

The calcium paradox - What should we have to fear?

Paradoxo do cálcio - o que temos a temer?

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Husseni Botelho², MD; José Luís Lasso Cortez³, MD; Gilberto Goissis⁴, PhD; Domingo Marcolino Braile⁵, MD, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140054

RBCCV 44205-1547

Abstract

The calcium paradox was first mentioned in 1966 by Zimmerman et al. Thereafter gained great interest from the scientific community due to the fact of the absence of calcium ions in heart muscle cells produce damage similar to ischemia-reperfusion. Although not all known mechanisms involved in cellular injury in the calcium paradox intercellular connection maintained only by *nexus* seems to have a key role in cellular fragmentation. The addition of small concentrations of calcium, calcium channel blockers, and hyponatraemia hypothermia are important to prevent any cellular damage during reperfusion solutions with physiological concentration of calcium.

Descriptors: Heart Arrest, induced. Myocardial Ischemia. Calcium.

Resumo

O paradoxo do cálcio foi pela primeira vez citado em 1966 por Zimmerman et al. A partir daí, ganhou grande interesse por parte da comunidade científica internacional devido ao fato da ausência do íon cálcio produzir na célula muscular cardíaca dano semelhante à lesão de isquemia-reperusão. Apesar de não serem conhecidos todos os mecanismos envolvidos no processo da lesão celular no paradoxo do cálcio, a conexão intercelular mantida somente pelo *nexus* parece ter papel chave na fragmentação celular. A adição de pequenas concentrações de cálcio, bloqueadores de canal de cálcio, hiponatremia ou hipotermia são importantes para evitar que haja lesão celular no momento da reperusão com soluções com concentração fisiológica de cálcio.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Isquemia Miocárdica. Cálcio.

INTRODUÇÃO

Na década de 1960 Zimmerman et al.^[1,2] descreveram lise maciça de cardiomiócitos após administração de cardioplegia com solução sem cálcio seguido por reperusão com solução com concentração fisiológica de cálcio em coração isolado de ratos. A esse evento foi chamado “paradoxo do cálcio”.

Diferentemente do que seria esperado, a ausência completa do cálcio não provocou somente a parada cardíaca, mas

também alterou as membranas celulares dos miócitos cardíacos, culminando na fase de reperusão com necrose dos mesmos, explicando o termo “paradoxo”^[1].

Nos anos seguintes diversos pesquisadores estudaram possíveis mecanismos fisiológicos do paradoxo, culminando com expressiva quantidade de trabalhos sobre o assunto, sendo muitos apresentados em 1983, no IX Congresso Mundial da Sociedade de Pesquisa do Coração, realizado em Londres^[3].

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

²Hospital de Base São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

⁴Braile Biomédica, Indústria Comércio e Representações, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Av. República do Líbano, 2700, casa 80, São José do Rio Preto, SP, Brasil - CEP: 15092-440

E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Abreviaturas, acrônimos & símbolos

| | |
|-----|-------------------------|
| DNP | Dinitrofenol |
| ADP | Difosfato de adenosina |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| VE | Ventriculo esquerdo |

Nesse evento foi compilado muito do que se sabia na época a respeito da ausência do cálcio na solução cardioplégica, da lesão miocárdica extensa a que essa solução provoca e formas alternativas para a elaboração de uma cardioplegia hipocalcêmica segura^[4-6].

Após quase 50 anos da descoberta desse paradoxo, este trabalho objetiva discutir alguns efeitos lesivos do paradoxo do cálcio no coração, considerando-se sua importância, mecanismos moleculares, alterações celulares ultraestruturais, ação lesiva aditiva ou protetora quando colocado em associação com outras soluções e algumas formas de evitá-lo.

Importância do paradoxo do cálcio

Na década de 1980, o metabolismo do cálcio no coração foi bastante estudado. Nessa época, havia consenso sobre as consequências da sucessão de um meio sem cálcio seguido por outro repleto dele para a célula muscular cardíaca, que internaliza rapidamente esse íon, levando a mesma à citólise e o coração à insuficiência cardíaca. Esse fenômeno é semelhante à lesão de reperfusão^[7].

Outro aspecto fundamental é o conhecimento sobre mecanismos envolvidos, pois soluções cardioplégicas não devem causar dano celular. Soluções cardioplégicas hipocalcêmicas são efetivas para induzir parada cardíaca^[8]. Entretanto, substâncias que interrompam ou amenizem efeitos colaterais indesejáveis devem estar presentes para evitar disfunção ventricular após circulação extracorpórea^[7].

