^{2+} intracelular, no entanto de forma mais atrasada em relação às correntes citosólicas. Quer durante a atividade rítmica espontânea, quer após a exposição a cafeína, as populações periféricas de mitocôndrias absorviam rapidamente uma parte do Ca^{2+} libertado pelo SR. Já as mitocôndrias em posição mais perinuclear primeiramente sequestram o Ca^{2+} e depois libertam-no. Os potenciais das mitocôndrias costumam ser mais diminuídos e atrasados no tempo em relação aos citosólicos. No entanto, as mitocôndrias podem contribuir para uma maior quantidade de Ca^{2+} libertado para o citosol se as suas emissões de cálcio referidas anteriormente acontecerem sincronamente à corrente de cálcio citoplasmático (54).

Há alguns fatores que influenciam, todavia, as ações da cafeína como por exemplo a presença de Ca^{2+} extracelular, que aumenta a resposta dos cardiomiócitos(32). A atividade da calsequestrina, em caso de elevada afinidade para o Ca^{2+} também altera a sua disponibilidade, e no caso de resposta diminuída à cafeína, esta pode não advir de uma diminuição absoluta do Ca^{2+} , mas sim do Ca^{2+} livre no SR (39).

Autores também documentam que a privação de glicose aumenta a magnitude da libertação de cálcio pelo SR, traduzindo um aumento das suas reservas no SR. Crê-se que a policistina-2 interaja com os recetores de rianodina tipo 2 mediando estes efeitos quer em correntes espontâneas de Ca^{2+} , quer induzidas pela cafeína (55). Este aumento do Ca^{2+} citosólico causa a ativação da proteína-quinase ativada por AMP (AMPK), que estimula a cascata autofágica, prevenindo a apoptose dos cardiomiócitos (56).