Estudos sobre vias metabólicas que promovem ou interrompem o seu processo^[9,10], assim como suas relações com insuficiência cardíaca^[11,12] têm sido publicados, aos quais recorreremos brevemente a seguir.

Mecanismo causal

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar o paradoxo do cálcio como aumento da permeabilidade do cálcio no sarcolema^[13], no glicocálix^[14] e separação dos discos intercalares^[15,16], porém nenhuma ainda esclareceu todo o mecanismo do paradoxo do cálcio.

É possível também que a hipercalemia intracelular não seja causa primária do paradoxo do cálcio. Seu aumento pode ocorrer como consequência de dano no sarcolema acompanhado da entrada de quantidade moderada de cálcio para células estruturalmente alteradas^[17].

A ausência isolada de cálcio pode provocar lesão celular, mas seu efeito deletério é potencializado em meios com anóxia, cafeína, 2,4-dinitrofenol (DNF), balão ventricular (dis-

tensão mecânica), etc. Todas essas condições causam lesões ao miocárdio mesmo na ausência de cálcio extracelular^[18-22]. Outro mecanismo aceito é que o cálcio adentre a célula de maneira massiva, provocando lesão e morte celular^[23].

Alterações celulares estruturais

A primeira descrição de mudanças estruturais no miócito perfundido em meio livre de cálcio foi realizada por Muir et al.^[16], que verificaram alterações em discos intercalares e glicocálix de miócitos em corações isolados de ratos. Discos intercalares são estruturas complexas divididas em várias regiões, sendo a maior delas ocupada pela fascia adherens. Esses são os locais de maior tensão entre as células no momento da contração miocárdica. Junções desmossômicas, chamadas de macula adherens, estão presentes e servem para unir as células. Nexus ou gap junctions são pontos focais de contato celular íntimo, sendo locais de sinalização elétrica entre as células^[24].

Muir et al.^[16] notaram que miócitos cardíacos submetidos à perfusão sem cálcio apresentaram a partir de 30 minutos nítida separação nas regiões da fascia adherens e macula adherens, enquanto o nexus se mantinha intacto (Figura 1). Ashraf^[13] e Yates & Dhalla^[25] observaram mudanças similares em 10 a 15 minutos de exposição ao mesmo meio. Períodos mais curtos, como 3 a 5 minutos, geralmente não provocam separação física na ultraestrutura dos discos intercalares^[23].

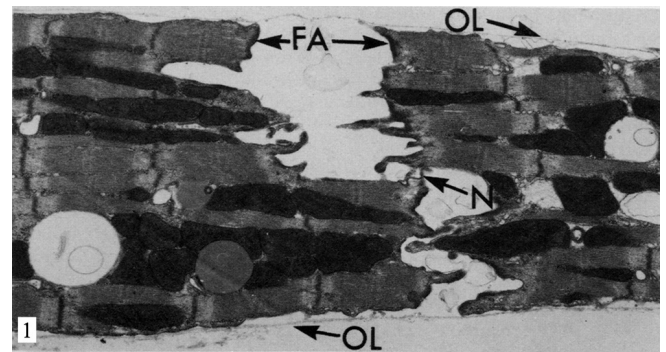


Fig. 1 - Eletromicrografia de coração de rato após 12 minutos em perfusão sem cálcio em 37°C. Os discos intercalares estão separados nas regiões da fascia adherens (FA) mas ainda estão interligadas pelas junções nexus (N). A lâmina externa do sarcolema (OL) ou glicocálix está destacado da membrana plasmática dos miócitos. Reproduzido de Ganote & Nayler, 1985^[23]

O meio sem cálcio aumenta a quantidade de sódio intracelular tanto em cultura de miócitos como no coração isolado. Passando para um meio rico em cálcio, esse íon adentra rapidamente as células via bomba antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, funcionando ao contrário. As semelhanças terminam aí, pois há contração do miócito em cultura, mas não citólise, enquanto que no coração isolado encontramos lise maciça das células. Esse fenômeno foi descrito como intolerância ao cálcio^[26-28].

A citólise no momento que o miócito entra em contato com solução de reperfusão rica em cálcio após sensibilização em meio sem esse íon ocorre porque essas células têm somente discos intercalares conectando umas às outras, sendo que durante a contração há avulsão dos mesmos com exposição do meio intracelular de cada uma delas, explicando a morte celular maciça das mesmas^[16].

Outra mudança que ocorre durante a perfusão sem cálcio é o destacamento do glicocálix, que geralmente é uma mudança focal que não é vista até 10 a 15 minutos após a infusão da solução sem cálcio. Frank et al.^[29,30] mostraram que apesar da lâmina externa do glicocálix se destacar, há uma membrana mais interna que fica aderida na membrana celular.

Ashaf et al.^[13] e Frank et al.^[29] observaram agregação e rearranjo anômalo das moléculas constituintes da membrana celular quando colocadas em meio sem cálcio, fazendo com que haja dano celular irreversível devido à permeabilidade alterada de membrana. Os mecanismos moleculares dessas alterações ainda não são conhecidos.

Fase de reentrada de cálcio na célula

Após 10-15 minutos em meio desprovido de cálcio, o miócito está sensibilizado, sendo estabelecida a separação dos discos intercalares entre as células^[23]. Os sarcômeros de cada célula condensam em uma única banda de contração. As fascias adherens permanecem conectadas aos sarcômeros, mas estão completamente separadas das membranas das células adjacentes. Regiões de discos intercalares, localizadas entre as zonas de fascias adherens se tornam fragmentadas, permitem que mitocôndrias adentrem o espaço intercelular^[31]. Ganote et al.^[19] mencionam que a hipotermia evita a lise da fascias adherens e, por conseguinte, a citólise.

A contração do sarcômero e a necrose celular são idênticas àquelas observadas em outros tipos de lesão como necrose por catecolamina e lesão isquemia/reperfusão. Entretanto, deve ser enfatizado que a ultraestrutura celular quando em meio sem cálcio difere de todas as anteriores pela separação dos discos intercalares e presença de uma única banda central de contração^[23].

Traços de cálcio

Rebeyka et al.^[32] constataram em modelo de circulação extracorpórea que corações de cães perfundidos com solução cardioplégica gelada sem cálcio apresentaram pior recuperação da função ventricular e maior área de necrose do que aqueles em que a solução tinha apenas 70µmol/L de cálcio, mostrando que mesmo concentrações pequenas de cálcio são suficientes para proteger o coração do paradoxo do cálcio.

Glicocálix

A separação da lâmina externa do glicocálix da membrana celular do miócito ocorre após exposição da célula ao meio pobre em cálcio^[23]. Frank et al.^[14] cogitaram que essa

separação seria responsável pelo aumento da permeabilidade do cálcio na membrana. Entretanto, Nayler et al.^[17] utilizando 2 mM de cálcio no lugar do magnésio no período privado de cálcio demonstrou que apesar de ainda haver destacamento do glicocálix, não havia aumento da permeabilidade de membrana ao cálcio e Slade et al.^[33] também já observaram que miócitos colocados em meio tampão sem cálcio também perdem o glicocálix, sem, contudo, haver alteração do influxo do íon cálcio.

Com a utilização da neuramidase há separação completa do glicocálix dos miócitos com aumento da permeabilidade celular ao cálcio. Para explicar esse fenômeno, Ganote et al.^[23] postularam que nesse caso as glicoproteínas de membrana também seriam danificadas, perdendo o controle do fluxo de cálcio.

ATP

Ruigrok et al.^[34] demonstraram que a liberação maciça de enzimas que ocorre na fase de reperfusão com cálcio é dependente de energia. Essa conclusão é baseada em experimentos que consumiam o ATP intracelular do miócito com perfusão anóxica ou na inclusão dessa célula em meio sem glicose. As células cardíacas não liberavam enzimas na fase de cálcio normal após 5 minutos de perfusão sem cálcio devido à depleção do ATP^[34].

Bloqueadores dos canais de cálcio

Baker & Hearse^[35] observaram que o efeito dos bloqueadores dos canais de cálcio são melhor demonstrados quando há baixa concentração de cálcio no extracelular na reperfusão. Nessas condições, a entrada do cálcio acontece preferencialmente pelos canais lentos da membrana. A limitação dessa entrada permite a recuperação da lesão dos discos intercalares e do sarcolema. Em soluções com concentração fisiológica de cálcio na solução de reperfusão, os bloqueadores dos canais de cálcio oferecem pouca proteção para o paradoxo, sugerindo que mais de uma via seja importante para a entrada do cálcio na célula^[36].