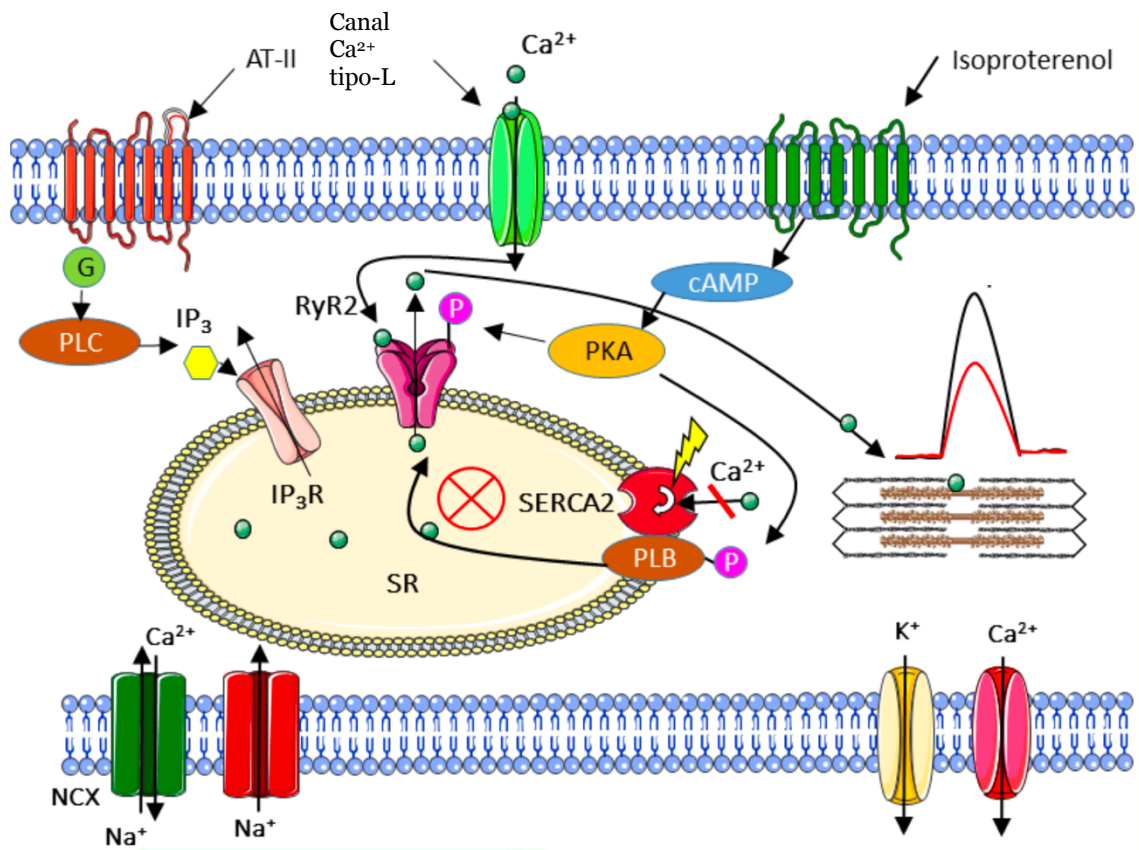


Fig.6 – As 3 vias de manejo do cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Adaptado de: (56)

7. Conclusão

Concluindo, a cafeína é uma substância amplamente consumida pela população mundial e, apesar do seu consumo em Portugal ser menor em termos absolutos comparativamente à média europeia, é algo muito prevalente no nosso dia a dia. Os seus efeitos multissistémicos, incluindo uma maior libertação de dopamina e noradrenalina, através do antagonismo dos recetores de adenosina, e a inibição das fosfodiesterases por parte da cafeína, aumentando a concentração de cAMP e cGMP. Estes mecanismos de atuação a nível cardiovascular vão complementar o que é verificado nos cardiomiócitos.

Com esta revisão de literatura, concluo que a cafeína exerce muito dos seus efeitos pela ligação aos recetores de rianodina no retículo sarcoplasmático, induzindo a total libertação de cálcio no citosol e tem um poder inotrópico dose-dependente, por esta maior disponibilidade de cálcio. Este efeito visível é conivente com o aumento da amplitude do potencial de ação e com o efeito arritmogénico de redução do ritmo de *pacemaker* por atraso na despolarização diastólica. Autores também chegaram à ideia de que a frequência de contração dos cardiomiócitos está associada à sensibilidade à cafeína, aumentando com a dose administrada. Fatores como a atividade da SERCA e do NCX foram demonstrados que são limitantes para a os efeitos da cafeína na atividade intracelular.

Tendo em conta todos estes efeitos, e aplicando-os ao nosso dia a dia, um café expresso contém cerca de 90-150 mg por cada dose de café servido, logo será seguro beber até cerca de 3 cafés por dia; uma vez que não há consenso científico sobre a segurança da cafeína em doses diárias a partir dos 400 mg. No entanto, é importante fazer a ressalva de que, devido à sua interação com a fisiologia do cálcio e da contração muscular, pelo aumento que causa na pressão arterial e pela ativação dos recetores β_1 causadores de taquiarritmias, pode ser importante limitar o seu consumo em doses mais baixas em doentes com hipertensão arterial ou com alguma síndrome coronária. Serão necessários mais estudos e investigações para determinar melhor o valor de *cut-off* a partir do qual o consumo de cafeína não apresenta riscos acrescidos, quer para a população em geral, quer para subgrupos específicos, como indivíduos com fatores de risco cardiovasculares ou doença cardiovascular estabelecida e grávidas.