Sódio

Dhalla et al.^[37] mostraram que quando a concentração de sódio é reduzida para 35mM na fase sem cálcio, a magnitude da injúria tecidual é reduzida na fase de reperfusão com cálcio. Isso ocorre devido à baixa concentração do sódio, que lentifica a entrada do cálcio na membrana pela bomba antiporte Na⁺/Ca²⁺, facilitando o reequilíbrio iônico intracelular e prevenindo a contração que levaria à morte celular^[37].

Durante o período sem cálcio, a baixa concentração de sódio reduz o gradiente transmembrana e retarda o efluxo de cálcio e o influxo de sódio. Isso retardaria tanto a retirada do cálcio intracelular quanto a lesão celular provocada pela falta desse íon. No período com cálcio normal o sódio baixo também seria benéfico, pois reduz o influxo de cálcio via bomba antiporte Na⁺/Ca²⁺,

funcionando ao contrário. A eliminação lenta de cálcio quando a célula está sem ele e a internalização mais lenta no período de reperfusão dá à célula condições de reestabelecer seu equilíbrio iônico antes de qualquer lesão estrutural^[37].

Hipotermia

Hipotermia protege o miócito do paradoxo do cálcio^[38,39]. Ela previne a separação do disco intercalar e o destacamento do glicocálix^[40]. Além disso, reduz a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, podendo diminuir a perda do íon Ca^{+2} no momento da perfusão sem cálcio^[41]. A temperatura ideal encontrada para proteção miocárdica do paradoxo do cálcio foi 22°C ^[42-44].

Lesão mecânica

Ganote et al.^[20] afirmam que quando corações isolados de ratos são colocados em anóxia em meio com concentração fisiológica de cálcio, a distensão do balão volumétrico em ventrículo esquerdo (VE) ocorre com pequeno aumento enzimático decorrente da lise celular, mas a distensão de VE é difícil. Quando o meio é livre de cálcio e normóxia, a distensão é fácil e também a liberação enzimática é pequena. Entretanto, quando temos anóxia e meio livre de cálcio, há liberação maciça de enzimas celulares.

Isso ocorre porque corações anóxicos conseguem suportar a tensão de parede que o balão imprime devido aos discos intercalares estarem íntegros. A distensão da cavidade ocorre por meio de alongação dos sarcômeros, com lesão dos mesmos. Em meio livre de cálcio e normóxia, as fibras musculares já estão relaxadas e a tensão produzida pelo balão não é suficiente para ocasionar avulsão de disco intercalar fragilizado. Mas, quando a anóxia e meio sem cálcio estão superpostos, a célula mantém a rigidez dos sarcômeros com a fragilidade dos discos intercalares. A pressão do balão insuflado lesa diretamente essa região, acarretando liberação de enzimas intracelulares^[20].

Dinitrofenol

O dinitrofenol (DNP) é um ácido lipossolúvel fraco que age como protonóforo (translocador de prótons), entra na mitocôndria com carga positiva e sai com carga negativa, criando transporte de elétrons para fora da mitocôndria, evitando a conversão do ADP em ATP^[45]. Também provoca contração ventricular rápida tanto em corações submetidos a meio livre de cálcio como naqueles com concentração normal desse íon. No entanto, naqueles em meio sem cálcio provoca lise celular maciça^[22](Figura 2).

Essa observação é consistente com a hipótese que contração separa fisicamente as células, causando a lise celular naquelas em meio sem cálcio. O DNP por si só causa a contração das células, não sendo necessário adicionar cálcio ao meio. O cálcio intracelular presente nas mitocôndrias e sarcolema não seriam suficientes para gerar ambiente que simule meio com cálcio normal^[22].