Referências:

1. Pesta DH, Angadi SS, Burtscher M, Roberts CK. The effects of caffeine, nicotine, ethanol, and tetrahydrocannabinol on exercise performance. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10:1–15.
2. Cappelletti S, Daria P, Sani G, Aromatario M. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Curr Neuropharmacol*. 2015;13:71–88.
3. McLellan TM, Caldwell JA, Lieberman HR. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. Vol. 71, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd; 2016. p. 294–312.
4. Rodak K, Kokot I, Kratz EM. Caffeine as a factor influencing the functioning of the human body—friend or foe? *Nutrients*. 2021 Sep 1;13(9).
5. Lopes MDM, Capela JP. Estudo comparativo da composição dos suplementos alimentares termogénicos contendo cafeína disponíveis em Portugal. *Acta Portuguesa de Nutrição*. 2017;24–36.
6. Matias F, Jeri A, Rodrigues S. Consumo de cafeína: o que aconselhar na preconcepção e gravidez? *Revista Portuguesa Medicina Geral e Familiar*. 2017;33:56–62.
7. Borges PML. Caracterização do perfil dos consumidores de café em Portugal - impacto do género. [Lisboa]: Universidade de Lisboa; 2016.
8. Alexandra Marques de Almeida S. Consumo de café pelos estudantes de Medicina da Universidade da Beira Interior. [Covilhã]: Universidade da Beira Interior; 2015.
9. Barcelos RP, Lima FD, Carvalho NR, Bresciani G, Royes LF. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. Vol. 80, *Nutrition Research*. 2020. p. 1–17.
10. Einöther SJL, Giesbrecht T. Caffeine as an attention enhancer: Reviewing existing assumptions. Vol. 225, *Psychopharmacology*. 2013. p. 251–74.
11. Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal*. 2005;1:111–34.
12. Bessada SMF, Alves RC, Oliveira MBPP. Caffeine-based food supplements and beverages: Trends of consumption for performance purposes and safety concerns. *Food Research International*. 2018 Jul 1;109:310–9.
13. Noordzij M, Uiterwaal CSPM, Arends LR, Kok FJ, Grobbee E, Geleijnse JM. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*. 2005;23:921–8.

14. Chaban R, Kornberger A, Branski N, Buschmann K, Stumpf N, Beiras-Fernandez A, et al. In-vitro examination of the positive inotropic effect of caffeine and taurine, the two most frequent active ingredients of energy drinks. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017 Aug 10;17(1):1–8.
15. Godos J, Pluchinotta FR, Marventano S, Buscemi S, Volti GL, Galvano F, et al. Coffee components and cardiovascular risk: Beneficial and detrimental effects. Vol. 65, *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* Informa Healthcare; 2014. p. 925–36.
16. Publishing Asia B, Lohsiriwat S, Puengna N, Leelakusolvong S. Effect of caffeine on lower esophageal sphincter pressure in Thai healthy volunteers. *Diseases of the Esophagus.* 2006;19:183–8.
17. Dyck K Van, Tas S, Robberecht H, Deelstra H. The influence of different food components on the in vitro availability of iron, zinc and calcium from a composed meal. *International Journal of Food Science and Nutrition.* 1996;47:499–506.
18. Lohsiriwat S, Hirunsai M, Chaiyaprasithi B. Effect of caffeine on bladder function in patients with overactive bladder symptoms. *Urol Ann.* 2011 Jan;3(1):14–8.
19. Somberg J. The Importance of Cardiology Research. *Cardiol Res.* 2020 Dec 1;11(6):355.
20. Wright PT, Gorelik J, Harding SE. Electrophysiological remodeling: Cardiac t-tubules and β -adrenoceptors. *Cells.* 2021 Sep 1;10(9):2456.
21. Masson-Pévet M, Gros D, Besselsen E. The Caveolae in Rabbit Sinus Node and Atrium. *Cell Tissue Res.* 1980;208:183–96.
22. Lang D, Sato D, Jiang Y, Ginsburg KS, Ripplinger CM, Bers DM. Calcium-Dependent Arrhythmogenic Foci Created by Weakly Coupled Myocytes in the Failing Heart. *Circ Res.* 2017 Dec 8;121(12):1379–91.
23. Klabunde RE. Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. *Adv Physiol Educ.* 2017;41:29–37.
24. Kennedy A, Finlay DD, Guldenring D, Bond R, Moran K, McLaughlin J. The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. Vol. 28, *Critical Care Nursing Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2016. p. 269–79.
25. OpenStaxCollege. Cardiac Muscle and Electrical Activity [Internet]. [cited 2023 Apr 29]. Available from: <https://pressbooks-dev.oer.hawaii.edu/anatomyandphysiology/chapter/cardiac-muscle-and-electrical-activity/>

26. Eisner DA, Sipido KR. Sodium calcium exchange in heart: Necessity or luxury? Vol. 95, *Circulation Research*. 2004. p. 549–51.
27. Noble D, Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in cell function. *EMBO Rep*. 2007 Mar;8(3):228–32.
28. Luo YS, Chen Z, Blanchette AD, Zhou YH, Wright FA, Baker ES, et al. Relationships between constituents of energy drinks and beating parameters in human induced pluripotent stem cell (iPSC)-Derived cardiomyocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2021 Mar 1;149.
29. Pesl M, Pribyl J, Acimovic I, Vilotic A, Jelinkova S, Salykin A, et al. Atomic force microscopy combined with human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for biomechanical sensing. *Biosens Bioelectron*. 2016;85:751–7.
30. Luo X, Li W, Künzel K, Henze S, Cyganek L, Strano A, et al. IP₃R-Mediated Compensatory Mechanism for Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes With Cardiac Ryanodine Receptor Deficiency. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Aug 12;8:1–21.
31. Kim JJ, Yang L, Lin B, Zhu X, Sun B, Kaplan AD, et al. Mechanism of automaticity in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Apr 1;81:81–93.
32. Di Baldassarre A, D'Amico MA, Izzicupo P, Gaggi G, Guarnieri S, Marigliò MA, et al. Cardiomyocytes derived from human cardiopoietic amniotic fluids. *Sci Rep*. 2018;8(1):12028.
33. Savio-Galimberti E, Knollmann BC. Channel activity of cardiac ryanodine receptors (RyR2) determines potency and efficacy of flecainide and R-propafenone against arrhythmogenic calcium waves in ventricular cardiomyocytes. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):1–15.
34. Hwang HS, Kryshtal DO, Feaster TK, Sánchez-Freire V, Zhang J, Kamp TJ, et al. Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Aug 1;85:79–88.
35. Chan HYS, Cheung MC, Gao Y, Miller AL, Webb SE. Expression and reconstitution of the bioluminescent Ca²⁺ reporter aequorin in human embryonic stem cells, and exploration of the presence of functional IP₃ and ryanodine receptors during the early stages of their differentiation into cardiomyocytes. *Sci China Life Sci*. 2016 Aug 1;59(8):811–24.
36. Mekies LN, Regev D, Eisen B, Fernandez-Gracia J, Baskin P, Ben Jehuda R, et al. Depressed β -adrenergic inotropic responsiveness and intracellular

- calcium handling abnormalities in Duchenne Muscular Dystrophy patients' induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2021 Apr 1;25(8):3922–34.
37. Fong AH, Romero-López M, Heylman CM, Keating M, Tran D, Sobrino A, et al. Three-Dimensional Adult Cardiac Extracellular Matrix Promotes Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Tissue Eng Part A*. 2016 Aug 1;22(15–16):1016–25.
 38. Pianezzi E, Altomare C, Bolis S, Balbi C, Torre T, Rinaldi A, et al. Role of somatic cell sources in the maturation degree of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Mar 1;1867(3).
 39. Schick R, Mekies LN, Shemer Y, Eisen B, Hallas T, Jehuda R Ben, et al. Functional abnormalities in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes generated from titin-mutated patients with dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2018 Oct 1;13(10):1–25.
 40. Gao J, Shi X, He H, Zhang J, Lin D, Fu G, et al. Assessment of sarcoplasmic reticulum calcium reserve and intracellular diastolic calcium removal in isolated ventricular cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments*. 2017 Sep 18;2017(127):1–6.
 41. Wang BX, Kane C, Nicastro L, King O, Kit-Anan W, Downing B, et al. Integrins Increase Sarcoplasmic Reticulum Activity for Excitation–Contraction Coupling in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 1;23(18):10940.
 42. Novak A, Barad L, Lorber A, Gherghiceanu M, Reiter I, Eisen B, et al. Functional abnormalities in iPSC-derived cardiomyocytes generated from CPVT1 and CPVT2 patients carrying ryanodine or calsequestrin mutations. *J Cell Mol Med*. 2015 Aug 1;19(8):2006–18.
 43. Caluori G, Pribyl J, Cmiel V, Pesl M, Potocnak T, Provaznik I, et al. Simultaneous study of mechanobiology and calcium dynamics on hESC-derived cardiomyocytes clusters. *Journal of Molecular Recognition*. 2019 Feb 1;32(2):1–9.
 44. Bousette N, Abbasi C, Chis R, Gramolini AO. Calnexin silencing in mouse neonatal cardiomyocytes induces Ca²⁺ cycling defects, ER stress, and apoptosis. *J Cell Physiol*. 2014 Mar;229(3):374–83.
 45. Zhang XD, Coulibaly ZA, Chen WC, Ledford HA, Lee JH, Sirish P, et al. Coupling of SK channels, L-Type Ca²⁺ channels, and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):4670.