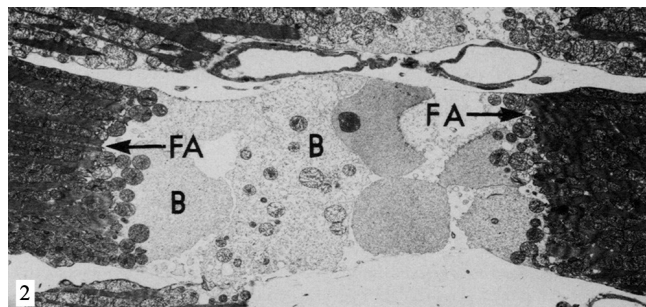


Fig. 2 - Eletromicrografia de coração de rato após 5 minutos em perfusão sem cálcio, seguido de 15 minutos com adição de DNP ao primeiro perfusato. Os sarcômeros aqui estão contraídos, tracionando a fascia adherens (FA) e provocando lesão na membrana celular do miócito na região do nexus. O citosol está exteriorizado na forma de blebs (B) na região intercelular. Reproduzido de Ganote & Nayler, 1985^[23]

Cafeína

A cafeína provoca liberação do cálcio do sarcolema, mas não na mitocôndria^[46]. Assim, o cálcio aumenta discretamente no intracelular, porém, sem sobrecarga do mesmo^[31]. A contração persistente produzida pela cafeína é dependente do cálcio, sendo que em sua ausência há sustentação por apenas 20 a 30 segundos, seguida por relaxamento^[18].

Corações perfundidos com solução com cafeína, mas sem cálcio a 22°C não manifestam aumento de enzimas, mas aqueles que são mantidos a 37°C apresentam lesão semelhante a do paradoxo do cálcio^[18].

Considerando que o aumento da concentração de cálcio no intracelular não é expressivo, porque não houve reperfusão com cálcio, é improvável que a lesão seja originária de intoxicação por cálcio, mas sim por ação direta da contração ventricular no sarcolema^[18].

CONCLUSÃO

Devemos temer o fenômeno conhecido como “paradoxo do cálcio”, pois lesa irreversivelmente a membrana do miócito, provocando extrusão do conteúdo celular. Entretanto, apesar de seus mecanismos biomoleculares ainda não serem completamente conhecidos, medidas como hipotermia, hiponatremia e presença de traços de cálcio na solução de perfusão diminuem o risco dessa lesão, possibilitando a recuperação da função ventricular após parada cardíaca induzida.

Papéis & responsabilidades dos autores

| | |
|------|--|
| MABO | Autor principal |
| ACB | Ajuda no levantamento bibliográfico e tradução artigos |
| CAS | Ajuda no levantamento bibliográfico e tradução dos artigos |
| PHHB | Ajuda na correção do manuscrito |
| JLLC | Ajuda na correção do manuscrito |
| GG | Co-orientador |
| DMB | Orientador |

REFERÊNCIAS

1. Zimmerman AN, Hulsmann WC. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*. 1966;211(5049):646-7.
2. Zimmerman ANE, Daems W, Hülsmann WC, Snijder J, Wisse E, Durrer D. Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res*. 1967;1(3):201-9.
3. Poole-Wilson PA, Nayler WG. Preface. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):111.
4. Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PD, Tones MA. Calcium out of control. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16 (2):175-87
5. Nayler WG, Dresel PE. Ca²⁺ and the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):165-74.
6. Langer GA. Calcium at the sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(2):147-53.
7. Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res*. 2000;45 (1):123-7.
8. Gebhard MM, Bretschneider HJ, Gersing E, Preusse CJ, Schnabel PA, Ulbricht LJ. Calcium-free cardioplegia--pro. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H 151-60.
9. Bi SH, Jin ZX, Zhang JY, Chen T, Zhang SL, Yang Y, et al. Calpain inhibitor MDL 28170 protects against the Ca²⁺ paradox in rat hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(4):385-92.
10. Zhang JY, Tong W, Wu F, Bi SH, Xu M, Jin ZX, et al. Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury. *PLoS One*. 2012;7(12):e52270.
11. Wenzel S, Tastan I, Abdallah Y, Schreckenberger R, Schluter KD. Aldosterone improves contractile function of adult rat ventricular cardiomyocytes in a non-acute way: potential relationship to the calcium paradox of aldosteronism. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(2):247-56.
12. Kass RS, Lindegger N, Hagen B, Lederer WJ. Another calcium paradox in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(1):28-31.
13. Ashraf M. Correlative studies on sarcolemmal ultrastructure, permeability, and loss of intracellular enzymes in the isolated heart perfused with calcium-free medium. *Am J Pathol*. 1979;97(2):411-32.
14. Frank JS, Rich TL, Beydler S, Kreman M. Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox. *Circ Res*. 1982;51(2):117-30.
15. Vander Heide RS, Ganote CE. Caffeine-induced myocardial injury in calcium-free perfused rat hearts. *Am J Pathol*. 1985;118(1):55-65.
16. Muir AR. The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat*. 1967;101(Pt 2):239-61.
17. Nayler WG, Elz JS, Perry SE, Daly MJ. The biochemistry of uncontrolled calcium entry. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:29-41.
18. Ganote CE, Sims MA, VanderHeide RS. Mechanism of enzyme release in the calcium paradox. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:63-71.
19. Ganote CE, Sims MA. Parallel temperature dependence of contracture-associated enzyme release due to anoxia, 2,4-dinitrophenol (DNP), or caffeine and the calcium paradox. *Am J Pathol*. 1984;116(1):94-106.
20. Ganote CE, Sims MA. Physical stress-mediated enzyme release from calcium-deficient hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1983;15(7):421-9.
21. Ganote CE, Liu SY, Safavi S, Kaltenbach JP. Anoxia, calcium and contracture as mediators of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*. 1981;13(1):93-106.
22. Ganote CE, Grinwald PM, Nayler WG. 2,4-Dinitrophenol (DNP)-induced injury in calcium-free hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1984;16(6):547-57.
23. Ganote CE, Nayler WG. Contracture and the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol*. 1985;17 (8):733-45.
24. De Mello WC. Intercellular communication in cardiac muscle. *Circ Res*. 1982;51(1):1-9.
25. Yates JC, Dhalla NS. Structural and functional changes associated with failure and recovery of hearts after perfusion with Ca²⁺-free medium. *J Mol Cell Cardiol*. 1975;7(2):91-103.
26. Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger FA, Brierley GP. Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;12(12):1383-95.
27. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;12(7):715-23.
28. Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. Mechanism of Ca²⁺ resistance in adult heart cells isolated with trypsin plus Ca²⁺. *J Mol Cell Cardiol*. 1982;14(9):523-30.
29. Frank JS. Ca depletion of the sarcolemma--ultrastructural changes. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl H:23-7.
30. Frank JS, Langer GA, Nudd LM, Seraydarian K. The myocardial cell surface, its histochemistry, and the effect of sialic acid and calcium removal on its structure and cellular ionic exchange. *Circ Res*. 1977;41(5):702-14.
31. Hunter DR, Haworth RA, Berkoff HA. Cellular calcium turnover in the perfused rat heart: modulation by caffeine and procaine. *Circ Res*. 1982;51(3):363-70.

32. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99 (3):475-83.
33. Slade AM, Severs NJ, Powell T, Twist VW. Isolated calcium-tolerant myocytes and the calcium paradox: an ultrastructural comparison. *Eur Heart J.* 1983;4 Suppl H:113-22.
34. Ruigrok TJ, Boink AB, Spies F, Blok FJ, Maas AH, Zimmerman AN. Energy dependence of the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(11):991-1002.
35. Baker JE, Hearse DJ. Slow calcium channel blockers and the calcium paradox: comparative studies in the rat with seven drugs. *J Mol Cell Cardiol.* 1983;15(7):475-85.
36. Nayler WG, Perry SE, Elz JS, Daly MJ. Calcium, sodium, and the calcium paradox. *Circ Res.* 1984;55(2):227-37.
37. Dhalla NS, Alto LE, Singal PK. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. *Eur Heart J.* 1983;4 Suppl H:51-6.
38. Baker JE, Bullock GR, Hearse DJ. The temperature dependence of the calcium paradox: enzymatic, functional and morphological correlates of cellular injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1983;15(6):393-411.
39. Holland CE, Jr., Olson RE. Prevention by hypothermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1975;7(12):917-28.
40. Rich TL, Langer GA. Calcium depletion in rabbit myocardium. Calcium paradox protection by hypothermia and cation substitution. *Circ Res.* 1982;51(2):131-41.
41. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol.* 1968;195(2):451-70.
42. Boink AB, Ruigrok TJ, de Moes D, Maas AH, Zimmerman AN. The effect of hypothermia on the occurrence of the calcium paradox. *Pflugers Arch.* 1980;385(2):105-9.
43. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(7):641-68.
44. Bulkley BH, Nunnally RL, Hollis DP. "Calcium paradox" and the effect of varied temperature on its development: a phosphorus nuclear magnetic resonance and morphologic study. *Lab Invest.* 1978;39:133-40.
45. Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev.* 2001;2(4):255-65.
46. Blayney L, Thomas H, Muir J, Henderson A. Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrils, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum from rabbit heart. *Circ Res.* 1978;43(4):520-6.