46. Choi SW, Lee HA, Moon SH, Park SJ, Kim HJ, Kim KS, et al. Spontaneous inward currents reflecting oscillatory activation of Na⁺/Ca²⁺ exchangers in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* 2016 Apr 1;468(4):609–22.
47. Altrocchi C, de Korte T, Bernardi J, Spätjens RLHMG, Braam SR, Heijman J, et al. Repolarization instability and arrhythmia by IKr block in single human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and 2D monolayers. *Europace.* 2020 Sep 1;22(9):1431–41.
48. Chan YC, Ting S, Lee YK, Ng KM, Zhang J, Chen Z, et al. Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013 Dec;6(6):989–99.
49. Pioner JM, Santini L, Palandri C, Langione M, Grandinetti B, Querceto S, et al. Calcium handling maturation and adaptation to increased substrate stiffness in human iPSC-derived cardiomyocytes: The impact of full-length dystrophin deficiency. *Front Physiol.* 2022 Nov 7;13:1–15.
50. Zhang XH, Haviland S, Wei H, Šarić T, Fatima A, Hescheler J, et al. Ca²⁺ signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects. *Cell Calcium.* 2013;54(2):57–70.
51. Hegner P, Drzymalski M, Biedermann A, Memmel B, Durczok M, Wester M, et al. SAR296968, a Novel Selective Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Inhibitor, Improves Ca²⁺ Handling and Contractile Function in Human Atrial Cardiomyocytes. *Biomedicines.* 2022 Aug 1;10(8):1932.
52. Bers DM, Despa S. Na⁺ transport in cardiac myocytes; implications for excitation-contraction coupling. *IUBMB Life.* 2009;61(3):215–21.
53. Beauchamp P, Moritz W, Kelm JM, Ullrich ND, Agarkova I, Anson BD, et al. Development and Characterization of a Scaffold-Free 3D Spheroid Model of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Aug 1;21(8):852–61.
54. Haviland S, Cleemann L, Kettlewell S, Smith GL, Morad M. Diversity of mitochondrial Ca²⁺ signaling in rat neonatal cardiomyocytes: Evidence from a genetically directed Ca²⁺ probe, mitycam-E31Q. *Cell Calcium.* 2014;56(3):133–46.
55. Lu J, Boheler KR, Jiang L, Chan CW, Tse WW, Keung W, et al. Polycystin-2 Plays an Essential Role in Glucose Starvation-Induced Autophagy in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells.* 2018 Apr 1;36(4):501–13.

56. Hallas T, Eisen B, Shemer Y, Ben Jehuda R, Mekies LN, Naor S, et al. Investigating the cardiac pathology of SCO₂-mediated hypertrophic cardiomyopathy using patients induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb 1;22(2):913–25.